

발간등록번호

11-1543000-000475-01

고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물 개발 사업  
(Research Center for Development of Plants for  
Production of High Value Proteins)

전북대학교

농림축산식품부

## 주 의

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

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물 개발 사업”의 보고서로 제출합니다.

2014년 5 월 9 일

주관연구기관명 : 전북대학교

주관연구책임자 : 양 문 식

세부연구책임자 : 이 경 열

세부연구책임자 : 김 태 금

세부연구기관명 : (주) 젠닥스

세부연구책임자 : 정 화 지

세부연구기관명 : (주) 엔비엠

세부연구책임자 : 권 태 호

세부연구기관명 : 고려대학교

세부연구책임자 : 신 정 섭

세부연구기관명 : 경상대학교

세부연구책임자 : 이 균 오

세부연구기관명 : 포항공과대학

세부연구책임자 : 황 인 환

위탁연구기관명 : 전남대학교

위탁연구책임자 : 김 태 중

# 요 약 문

## I. 제 목

: 고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물 개발 사업

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본 연구는 가축 및 어류의 질병 예방을 위한 식물 경구 백신, 재조합 산업용 효소, 치주질환 예방을 위한 항체단백질을 생산하는 식물형질전환 식물체를 개발하고 기반기술로써 점막면역계에서 면역 증진을 위한 경구백신 효율 증진 및 효능 기술 개발, 식물에서 재조합 단백질의 발현 증진을 위한 프로모터 개발, 고효율 번역 인자 기능 분석 및 개발, 식물 특이적 면역원성을 제거한 당 단백질 생산 숙주 개발을 하여 형질전환 식물체를 이용한 고부가가치 단백질 생산 기술 및 시스템을 개발하고 고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물의 개발을 통한 신품종을 개발하여 국내 농업분야의 고도화를 추진하고자 한다.

### 2. 연구과제 세부목표

- 돼지유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발
- 어류 노다바이러스 어류경구백신 형질전환 담배 개발
- 산업용 효소 생산용 형질전환 벼 개발
- 식물세포 배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석
- 경구백신 효율 증진 기술 및 효능 검정 기술 개발
- 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 제작
- 식물체에서의 고효율 단백질 발현 시스템 확립
- 면역성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 개발

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 돼지 유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발

- 재조합 유전자 식물발현 벡터 제조 및 벼의 형질전환
- 벼의 재분화, 항원유전자의 분자생물학적 분석 및 homoline 선발
- 실험동물 면역반응 확인, homoline 벼의 농업형질 검사 및 위해성 검사
- 농업형질 검사 및 실험동물 면역성 검사
- 목적동물 면역성 확인 및 신품종 등록

### 2. 어류 노다바이러스 어류경구백신 형질전환 담배 개발

- 국내 노다바이러스의 구조단백질인 캡시드 유전자 분리
- 노다바이러스 항원단백질 유전자의 식물체 발현 최적화
- 색소체 형질전환 벡터내로 도입



- 노다바이러스 항원단백질 유전자의 담배 색소체내로 도입
- T<sub>0</sub> 세대 담배 색소체 게놈내에 도입된 항원유전자 검증
- 색소체 형질전환 담배 T<sub>1</sub>세대 검정
- 분리된 재조합단백질의 항원성 검증
- 재조합단백질을 이용한 표준항체 생산
- 형질전환 식물체내의 항원 유전자단백질 발현량 조사
- 실험동물 (mouse)에서의 항원성 검증
- 공격접종시 사용할 순수 노다바이러스 배양액을 세포배양을 통해 확보
- 실험용 nodavirus-free 능성어류 치어 확보
- 담배유래 항원을 이용한 치어 면역 및 이를 통한 항체가 확인
- 항체가 상승을 위한 vaccine formulae 개발
- 항체가에 따른 공격접종 실시 및 그로 인한 viral clearance 및 감염율 (유병율 등) 조사
- 조직부검을 통한 백신 효능 검증
- 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 안전성 검토
- 형질전환 식물체 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>세대에서 Southern analysis로 색소체로 도입된 유전자를 확인하고, northern 분석으로 형질전환체 식물로 도입된 항원유전자의 발현정도를 측정
- T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> 세대 형질전환체 식물에서 발현된 항원단백질의 발현정도를 Western 분석을 통하여 최종적으로 형질전환 식물체의 형질 고정 확인
- T<sub>3</sub>세대 담배유래 항원을 이용한 치어 면역 및 이를 통한 항체가 최종확인
- 형질전환 담배의 품종 보호 출원 및 등록 : 5차년도 (2013년)

### 3. 산업용 효소 생산용 형질전환 벼 개발

- TEV endopeptidase 유전자 합성
- 식물발현벡터의 제작 및 형질전환
- 고생산 세포주의 확립
- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발
- 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인
- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 현탁세포 확립
- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발, 농업형질 조사
- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 cell bank 구축
- 식물세포유래 TEV endopeptidase에 대한 생화학적 특성 분석
- TEV endopeptidase 고생산 최종 elite line에 대한 환경위해성 평가 및 품종등록
- TEV endopeptidase 고생산 세포주 제조공정 확립
- TEV endopeptidase에 대한 분리·정제방법을 확립
- 배양공정 및 정제공정을 20 L 규모로 확립하고 최적의 제조지시서 완성

### 4. 식물세포 배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석

- Amylase와 Cys protease siRNA 식물발현 벡터 제작 및 벼 형질전환
- 형질전환 식물체 선발 및 분자생물학적 분석
- 식물세포 현탁배양에서 분리한 항체단백질의 기능 분석

- 항체단백질의 대량 생산 및 분리 정제 시스템 확립

#### 5. 경구백신 효율 증진 기술 및 효능 검정 기술 개발

- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질 분석
- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질의 면역반응 유도 분석
- 실험동물 소장 점막면역계의 항 펩타이드에 의한 cytokine 유도 특성 분석
- In vitro M cell model에서 M cell이 분비하는 단백질 pattern 분석
- 표지항원 및 항 펩타이드 확보
- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질 분석
- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질의 면역반응 유도 분석
- 항 펩타이드가 장내 특정 세포 그룹에 작용하는 기작 분석
- M cell 분화시 분비되는 확인된 단백질을 확보
- 항펩타이드의 항원전달 능력을 ex vivo에서 분석
- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질 분석
- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질의 면역반응 유도 분석
- 실험동물을 이용한 경구면역 효능 검정
- 대상 peptide의 작용점 분석
- M cell 분화 단백질의 M cell 분화에 미치는 영향 분석
- M cell 분화 관련 재조합 단백질에 의한 표지항원의 전달 능력을 확인
- 형질전환체의 경구투여에 의한 면역반응 유도특성 확인
- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질의 면역반응 유도 분석
- 실험동물을 이용한 경구면역 효능 검정
- 실험동물을 이용하여 펩타이드 및 M cell 분화 단백질 적용에 의한 점막면역 반응 유도 특성 확인
- 형질전환체의 경구투여에 의한 면역반응 유도특성 확인
- 펩타이드 및 M cell 분화 단백질의 면역반응 유도 분석
- 실험동물을 이용한 경구면역 효능 검정
- 실험동물을 이용하여 펩타이드 및 M cell 분화 단백질 적용에 의하여 유도되는 점막면역 반응에서의 세포 반응 특성 분석
- 형질전환체의 경구투여에 의한 면역반응 유도특성 확인

#### 6. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 제작

- 미엘린 단백질 고생산 식물 형질전환용 벡터 시스템 구축 및 형질전환
- chemical-inducible 프로모터를 활용하여 식물형질전환 벡터 제작
- Microarray data와 RT-PCR 분석을 통한 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색
- 종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발
- 콩과 옥수수 종자에서 종자 특이적 발현 프로모터의 발현 분석 및 발현 벡터 시스템 구축

## 7. 면역성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 개발

- *gnt1 (cg)* mutant나  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase의 knockout 또는 knock-down을 기법을 이용한 immunogenic  $\beta$ 1,2-xylose와  $\alpha$ 1,3-fucose가 없는 당단백질 생산 호스트 개발
- Con A-, HRP-,  $\alpha$ 1,3-fucose-,  $\beta$ 1,2-xylose- 항체를 이용한 호스트의 N-glycan 분석
- 조직 특이 강력 promoter, signal sequence 이용 당 단백질 고 발현용 binary vector 시스템 구축
- Target 유전자 (glucocerebrosidase, PNGaseA) 발현 vector constructs 구축, Agrobacterium 을 이용한 형질전환 및 고 발현 계통확립
- 식물 ER-stress signaling, unfolded protein response (UPR) regulator screening
- 이들의 생화학적 분자생물학적 특성규명
- 이들을 이용한 target 당 단백질의 발현량 증가, quality control 기술 개발
- 식물세포 발현 단백질 분리용 affinity tag (vector) 개발 -단백질 고효율 순수 분리 기술 개발
- MALDI-TOF/MS를 이용한 N-glycan 분석

## 8. 식물체에서의 고효율 단백질 발현 시스템 확립

- Inducible 고효율 5' UTR의 screening을 위한 Arabidopsis 5' UTR의 sequence 분석
- 5' UTR을 중심으로 한 단백질 번역 기능 규명
- 환경 stress inducible 유전자들의 5' UTR의 분석을 통한 inducible 5' UTR 가능성 탐색
- Constitutive 5' UTR의 성능 검증을 위한 다양한 construct의 구축과 번역 능력 test
- Translation factor들의 동정 및 특성 규명
- 연구목표: 고효율 inducible 5' UTR 이용 발현 vector 개발과 translational initiation factor들의 활용 기술 개발
- cellulase 발현용 vector 구축 및 고발현 vector 개발
- Translational initiation factor의 translational 효능 증진 가능성 탐색
- targeting signal sequence를 이용한 고발현 vector 구축
- Cellulase 고발현 형질전환체 homoline의 분석과 동물 실험
- transgenic plant의 field에서의 homoline 선발 및 세대 간 검증을 통해서 발현의 지속성 연구
- Cellulase 발현 형질전환 벼의 사료 효율 검증을 위한 동물 실험

## IV. 연구개발결과

### 1. 돼지유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발

돼지 유행성 설사병에 대한 식물경구백신을 개발하기 위하여 원인균인 PEDV spike protein의 epitope 부분으로 알려진 COE와 S1D 항원유전자를 발현시키기 위하여 rice amylase 3D promoter 조절 하에 있는 식물발현 벡터를 제작하였고 벼에 형질전환하여 항원단백질의 발현을 확인하였다. 항원단백질을 발현하는 식물체를 냉동건조하여 얻은 분말을 이용하여 경구적인 방법으로 동물 실험한 결과 실험동물 쥐에서는 점막면역계에서 ligand로 쓰이는 Col과

융합한 융합항원단백질을 먹인 그룹에서 항원단백질에 대한 면역 반응을 보이는 것을 확인하였고 목적 동물 돼지에서는 carrier와 adjuvant로 널리 이용되는 LTB와 융합한 LTB-COE 융합항원단백질을 먹인 그룹에서 면역된 돼지의 새끼에서 시행한 공격접종에서 방어능력을 보였다. 형질전환 식물체의 elite line 선발을 위하여 항원유전자 1-2 copy가 도입된 형질전환 식물체를 real time PCR, genomic DNA Southern blot analysis, DNA flanking sequence를 이용하여 선발하였고 농업형질 검사를 위하여 포장에서 실험한 결과 성숙기에 최종적으로 불임성이 없이 정상적으로 등숙한 개체를 확보하였다.

## 2. 어류 노다바이러스 어류경구백신 형질전환 담배 개발

노다바이러스 캡시드 유전자를 외래 단백질의 발현을 극대화 시킬 수 있도록 식물 색소체 유전자 전사과정에 맞도록 염기서열을 담배 색소체의 코돈에 맞게 최적화하여 색소체 형질전환 기본벡터인 TIA::RclpGAH로 도입하였다. 완성된 벡터를 이용하여 bombardment 방법으로 노다바이러스 캡시드 유전자를 담배 색소체로 도입하여 형질전환체를 확보하였다. 확보된 T<sub>0</sub> 형질전환체는 gDNA PCR, RT-PCR, Western blot 방법을 통해서 유전자 도입과 발현을 확인하였다. 노다바이러스 캡시드 유전자의 발현양이 높은 형질전환체 3개의 line을 확보하여 T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub> 세대까지 안정적으로 발현이 유지되는지 확인하였다. 감염개체의 뇌, 비장, 신장으로부터 total RNA를 추출한 후 노다바이러스 캡시드 protein 유전자를 확보하였으며, 클로닝 및 발현 검증을 통해 노다바이러스 캡시드 유전자를 확보하였다. 확보된 유전자를 이용하여 단백질 발현을 확인한 후 순수분리를 실시하였다. 순수분리된 재조합 단백질을 항원으로 이용하여 anti-noda coat protein 항체를 생산하였다. 항체가 상승을 위한 키토산 formulae 개발을 위해서 여러 가지의 키토산 대상 중에서 생체자극이 덜하고 점막면역자극효과가 기대되는 CM-chitin사용하여 본 실험에 이용하였으며 CM-chitin이 adjuvant로서 효능이 있는 것을 확인하기 위한 실험을 실시하였고 마우스와 능성어에서 CM-chitin이 adjuvant로써의 역할을 수행함을 확인하였다. 동물성 사료를 급이하는 능성어류에 있어 식물성 사료의 함유량이 먹이반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 식이거부반응 실험을 실시하여 어류 사료내의 담배 식물재료 최적 formulae 개발하였다. 담배유래의 항원에 대한 마우스와 능성어에서 항체유도 확인 실험을 진행하여 통계학적으로 유효한 항체가 유도되는 것을 확인 할 수 있었다. 일시적발현 벡터인 pTRAc, pTRAc-rcs1-cTP, pTRAc-ERH vector에 Noda gene을 삽입하여 최종벡터를 완성하였다. 완성된 벡터를 Agrobacterium GV3101에 형질전환하여 infiltration 과 vacuum inoculation 실험에 사용하였다. 형질전환된 Agrobacterium cell을 이용하여 일시적 발현 방법인 infiltration 방법을 이용하여 단백질 발현의 최적조건을 확립하였다. 한번에 많은 sample에 단백질 발현을 확인하기 힘든 infiltration 방법을 개선하기위해서 vacuum inoculation 방법을 이용하여 단백질 발현을 확인하였고 silwet 농도, vacuum 압력, vacuum 시간, sampling 시기, sampling 위치 등 단백질 발현 최적 조건을 확립하였다.

## 3. 산업용 효소 생산용 형질전환 벼 개발

식물세포배양을 이용하여 산업용 효소인 TEV endopeptidase와 Enterokinase를 생산하기 위하여 TEV endopeptidase와 Enterokinase의 유전자를 벼에 최적인 코돈으로 디자인 하여 합성 한 후에 rice amylase 3D promoter를 이용한 식물발현 벡터를 제작하고 이를 각각 벼에 형질전환하여 TEV endopeptidase와 Enterokinase의 발현을 확인하였으며, 분자생물학적 방법

을 이용하여 고생산 벼 세포주를 확립하였다. 각각의 고생산 세포주로부터 현탁세포를 유도하고 이를 이용하여 생산한 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 활성을 확인하였으며, TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주의 cell bank를 구축하였다. 대용량 배양 후 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 고순도 분리·정제방법을 확립하였으며, 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 생화학적 특성을 분석하였다. 각 단계별 최적 조건을 종합하여 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 배양, 20 L/batch 규모의 배양 및 정제관련 SOP를 확립하였다.

#### 4. 식물세포 배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석

식물세포 현탁배양에서 치주균에 대한 항체 단백질의 생산을 증진시키고자 amylase와 Cys protease에 대한 siRNA를 제작하여 형질전환하여 식물세포 현탁배양에서 배지에 축적되는 amylase와 단백질 분해 효소의 활성의 감소를 확인하였고 항체단백질의 발현 증진을 확인하였다. 식물세포 현탁배양에서 분비된 항체단백질을 protein G column을 이용하여 분리하였고 분리된 항체단백질을 이용하여 *P. gingivalis*의 부착에 대한 억제 효능, invasion assay를 이용하여 세포내 침투 능력 억제, phagocytosis assay를 이용하여 치주균의 phagocytosis의 증가, bacterial killing assay를 수행하여 neutrophil의 치주균 사멸능의 증가를 확인하였다. 항체단백질의 대량생산을 위하여 대체성 탄소원(fumaric acid, malic acid), 삼투성 제제 (NaCl)를 첨가하여 fumaric acid 첨가에서 항체단백질의 고발현을 확립하였고 protein G column를 이용하여 식물세포 현탁배양에서 분비 축적된 항체 단백질의 분리 및 정제 조건을 확립하였다.

#### 5. 경구백신 효율 증진 기술 및 효능 검정 기술 개발

본 연구에서는 항 펩타이드 LL-37이 점막의 면역 유도조직에서 외부 항원에 대한 항체를 형성하기에 적합한 환경을 구성하는 역할을 확인하였다. 항 펩타이드 LL-37을 경구 백신 모델에 적용하였을 때 항원 특이적 항체들이 T 세포 면역반응에 의해 증가 되는 것을 확인하였을 뿐 아니라 병원성 항원에 적용될 경우 병원균의 감염을 방어할 수 있는 항체 형성을 검증하였다. 또한 외부 항원 유입의 대표적인 세포인 M cell에서 특이적으로 발현하는 단백질 C5aR를 발견하였으며 C5aR에 대한 targeting이 경구 백신 효능을 증진시킬 수 있음을 확인하였다. M cell에서 C5aR에 의한 병원균 *Yersinia enterocolitica*의 감염이 TLR 과의 상호작용으로 유도되는 cAMP 증가에 따른 조절을 확인하여 M cell에서 병원균 유입 대한 새로운 기작을 확인하였다.

#### 6. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 제작

hMBP 단백질 발현에 적합한 벡터를 제작하여 당근에 형질전환하였다. 기내배양을 통하여 대량생산하여 MBP 단백질의 발현 유무를 분석하였고 최적의 단백질 추출 조건을 확립하였다. 또한 당근의 translational machinery에 맞도록 코돈을 최적화하였다. 유용 프로모터 개발을 위하여 microarray data와 RT-PCR 분석을 통한 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색을 완료하였고, 탐색된 프로모터 중 기존에 알려지지 않은 종자 특이적 프로모터를 선별이 가능하였다. 총 37개의 종자특이 발현이 예상되는 유전자를 선별하였고, 그 promoter들을 분석하였다. 콩과 옥수수 종자를 이용해 seed-specific cis-element를 포함한

promoter의 transient expression을 분석하였고, 종자 특이 프로모터를 4차년도에 3건, 5차년도에 3건의 특허출원을 완료하였다. 이 중에서 2건의 특허는 등록되었다.

#### 7. 면역성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 개발

식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물체 및 식물세포 개발을 목표로 *gnt1 (cgl)* 돌연변이 벼와  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase,  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase 등의 식물 특이적인 당전이효소의 활성이 없는 돌연변이체를 이용하여 immunogenic  $\beta$ 1,2-xylose와  $\alpha$ 1,3-fucose가 없는 당단백질 생산 식물체를 개발하는 연구를 진행하였고 이들의 N-glycan을 Con A-, HRP-,  $\alpha$ 1,3-fucose-,  $\beta$ 1,2-xylose-항체 그리고 MALDI-TOF/MS를 이용하여 분석하였다. 본 연구에서는 bioinformatics와 분자생물학적인 기법을 이용한 식물 특이적인 복합당쇄를 만드는데 관여하는 단백질과 외부 유전자의 발현을 억제하는 단백질 등이 결여된 knockout 돌연변이체(벼 5종, 애기장대 18종)를 확보하여 이들 각각의 돌연변이체에 대한 동형 접합자를 분리하는 일을 마무리하였고 교배를 통하여 맞춤형 당 단백질 생산 식물 library를 구축하였다.

#### 8. 식물체에서의 고효율 단백질 발현 시스템 확립

본 연구를 통해서 translational efficiency를 획기적으로 높일 수 있는 5'-UTR을 screening하고자 하였다. 흥미롭게도 5'-UTR의 nucleotide sequence에 따라서 단백질의 level이 1000배 이상 차이가 난다는 사실을 확인하였다. 이들 중에서 가장 높은 translational efficiency를 보이는 5'-UTR을 확보하고 이를 이용하여 expression vector를 구축하였다. 또한 chloroplast targeting signal sequence와 ER targeting signal sequence 들 중에서 가장 효율이 좋은 signal sequence를 확보하고 이들을 이용하여 high level ER targeting vector와 high level chloroplast targeting vector를 구축하였으며 이들을 이용하여 total soluble protein의 1%에 이르는 고발현 vector 및 고축적 vector들을 구축하였다. 이러한 결과들은 식물 세포를 이용하여 단백질 생산 시스템으로 활용하고자 하는 식물 바이오텍의 원천 기술들이라 할 수 있다. 또한 본 연구에서는 단백질들이 어떻게 endomembrane compartment에 trafficking 되며 이 과정이 어떻게 조절되는지와 엽록체 및 mitochondria에 단백질들이 어떻게 targeting되는지에 대한 기초 연구를 수행하여 다양한 중요한 factor들을 동정하였으며 이들의 작용 기작을 규명하였다. 이들은 후속 연구들을 통해서 단백질의 고축적 기술 개발에 활용될 수 있을 것이다.

### V. 연구성과 및 성과활용 계획

#### 1. 돼지유행성 설사병 예방을 위한 벼 신제품 개발

돼지 유행성 설사병에 대한 항원단백질을 발현하는 형질전환 식물체를 확보하여 농업 형질 검사한 결과 불임성이 없고 정상적으로 등숙한 식물체를 확보하였고 식물에서 발현된 항원단백질을 경구적인 방법으로 투여한 목적동물인 돼지의 새끼에서 공격 접종에 대한 방어능을 보임으로서 식물경구 백신에 대한 가능성을 확인하였다. 이러한 성과는 돼지 유행성 설사병에 국한 되지 않고 더 많은 가축 질병에 대한 응용이 가능할 것으로 보고 이에 더불어 인간의 질병에 대한 식물경구백신 개발에도 가능성이 있다고 할 수 있다.

## 2. 어류 노다바이러스 어류경구백신 형질전환 담배 개발

노다바이러스 캡시드단백질 유전자가 도입된 색소체 형질전환 담배생산에 이용된 식물형질전환 방법은 다양한 식물에 응용이 가능하다. 형질전환작물 시장은 고도의 기술과 특허 독점으로 고부가가치의 산업적 가치가 있다. 국내 형질전환 작물의 품종화 내지는 상업화가 가능하다고 추정됨으로 형질전환 작물 내에서의 유용 단백질 발현을 높일 수 있는 다양한 프로모터의 원천 특허화 및 품종보호 등에 대한 지적 재산을 확보할 수 있다. 형질전환체 개발에 비해 시간과 비용을 절약할 수 있는 방법인 일시적 발현 시스템의 방법 중 하나인 vacuum inoculation 방법을 활용하면 단기간에 대량의 유용단백질을 생산 할 수있다. 본 연구를 통해 수행한 담배 유래 항원단백질의 항원성 검증 방법은 어류의 다른 질병들에도 동일한 방식으로 접목이 가능한 특징이 있어 이로 인해 백신의 대상이 다양한 어종에 대해 다양한 질병으로 확산이 가능하다.

## 3. 산업용 효소 생산용 형질전환 벼 개발

식물유래 TEV endopeptidase와 Enterokibase의 대량생산 및 고순도 분리정제 기술을 확립하여 산업화를 완성하였다. 본 과제에서 확립한 대용량 배양기술을 활용하여 다양한 재조합단백질 생산 세포주에 개발을 추진 중에 있다.

## 4. 식물세포 배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석

식물세포 현탁배양을 이용하여 고발현 시스템인 rice amylase 3D promoter 발현 시스템에서 amylase와 Cys protease에 대한 분비 억제를 확인하였고 또한 이를 이용한 항체단백질의 발현 증진을 확인하여 식물세포 현탁배양을 이용한 유용단백질 생산에 널리 활용될 것으로 기대한다. 식물세포 현탁배양을 이용하여 생산 분리된 항체단백질에 대한 기능을 분석한 결과 animal cell에서 생산한 항체단백질과 유사한 기능을 확인하므로 식물세포 현탁배양을 이용한 의료용, 산업용 단백질 생산에 큰 기여를 할 것으로 본다.

## 5. 경구백신 효율 증진 기술 및 효능 검정 기술 개발

본 연구의 연구 성과는 항 펩타이드 LL-37 및 C5aR의 targeting이 경구 백신 보조제로써의 가능성을 갖는 것을 확인한 것으로 이후 여러 다른 병원성 단백질에 적용되어 경구 백신 보조제로써 이용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 M cell에서 C5aR와 TLR사이의 병원균 유입기작에 대한 이해는 병원균 감염에 대항하는 치료제 개발에 주요 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

## 6. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 제작

개발된 프로모터들은 모두 특허출원하였고, 특정 부분들만 조합적으로 재조합하여서 종자 특이적 유전자 발현 기술에 활용할 계획으로 고효율 단백질 발현시스템 개발에 효과가 있을 것이다.

## 7. 면역성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 개발

본 연구에서 개발된 맞춤형 당질 부가 glycoengineering 기술은 맞춤형 바이오의약품

개발을 위한 원천기술로써 선천적 대사 질환을 포함한 희귀 난치병의 치료제 생산에 이용될 수 있고 관련 국내 제약 산업 발전에 크게 기여할 수 있다. 분자농업 기술을 활용한 바이오의약품 개발 기술은 새로운 바이오의약품 생산시스템 개발을 위한 원천기술이며 고부가가치 분자농업 형질전환 식물체를 이용한 의료 및 산업용 생물소재 생산은 고부가가치 생물 소재의 내수 확보 및 수출 시장 개척에 기여할 수 있다

#### 8. 식물체에서의 고효율 단백질 발현 시스템 확립

본 연구에서는 식물세포를 단백질 생산 시스템으로 개발하기 위한 원천 기술의 하나로 단백질 고축적 기술을 개발하고자 하였다. 세포에서 단백질을 만드는 여러 단계 중에서 마지막 단계에 속하는 translation과정과 세포내 단백질 이동 과정을 규명하고 이를 이용하여 고축적 vector들을 개발하고자 하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과를 이용하여 다양한 단백질을 식물 세포에서 대량으로 생산하는 시스템을 구축하고자 한다. 현재로서는 돼지 열병 virus, AI의 haemagglutinin 단백질을 식물에서 대량으로 생산하는 시스템으로 개발하고자 한다.



## SUMMARY

### I. Title

Research center for development of plants for production of high value proteins.

### II. Objectives and Requirements of Research and Development

#### 1. Objective

This study is development of transgenic plants expressing antigen proteins of porcine epidemic diarrheal disease virus spike protein and of Nodavirus that infects grouper in Korea, high value-added industrial enzymes, and monoclonal antibodies against *Porphyromonas gingivalis*, and improvement of feasibility and efficacy of vaccinations in mucosal immune systems, development of seed and root-specific promoter, host plants producing humanized glycosylation pattern without immunogenicity, and cellular tools for high level protein production in plant cell as to develop plant cell as a protein production system.

- Development of transgenic plant expressing antigen proteins against PEDV.
- Development of new tobacco variety producing the vaccine against grouper nodavirus infection.
- Development of transgenic plant to produce high value-added industrial enzymes and establishment of the production process using the plant
- Improvement of antibody production in transgenic cell suspension culture by amylase and cysteine proteinase gene knockdown using RNA interference
- Development of technologies to enhance the efficacy of oral vaccine and to assess the efficacy of vaccination
- Construction of seed- and root-specific promoters and vectors for high efficient gene expression
- Development of a rice with customized N-glycan structure
- Development of cellular tools for a high protein production system in plants

### III. Research/Development Content and Range

#### 1. Development of transgenic plant expressing antigen proteins against PEDV.

- Construction of plant expression vector and rice transformation
- Transgenic rice regeneration, expression of antigen proteins, and selection of homoline plants
- Immunogenicity of plant-produced antigen protein in mouse, and homoline rice field test
- Immunogenicity of plant-produced antigen proteins in pig

#### 2. Development of transgenic tobacco producing oral vaccine of fish nodavirus

- Isolation of nodavirus capsid protein gene
- Codon optimization of nodavirus coat protein gene in plant expression system
- Subcloning of nodavirus coat protein gene into plastid transformation vector
- Introduction of nodavirus coat protein gene into tobacco plastid genome
- Verification of presence of antigen gene in T0 generation
- Analysis of T1 generation of plastid transgenic plant
- Verification of the recombinant protein antigenicity
- Polyclonal antibody production using recombinant protein
- Analysis of recombinant protein expression levels in transgenic tobacco
- Verification of antigenicity in mouse
- Production of pure nodavirus
- Production of nodavirus-free fish fry
- Immunization of fish fry by oral administration of tobacco vaccine
- Development of vaccine formulae
- Analysis of viral clearance and infection rate after virus-challenge trial
- Validation of vaccine efficacy by necropsy
- Intergenerational genetic stability analysis of transgenic plant
- Southern and Northern analysis of T2 and T3 transgenic tobacco to verify genetic stability and expression levels
- Verification of genetic stability in T2 and T3 transgenic tobacco by Western analysis
- Immunization of fish fry by oral administration of T3 tobacco vaccine
- Registration of transgenic tobacco : 5<sup>th</sup> year (2013)

#### 3. Development of new rice variety producing the recombinant industrial enzymes

- Synthesis of TEV endopeptidase gene
- Generation of recombinant plant expression vector and transformation the plant cells with the vector
- Establishment of cell lines with high expression efficiency
- Selection of elite rice lines with high expression efficiency of TEV endopeptidase
- Confirmation of biological activity of plant-produced TEV endopeptidase

- Establishment of suspension culture of the cells with high expression efficiency of TEV endopeptidase
  - Selection of elite rice plants with high expression efficiency of TEV endopeptidase and analysis of agronomic characteristics
  - Establishment of cell bank of cell lines with high expression efficiency of TEV endopeptidase and Enterokinase
  - Biochemical analyses of plant-produced TEV endopeptidase and Enterokinase
  - Environment risk evaluation and variety registration of the final elite line with high expression efficiency of TEV endopeptidase
  - Establishment of manufacturing process of cell lines with high expression efficiency of TEV endopeptidase and Enterokinase
  - Establishment of isolation and purification process of TEV endopeptidase and Enterokinase
  - Establishment of 20 L-scale culture and purification process and completion of optimal production order)
4. Improvement of antibody production in transgenic cell suspension culture
- Construction of siRNA of amylase and Cys protease gene in plant expression vector and rice transformation
  - Selection of transgenic plants and molecular biological analysis of target genes
  - Analysis of function of purified antibodies from rice cell suspension culture
  - Establishment of large scale production and purification system of antibody proteins in rice cell suspension culture.
5. Development of technologies to enhance the efficacy of oral vaccine and to assess the efficacy of vaccination
- Analyses of peptides and proteins involved in M cell differentiation
  - Analyses of immune response of peptides and protein
  - Analysis of cytokine induction by antimicrobial peptide in mouse intestinal mucosal immune system
  - Analysis of protein pattern secreted by M cells in vitro M cell model
  - Production of model antigen and antimicrobial peptide
  - Analysis of the action mechanism of antimicrobial peptide on specific cell populations in intestine
  - Production of protein produced in differentiating M cells
  - Ex vivo analysis of antigen delivery by antimicrobial peptide
  - Analysis of efficacy of oral immunization by using experimental animal
  - Analysis of acting point of candidate peptides
  - Analysis of the effect of proteins involved in M cell differentiation
  - Confirmation of the efficiency of model antigen delivery by proteins involved in M cell differentiation

- Characterization of immune response induction by oral administration of transformants
  - Analysis of efficacy of mucosal immunization by peptide and M cell differentiation protein in experimental animal
6. Construction of seed- and root-specific promoters and vectors for high efficient gene expression
- Construction and transformation of plant transformation vector system for high production of myelin protein
  - Construction of plant transformation vector using chemical-inducible promoter
  - High-throughput screening of new seed- and root-specific promoters using analyses of microarray data and RT-PCR
  - Development of seed- and root-specific expressing promoters
  - Expression analysis of seed-specific expression vectors in soybean and maize seeds and development of expression vector systems
7. Development of a rice with customized N-glycan structure
- Development of a new plant host producing glycoprotein without immunogenic  $\beta$  1,2-xylose and  $\alpha$  1,3-fucose by using *gnt1 (cg)* mutant or  $\beta$  1,2-xylosyltransferase and  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase knockout strategy
  - Analysis of N-glycan structure by using Con A, HRP-,  $\alpha$  1,3-fucose- and  $\beta$  1,2-xylose-antibodies.
  - Construction of binary vector system for glycoprotein overexpression using strong tissue specific promoter and signal sequence.
  - Construction of target (glucocerebrosidase, PNGaseA) expression vector, Agrobacterium mediated transformation and establishment of highly expressed lines.
  - Screening of plant ER-stress signaling, unfolded protein response (UPR) regulator
  - Molecular characterization of the UPR genes
  - Development of glycoprotein overexpression and quality control (QC) techniques the UPR genes
  - Development of affinity tag (vector) for the glycoprotein purification
  - Development of efficient purification system
  - Analysis of N-glycan structure by using MALDI-TOF/MS
8. Development of cellular tools for high level protein production in plants
- Analysis of Arabidopsis 5'-UTRs to identify level translational efficiency
  - Elucidation of the mechanism of translational efficiency determination by 5' UTR
  - Exploration of the possibility of designing an stress inducible vector with a 5'-UTR enhancer
  - Generation of various expression vectors with a 5' UTR enhancer to test the efficiency of 5'-UTRs

- Identification and characterization of translation factors
- Generation of cellulase expression vector
- Generation of high level expression vector targeting signal sequence with targeting signals
- Cellulase expressing plant generation
- Cellulase expression test and animal test

#### IV. Research/development results

##### 1. Development of transgenic plant expressing antigen proteins against PEDV.

For development of transgenic plant against porcine epidemic diarrhoeal disease as edible vaccine, the COE and SID genes containing epitopes of Porcine epidemic diarrhoeal virus spike protein, which were fused with cholera toxin B subunit, LTB, and Col as ligands to improve uptake of antigen proteins into mucosal immune systems, were expressed under the rice amylase 3D promoter expression systems in transgenic rice cell suspension culture. The IgG and IgA antibodies against antigen proteins were elicited in orally administrated mouse. The protection against virus challenge were observed in piglet from immunized pigs by orally administrated with LTB-COE fusion antigen proteins. The seeds from transgenic plants showing 1-2 copies of target gene were germinated and cultured. Some plants with fertilization and showing normal phenotype were observed and their seeds were harvested.

##### 2. Development of new tobacco variety producing the vaccine against grouper nodavirus infection

The coat protein gene was codon optimized in plant expression system and subsequently subcloned into TIA::RcpGAH, chloroplast transformation basic vector. The gene was introduced into plastid genome by the bombardment method. All transgenic tobacco plants were confirmed by gDNA PCR, RT-PCR, and Western blot methods. Three independent transgenic lines expressing high level of recombinant protein were selected and kept for further studies. After extracting total RNA from brain, spleen, and kidney of infected groupers, Nodavirus coat protein gene was obtained through cloning and expression test. Pure virus particles were isolated for the challenging test. Antibody was prepared against the recombinant protein purified from *E. coli*. For antibody formation, CM-chitin that has been known as an adjuvant was used for fish feed formulation. Moreover, the experiment has been conducted to check whether CM-chitin was effective as an adjuvant in mouse and grouper. After a diet rejection test, the optimal tobacco plant-based source formulae in fish flake has been developed to discover the effect of food reaction depending on vegetable flake content among grouper that usually has fed animal flake. The effective antibodies has been statistically induced by feeding of antigens in both mouse and grouper fries. The final vectors harboring Noda gene pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP, and pTRAc-ERH were generated and then introduced into *Agrobacterium* GV3101 for the infiltration and vacuum inoculation methods. Optimal conditions for the high protein level expression been

established by improving infiltration method such as silwet concentration, vacuum pressure, vacuum time, sampling timing, sampling days, and etc.

### 3. Development of new rice variety producing the recombinant industrial enzymes

For development of transgenic plant new rice variety producing the recombinant industrial enzymes, the TEV endopeptidase and human Enterokinase light chain genes were expressed under the rice amylase 3D promoter expression systems in transgenic rice cell suspension culture, respectively. Secretion of TEV endopeptidase and human Enterokinase light chain into the culture medium was achieved by using the existing signal peptide. Proteolytic activity of the rice-derived TEV endopeptidase and human Enterokinase light chain were confirmed and were similar to that of the commercial bovine-produced trypsin and recombinant Enterokinase light chain, respectively. SOP for culture of cell lines with high expression efficiency of TEV endopeptidase and Enterokinase were established.

### 4. Improvement of antibody production in transgenic cell suspension culture

For improvement of antibody production in transgenic rice cell suspension culture, siRNA of amylase and cys protease was constructed and transformed together with antibody genes into rice embryogenic callus. The secreted amylase and cys protease were reduced in the rice suspension culture medium and the production of antibodies were improved. The purified plant-produced monoclonal antibodies inhibited the binding of *P. gingivalis* to saliva-coated hydroxyapatite beads, as well as the invasion of oral epithelial KB cells due to the bacterium. The antibodies enhanced the intracellular killing of *P. gingivalis* by polymorphonuclear neutrophils. These results suggest that FimA-specific monoclonal antibodies produced in a rice suspension culture were easily purified and biologically active against *P. gingivalis*, and thus may be used for passive immunization to prevent *P. gingivalis*-induced periodontal disease.

### 5. Development of technologies to enhance the efficacy of oral vaccine and to assess the efficacy of vaccination

Among the vaccination protocols, oral mucosal vaccine confers feasibility and efficacy in vaccination because it could induce the efficient antigen-specific systemic and mucosal immune responses. However, this method imposes restrictions such as difficulty in antigen delivery and poor immunogenic environment. To overcome these, many studies have been concentrated to develop effective mucosal vaccine adjuvants. In this study, to develop the effective mucosal vaccine adjuvants, we found that 1) antimicrobial peptide LL-37 can act as mucosal adjuvant through enhanced antigen delivery, dendritic cell maturation, and chemotactic effect by FPR-2 on M cells and subepithelial dome and 2) C5aR which is especially expressed on apical surface of human and mouse M cells can play a role as mucosal target receptor by C5aR targeting ligand including OmpH of *Y. enterocolitica* in mucosal oral vaccine model.

## 6. Construction of seed- and root-specific promoters and vectors for high efficient gene expression

For develop useful promoter system, novel seed- and root-specific promoters were searched by analyses of microarray data and RT-PCR. A total of 37 seed-specific promoters have been analyzed, and their transient expressions were assayed using soybean and maize seeds. Three patents in the fourth year and three others in the fifth year have been applied, and subsequently, of these, two patents have been registered.

## 7. Development of a rice with customized N-glycan structure

Customized N-glycan producing plants that can be used to improve delivery and overcome viral contamination of biopharmaceuticals have been developed. These plants can be applied to produce biopharmaceuticals including  $\beta$ -glucocerebrosidase an enzyme used to treat 'Gaucher disease' in a safe and effective manner.

## 8. Development of cellular tools for high level protein production in plants

In this project, we aimed to develop cellular tools for high level protein production in plant cells so as to develop plant cells as a protein production system. Protein production depends on many steps starting from the gene expression to the targeting of proteins to a subcellular organelle. Of these multiple steps, we mainly focused on two steps, the translation of mRNA and distribution of proteins to various subcellular organelles after translation because the gene expression has been extensively studied. From this study, we found that the 5'-untranslational region of mRNA had profound effect on translation efficiency; the difference in the translational efficiency was as high as 1000 fold between good 5'-UTR and poor 5'-UTR. We generated expression vectors using a good 5'-UTR in combination with the good ER targeting signal or a good transit peptide of chloroplast proteins. In addition, we investigated the mechanism of protein trafficking through the endomembrane compartments and also protein targeting mechanism to chloroplasts and mitochondria. We identified various protein factors involved in protein trafficking through the endomembrane compartments and investigated their action mechanisms. In addition, we also elucidated the sequence information encoded by the transit peptide and presequence of chloroplast and mitochondrial targeting, respectively. Furthermore, we showed how AKR2A plays a role in protein targeting to chloroplast outer membrane. With these findings, we will attempt to express proteins to high levels for the purpose of commercialization. In particular, we are trying to express swine fever viral protein and haemagglutinin of H5N1 virus to high levels to develop as vaccines. The findings we made in this study will be the foundation for the plant biotech in particular for the molecular farming.

## V. Application of Developed Techniques

### 1. Development of transgenic plants expressing antigen proteins against PEDV.

The expression of antigen proteins against porcine epidemic diarrheal disease were confirmed and transgenic plants as elite lines showed the fertilization and normal growth. Plant produced antigen proteins elicited IgG and IgA antibodies against antigen proteins in orally fed mouse and showed the protection against virus challenge in piglets from immunized pigs by orally administrated. These results showed the feasibility of transgenic plants expression antigen proteins as plant-based edible vaccines. These results can be applied for other diseases of other animals as well as human diseases.

### 2. Development of new tobacco variety producing the vaccine against grouper nodavirus infection

Transgenic crops market has an attention of high value-added business because of its high bio-technology and high-value of patents. Since breeding or industrialization of transgenic crops is assumed to be possible in Korea, it is possible to obtain the patents covering various promoter sources that increase expressions of the effective protein in the transgenic crops. The target of vaccine could be diffused to various diseases of fishes because it is possible to engraft the experiment result to various diseases of fishes. The transient expression systems provide effective method to produce the interest recombinant proteins in tobacco plant, and can be applied to other edible plants.

### 3. Development of new rice variety producing the recombinant industrial enzymes

We have demonstrated that transgenic rice cell culture can be used as an alternative platform for the production of functional recombinant industrial enzymes such as TEV endopeptidase and Enterokinase. It is expected that this rice suspension culture system with rice 3D  $\alpha$ -amylase promoter will be widely used as production systems for other useful recombinant proteins.

### 4. Improvement of antibody production in transgenic cell suspension culture

The introduction of RNA interference with amylase and cys protease into rice cell suspension culture system showed the reduction of secreted amylase and cys protease as well as the improvement of antibody production. The purified plant-produced monoclonal antibodies have biological functions against infection of *P. gingivalis*. It is expected that this rice suspension culture system with reduction of amylase and cys protease will be widely used as production systems for other useful recombinant proteins.



5. Development of technologies to enhance the efficacy of oral vaccine and to assess the efficacy of vaccination

We found that antimicrobial peptide LL-37 and targeting of antigen to C5aR can be used as mucosal vaccine adjuvants and expect that this technology can be applied to develop various vaccine candidates against other pathogen antigens. In addition, understanding the action mechanism of C5aR and TLR interaction in pathogen infection will give the important clue to develop the pharmaceutical agents to coup against the infections.

6. Construction of seed- and root-specific promoters and vectors for high efficient gene expression

Promoters developed have been applied for patents. Promoters recombined in combination of specific elements will be applied for the tissue-specific gene expression in plants and are effective in development of high efficient protein expression system.

7. Development of a rice with customized N-glycan structure

The development of the core technology for customized N-glycan structure to optimize efficacy and delivery of biopharmaceuticals can be applied to the production of biopharmaceuticals. The core technology can also be applied to the production of biopharmaceuticals used for rare congenital metabolic disorder contributing development of domestic pharmaceutical industry.

8. Development of cellular tools for high level protein production in plants

In this study, we wanted to develop tools for high level protein production in plants as one of fundamental technologies in developing plants as a protein production system. We focused on the translation step which is the final step in production of proteins from genes, and subsequent targeting to various subcellular organelles to develop tools for high level protein production. We studies the detailed mechanisms of how translational efficiency is determined and how nascent proteins are targeted to various organelles and applied these findings to generate expression vectors. Therefore, we think that the technology developed in this study can be used to express a variety of high valuable proteins in plants. Indeed, we are currently testing how these findings can be applied to express at high levels swine fever viral protein and HA proteins of H5N1 influenza virus.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction	22
Chapter 2. Present status of related R&D in domestic and foreign countries	43
Chapter 3. Contents and results of the research	56
Chapter 4. Degree of achievement against research goal and impact on other research areas	518
Chapter 5. Plan for utilization of results of the research	563
Chapter 6. Information of science and technology of foreign countries	576
Chapter 7. Status of research equipment	584
Chapter 8. References	585

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	22
제 1 절 연구 개발의 목적	22
제 2 절 연구 개발의 필요성	25
제 3 절 연구 개발의 범위	35
제 2 장 국내외 기술개발 현황	43
제 1 절 국외의 기술동향 및 수준	43
제 2 절 국내의 기술 동향 및 수준	51
제 3 절 국내외 관련 시장 현황	52
제 4 절 정책 및 제도 현황	55
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	56
제 1 절 연구 개발 수행 내용	56
제 2 절 돼지질병 예방을 위한 비 식품종 개발	87
제 3 절 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 식품종 개발	170
제 4 절 재조합 산업용 효소 생산 식품종 비 개발	215
제 5 절 식물세포배양을 이용한 항체 대량생산 및 기능분석 연구	293
제 6 절 경구백신 효율증진 방안 및 백신 효능 검정 연구	331
제 7 절 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	380
제 8 절 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 비 식품종 개발	416
제 9 절 식물세포에서 단백질 고축적 기술 개발	454
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	518
제 1 절 연구 목표 달성도	518
제 2 절 관련 분야에의 기여도	561
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	563
제 1 절 연구 개발 성과	563
제 2 절 성과 활용 계획	573
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	576
제 1 절 연구관련 해외과학기술 수집현황	576
제 7 장 연구시설·장비 현황	584
제 8 장 참고문헌	585

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구 개발의 목적

### 1. 연구개발의 최종 목적

#### 가. 연구개발의 최종 목적

본 연구는 가축 및 어류의 질병 예방을 위한 식물 경구 백신, 재조합 산업용 효소, 치주질환 예방을 위한 항체단백질을 생산하는 식물형질전환 식물체를 개발하고 기반기술로써 점막면역계에서 면역 증진을 위한 경구백신 효율 증진 및 효능 기술 개발, 식물에서 재조합 단백질의 발현 증진을 위한 프로모터 개발, 고효율 번역 인자 기능 분석 및 개발, 식물 특이적 면역원성을 제거한 당 단백질 생산 숙주 개발을 하여 형질전환 식물체를 이용한 고부가가치 단백질 생산 기술 및 시스템을 개발하고 고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물의 개발을 통한 신제품을 개발하여 국내 농업분야의 고도화를 추진하고자 한다.

#### 나. 연구과제 세부목표

- 돼지유행성 설사병 예방을 위한 비 신제품 개발
- 어류 노다바이러스 어류경구백신 형질전환 담배 개발
- 산업용 효소 생산용 형질전환 비 개발
- 식물세포 배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석
- 경구백신 효율 증진 기술 및 효능 검정 기술 개발
- 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 제작
- 식물체에서의 고효율 단백질 발현 시스템 확립
- 면역성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 비 개발

#### 다. 연차별 목표

##### (1) 1차년도 목표

##### (가) 제 1 핵심과제

- 식물에서 돼지설사병에 대한 항원단백질과 점막체계에서 항원의 흡수를 증진시키기 위한 ligands의 융합항원단백질 발현을 위한 식물발현벡터의 제작 및 비의 형질전환
- 어류 노다바이러스 캡시드단백질 유전자가 도입된 색소체 형질전환 담배 생산
- TEV endopeptidase 생산 비 개발 완료

##### (나) 제 2 핵심과제

- 고효율 번역인자의 개발을 위한 translational factor들의 기능 분석
- 자가면역억제단백질(미엘린) 생산을 위한 식물 형질전환용 벡터 시스템 구축 및 형질전환

- 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 호스트 (세포 및 식물체) 개발
- 실험동물 소장 점막면역계의 항 펩타이드에 의한 cytokine 유도 특성 분석, *In vitro* M cell model에서 M cell이 분비하는 단백질 pattern 분석, 표지항원 및 항 펩타이드 확보

## (2) 2차년도 목표

### (가) 제 1 핵심과제

- 형질전환 벼 재분화, homoline 선발 및 분자생물학적 분석
- 색소체 형질전환 담배 T<sub>1</sub>세대 검정 및 항원단백질의 항원성 검증
- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 (homoline 구축) 및 현탁세포 확립

### (나) 제 2 핵심과제

- 고효율 inducible 5' UTR 이용 발현 vector 개발과 translational initiation factor들의 활용 기술 개발
- 형질전환 벼와 당근에서의 자가 면역억제 단백질(미엘린) 단백질 과발현 확인
- 당 단백질의 고 발현용 binary vector 시스템 및 target 당 단백질 발현 형질전환체 구축 [벼, 애기장대]
- 항 펩타이드가 장내 특정 세포 그룹에 작용하는 기작 분석, M cell 분화시 분비되는 확인된 단백질을 확보, 항 펩타이드의 항원전달 능력을 *ex vivo*에서 분석

## (3) 3차년도 목표

### (가) 제 1 핵심과제

- 발현이 확인된 callus 대량생산 후 항원단백질에 대한 실험동물에서 면역반응유도능력을 확인, 선발된 homoline 이용 농업형질 검사 및 환경 위해성 평가
- 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 안전성 검토
- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line에 대한 농업형질 조사
- 식물유래 TEV endopeptidase에 대한 생화학적 특성 분석 및 TEV endopeptidase 고생산 세포주의 cell bank 구축
- 식물세포 현탁배양에서 amylase와 protease의 발현 억제를 이용한 항체단백질의 발현 증진

### (나) 제 2 핵심과제

- cellulase 발현용 vector 구축 및 고발현 vector 개발
- 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발
- 당 단백질의 발현량 증가 및 단백질 quality control 기술 개발 [벼, 애기장대]
- 대상 peptide의 작용점 분석, M cell 분화 단백질의 M cell 분화에 미치는 영향 분석, M cell 분화 관련 재조합 단백질에 의한 표지항원의 전달 능력을 확인, 형질전환체의 경구투여에 의한 면역반응 유도특성 확인

#### (4) 4차년도 목표

##### (가) 제 1 핵심과제

- 농업형질 검사 및 확인된 종자 이용 실험동물 면역성 확인
- 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 안전성 검토
- TEV endopeptidase 고생산 세포주 제조공정 확립 및 TEV endopeptidase에 대한 분리·정제 방법을 확립
- 식물세포 현탁배양에서 분리된 항체 단백질의 기능 분석

##### (나) 제 2 핵심과제

- Cellulase 고발현 형질전환 벼 개발 및 특성 연구
- 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발
- 생산 단백질 분리 기술 개발, 식물 호스트, 생산 단백질의 glycosylation, 활성, 안전성 분석 [벼, 애기장대]
- 실험동물을 이용하여 펩타이드 및 M cell 분화 단백질 적용에 의한 점막면역 반응 유도 특성 확인, 형질전환체의 경구투여에 의한 면역반응 유도특성 확인

#### (5) 5차년도 목표

##### (가) 제 1 핵심과제

- 농업형질 검사된 벼를 이용하여 목적 동물인 돼지에서 면역성 확인 및 유행성 설사병에 대한 방어능력 확인하고 품종 등록 추진
- 형질전환 담배의 품종 보호 출원 및 등록
- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line에 대한 특허출원 및 품종 등록 이행 및 TEV endopeptidase 고생산 세포주 제조공정의 scale-up
- 항체 단백질 고발현 식물체 선발 및 대량생산을 위한 조건 확립

##### (나) 제 2 핵심과제

- Cellulase 고발현 형질전환체 homoline의 확립 및 역가확인
- 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발
- 고부가가치 당 단백질 발현 형질전환 식물체의 특허 출원, 신품종 등록 및 산업화 추진 [벼, 애기장대]
- 실험동물을 이용하여 펩타이드 및 M cell 분화 단백질 적용에 의하여 유도되는 점막면역 반응에서의 세포 반응 특성 분석, 형질전환체의 경구투여에 의한 면역반응 유도특성 확인

## 제 2 절 연구 개발의 필요성

### 1. 사업단 연구 개발의 중요성 및 필요성

- 생물산업은 정보산업과 더불어 21세기 지식기반사회의 양대 축을 형성하며 빠르게 성장하는 대표적 산업군으로서 의약, 환경, 농업, 식품 등에서 고부가가치 제품들을 양산해 내고 있다. 생물산업의 여러 제품들 중에서 단백질제품은 총 생물산업 규모의 약 60% 정도를 차지하고 있어 생물산업 발전의 핵심 또는 견인차 역할을 하고 있으며, 향후 단백질제품이 차지하는 비율은 더욱 증가할 것으로 추산되고 있다.
- 인간을 포함한 각종 동식물, 미생물의 유전체 서열이 각종 genome project를 통하여 속속 밝혀지고 있고, 이와 더불어 의약용 및 산업용으로 유용한 새로운 단백질들은 계속 발굴되어 가고 있다. 특히 단백질 의약품 시장은 전세계적으로 기하급수적 증가 추세에 있는데, 지난 20여 년간 interferon, insulin, EPO 등과 같은 세포조절 단백질 등을 포함하여 90여종의 생물의약품이 개발, 판매되고 있으며, 현재 350개 이상의 새로운 제품이 임상 I~III 상 단계의 개발단계에 있다.
- 이러한 단백질 의약 제품들의 개발을 위해서는 게놈과제 등을 통한 새로운 단백질의 발굴 뿐 아니라, 구조적 정보를 활용하여 신기능 단백질을 제조하는 단백질 공학적 기술개발 및 생체내에서 단백질의 기능을 활성화시키기 위한 단백질 가공(processing 및 modification) 또는 그와 관련된 효소의 개발 및 단백질 생산기술개발에도 많은 연구가 집중되고 있다.
- 현재까지의 의료용 단백질 생산은 미생물 또는 동물세포 배양에 의존하여 왔으나 식물세포 배양에 의한 생산기술이 확립되고 현재 hGM-CSF, CTLA4 등과 같은 일부 품목에서는 생산기술이 개발되어 현재 전임상 단계에 있으므로 향후 식물세포배양에 의한 재조합 단백질의 생산기술로서 주목받고 있다.
- 일반적으로 대부분의 의료용 단백질은 post-translational modification에 의하여 활성이 좌우되는데, 미생물의 경우 이러한 modification system이 진핵세포와 다르기 때문에 생리활성을 지닌 단백질 생산이 불가능한 경우가 많으며, 이러한 경우에는 동물세포 배양에 의하여 단백질을 생산하여야 하나 동물세포 배양의 경우 동물바이러스 감염에 의하여 의료용 단백질이 감염될 우려가 있는 등의 문제가 해결되고 있지 않은 실정에서 보다 안전한 단백질 생산 시스템으로서 식물발현시스템이 주목을 받기 시작하고 있다.
- 유전자 조작 기술과 식물형질전환 기술의 발달로 형질전환 식물체에서 외래 단백질 생산이 가능하게 되었으며 치료용 단백질인 human Insulin이 담배 식물체에서 발현(1983년도)되는 등 여러 식물체에서 형질전환기법이 확립되었으며 식물체를 유용단백질이나 효소를 생산하기 위한 bioreactor로 이용하기 위한 연구들이 진행되고 있으며 현재 의료용으로 허가된 것은 secretory antibody vaccine 외 4종이며 20여개가 임상실험 중으로 특히 이스라엘 회사인 Protalix Biotherapeutics가 Gaucher병의 치료제인 gluconocerebrosidase를 임상 3상 실험 중으로 2-3 년내에 식물유래 의료용 치료제의 출현이 기대된다.

- 이러한 예를 통해서 식물세포에서 외래 단백질의 다량발현이 실현되면 고부가가치의 의료용 단백질, 동물 사료, 백신, 식물 경구 백신, 산업용 단백질의 대량생산이 가능하며, 특히 식물세포를 이용하면 저비용으로 다양한 단백질의 생산이 가능하여 동물세포배양에 비하여는 약 1/30, 미생물 발효에 비하여 약 1/3의 비용이면 가능하다는 것이 검증 되었다.
- 식물세포에서 가능성이 높다고 판단되는 단백질로는 다양한 병원체에 대한 백신용 단백질 (경구백신), 의료용 단백질 및 산업용 단백질 등으로 판단이 된다.
- 식물세포 배양을 통한 유용단백질 생산 기술은 신기술 분야에 속하며, 우리나라에서는 본 기술의 중요성을 다른 선진국과 비교하여 빨리 인식하여 세계적으로도 본 최신기술의 국내 정착과 함께 식물세포배양을 이용한 단백질생산 기술에서 국제적인 경쟁력을 확보하고 있으므로 지금까지의 연구결과를 활용하여 재조합 단백질의 생산이 불가능한 기술을 확립함으로써 난발현성 단백질 생산 분야에서의 기술적 우위를 점할 수 있다.
- 고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물 개발 관련 연구분야는 분자생물학, 유전체학, 유전학, 육종학, 단백질체학, 분리정제 및 생산공정 등의 다양한 분야의 전문지식이 요구되고 있으나 그동안 국내외적으로 관련 분야의 연구추진은 산발적으로 진행되어왔기 때문에 연구결과의 직접 산업화への 적용이 어려운 실정이다.
- 위에서 언급한 다양한 가능성에도 불구하고 아직 식물유래 단백질 및 vaccine의 생산에 대한 효용성에 대한 충분한 검증이 되지 않았으며 상업적으로 상품화 된 예가 없으나 이들을 저비용으로 대량 생산을 위한 활발한 연구가 진행되고 있으며 임상실험이 진행 중인 사례가 있다.
- 하지만 식물을 bioreactor로 이용하고자 하는 경우에 있어서 외래 단백질의 식물세포 내 발현수준이 매우 낮다는 어려움이 있으며, 따라서 이중단백질의 발현수준을 높일 수 있는 방법 개발, 당단백질의 당수식의 인간화 등 몇 가지의 기술적 개발이 분자농업의 경제적 활용 측면에서 필수적이다..
- 선진국에서는 다양한 벤처기업들이 활발히 연구 및 생산을 시도하고 있으며 이들 중에서 대표적인 벤처기업으로 Sembiosys (<http://www.goodmedia.com/equicom/sembiosys/Index.aspx>) 와 Medicago (<http://www2.medicago.com>), Biolex사 (<http://www.biolex.com>) 및 Prodigene (<http://www.prodigene.com>) 등이 있다.
- 따라서, 그 동안 산발적으로 진행되어온 식물을 이용한 고부가가치 단백질 생산과 관련한 국내의 연구결과를 통합하고 이를 이용하여 산업화가 가능한 고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물개발과 상용화를 강하게 추진 할 사업단(클러스터)의 구성이 매우 절실한 상황이다.
- 본 연구사업단은 고부가가치 단백질 생산을 위한 작물개발 기술이 우리나라 농업을 고부가가치 지식산업으로 유도하기에 적합한 기술로서 판단하여 첨단 식물 생명과학 기술을 농업에 적극적으로 도입, 활용 할 필요가 있으며, 국내 농업의 발전을 위하여 다양한 고부가가치 작물 개발이 필요하고 개발된 기술과 신제품 보급으로 농업의 새로운 소득의 창출이 가능한 분야로서



기존에 우수한 연구결과를 확보하고도 상용화를 위한 종합적인 기술개발의 미비로 인하여 상용화가 되지 못한 국내의 연구결과를 통합하고 첨단 생명공학/유전체/단백질/면역 연구기술을 접목하여 산업화가 가능한 고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물개발과 상용화 목적으로 구성하게 되었다.

- 본 사업단에서 일차적인 목표는 고부가가치 단백질을 생산하는 형질전환식물체의 개발에 대한 것으로 사업개발 기간 내에 산업화가 가능한 고부가가치 단백질 생산용 작물개발과 이에 생산된 단백질 효능의 확인 위한 것이고 확인된 결과를 토대로 전임상/임상실험은 실험에 소요되는 기간과 규모를 고려할 때 사업단에 이루어진 성과를 토대로 하여 과제완료 후에 다른 과제에 편성하여 시작하여야 할 것으로 본다.

## 2. 세부과제별 연구의 필요성

### 가. 제 1 핵심 연구 과제 수행의 필요성

- 인간을 포함한 각종 동식물, 미생물의 유전체 서열이 각종 genome project를 통하여 속속 밝혀지고 있고, 이와 더불어 의약품 및 산업용으로 유용한 새로운 단백질들은 계속 발굴되어 가고 있다.
  - 특히, 단백질 의약품 시장은 전세계적으로 기하급수적 증가 추세에 있는데, 지난 20여 년간 interferon, insulin, EPO 등과 같은 세포조절 단백질 등을 포함하여 90여종의 생물약품이 개발, 판매되고 있으며, 현재 350개 이상의 새로운 제품이 임상 I~III 상 단계의 개발단계에 있다.
  - 또한, 식물체를 이용한 경구백신의 개발 연구의 경우 인간의 HBV 경구백신이 미국에서 임상 3상 단계에 진입하는 등 활발한 연구가 수행되고 있다
  - 이러한 단백질 의약, 경구백신 및 고부가가치 산업용 단백질 제품들의 개발을 위해서는 게놈과제 등을 통한 새로운 단백질의 발굴뿐 아니라, 구조적 정보를 활용하여 신기능 단백질을 제조하는 단백질공학기술개발 및 생체내에서 단백질의 기능을 활성화시키기 위한 단백질 가공(processing 및 modification) 또는 그와 관련된 효소의 개발 및 단백질 생산기술개발에도 많은 연구가 필요하다
  - 본 제 1핵심과제에서는 지금까지 참여 연구팀이 수행하여 선행연구결과를 확보하고 있는 돼지 유행성 설사병 예방 경구백신, 어류경구백신 및 산업용 고부가가치 효소 생산을 위한 작물개발 연구를 기획하였으며, 각 연구에 대한 구체적인 필요성은 다음과 같다.
- (1) 돼지 유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발 (제 1핵심 제 1 세부과제: 전북대학교)
- 돼지 유행성 설사병 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV)는 포유자돈 및 육성돈을 비롯한 모든 연령의 돼지에 설사를 일으키며 포유자돈의 경우 25%에 달하는 폐사율을 나타낸다.

- 돼지유행성설사병(PED)는 전염성위장염(Transmissible gastroenteritis; TGE)과 같은 종류의 바이러스 전염병으로서 1970년대부터 유럽지역에서 발생이 보고되었으며, 우리나라의 경우 자돈의 설사병에 이완되어 폐사율 50%이상의 피해를 나타낸바 있다.
- 그럼에도 불구하고 상용화된 백신도 PED발생에 효과적이지 못해 보다 진보된 예방 백신의 도출이 절실한 실정이다.
- 또한, 유행에 따른 TGE와 같은 수준임에도 불구하고 예방백신의 개발이 곤란하였던 점은 병원체인 PEDV의 배양이 어려운 점과 유효 항원의 적절한 발현체 개발 및 유효항원의 면역원성 증강에 대한 적절한 연구가 이루어지지 못한 것이 사실이다.
- 더욱이 PEDV에 대한 형질전환 식물체 이용 경구백신 개발의 경우 낮은 항원 단백질의 발현으로 유효한 점막면역과 전신 면역을 유도할 수 없어 항원 발현의 증가나 면역반응을 증가시킬 수 있는 형질전환 식물체의 도출이 절실히 필요한 실정이다.
- 따라서, 본 연구과제에서는 이러한 PEDV의 유효 항원의 면역 반응을 증가, 특히 점막면역을 증가시킬 수 있는 형질 전환 식물체를 제작하여 현장 적용이 가능한 PED발생 예방 접종법을 개발하기 위함이다.

(2) 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 신품종 개발 (제 1 핵심 제 2세부과제: (주) 젠다스)

- 능성어류는 국내에서 양식이 되지 않는 어종으로 해수어중 최고급, 최고가의 어종중의 하나이다. 특히 제주도 인근해역에서만 포획되는 능성어류인 자바리 (일명 다금바리)는 그중에서도 가장 고가이면서 귀한 어종으로 널리 알려져 있다. 그러나 아직까지 국내에서는 능성어류에 대한 상업적 양식은 이루어지지 않고 있다.
- 이러한 이유는 능성어류에 대한 전반적인 이해가 부족한 것도 기인하지만 무엇보다도 능성어류에서 가장 치명적인 질병중의 하나인 바이러스성 신경괴사증 (viral nervous necrosis, VNN)에 의한 자·치어의 피해에 있다고 할 수 있다 (Munday & Nakai 1997). VNN은 해수어 노다바이러스 (nodavirus)의 감염으로 인한 질병으로써 1990년대 후반부터 해산어 종묘생산장에 치명적인 피해를 입히고 있는 질병으로 돔류, 능성어류, 범가자미류, 넙치 등의 어종에서 발병되고 있으며 어류가 이 질병에 감염될 경우 높은 폐사율을 나타내므로 큰 피해를 입히게 된다.
- 최근 국내 양식장에서 바이러스 질병실태 조사를 한 결과 능성어, 돔류, 넙치에서 이 질병으로 인한 폐사가 발생된 것으로 확인되었다. 병어는 힘없이 유영하거나 선회 등의 비정상적인 유영행동을 보이며, 쇠약해지면 양식장 바닥에 가라앉아 폐사하게 된다. 노다바이러스 감염은 주로 부화 후 15-30일령의 어체에서 발생되어지며 이 바이러스에 의한 감염증은 황점볼락, 홍민어, 조피볼락 및 능성어에서도 확인되어지고 있다 (Kim et al., 2001; Oh et al., 2001; Oh et al., 2000; Sohn et al., 1998; Ishima et al., 1994).
- 특히 성장 초기 단계의 자·치어 시기에 치사성이 매우 높게 나타나는 것으로 보고되어지

고 있고 병어는 양어장 표층을 힘없이 유명하거나, 회전유영을 특징적으로 보이며, 그 후 쇠약해지면 양어장 바닥에 가라앉아 폐사하게 된다. 이 질병은 외관상으로는 특별한 병변을 나타내지 않는 경우가 많으나 때에 따라서는 체색흑화 및 척추의 이상이 보여지는 경우도 있다. 조직학적으로는 뇌 및 망막 조직의 세포에 괴사 및 붕괴에 의한 큰 공포를 형성시키는 특징을 가지고, 그러한 세포의 세포질 내에서 소형의 바이러스 입자가 고밀도로 모여 있는 것을 확인 할 수 있다.

- 노다바이러스는 어미로부터 난을 통하여 자·치어에 수직감염되기 때문에 친어로 사용할 어미에서 바이러스 감염 유무를 확인하여 원인 바이러스에 감염되지 않은 어류를 친어로 사용하는 것이 가장 효과적인 예방법이다. 종묘 생산장에 바이러스성 신경괴사증이 발생하였을 경우 대부분 전멸하므로 이 증상이 확인되는 즉시 배양수조의 소독을 실시하고 폐사어는 소각 또는 매몰하여 이 바이러스가 인근 해역으로 전파되는 것을 차단하여야 한다.
- 노다바이러스는 해수중에서 최장 60일 가량 생존이 가능하기 때문에 이 바이러스에 오염된 배출수를 통하여 원인 바이러스가 다시 양식장으로 유입될 수 있으므로 이 바이러스에 오염된 해수가 양식장으로 유입되지 않도록 주의를 하여야 하며, 또한 노다바이러스는 자외선에 의하여 불활화 되므로 종묘 생산장에서는 유입수를 자외선으로 살균하여 사용하는 것도 바이러스성 신경괴사증의 예방에 효과적이다.

(3) 재조합 산업용 효소 생산 신품종 벼 개발 (제 1핵심 제 3세부과제: (주) 엔비엠)

- 현재까지 알려진 trypsin, thrombin, factor Xa, TEV protease 등을 중심으로 하는 단백질 분해효소 종류는 의약품 및 산업용 단백질 소재로서 직접 활용이 되기도 하지만 다른 단백질의 기능 활성을 위한 단백질 processing에 반드시 필요로 하는 효소이기 때문에 그 수요가 증가함에도 불구하고 효소의 특성상 숙주세포의 생육을 억제 또는 괴사시키는 관계로 생산에 제한을 받는 경우가 많다 (본 연구에서는 이러한 단백질을 “난발현성 단백질”로 정의함). 이러한 문제를 극복하기 위하여 숙주를 바꿔 재조합 단백질 생산을 시도하기는 하지만 아직도 유전자발현에 의한 재조합단백질의 생산이 불가능한 실정이다.
- Factor Xa, TEV protease 등의 활성부위 유전자를 대장균에 도입하여 재조합형태의 factor Xa, TEV protease가 생산 시판되어지고 있으나 이를 의약품제조를 위한 산업용 효소로서 사용하기에는 대장균의 endo-toxin의 제거가 필수적이어서 정제에 따른 비용 상승으로 인하여 매우 고가인관계로 사용이 활성화 되고 있지 못한 실정이다
- 주요 의료용 단백질인 thrombin, factor Xa, TEV protease 등은 동물세포에서 발현시키면 숙주세포의 사멸 또는 성장 억제가 일어나는 관계로 동물세포배양을 이용한 재조합단백질의 생산에 제약이 따르며, 동물세포에서만 생산이 가능한 단백질의 경우에도 동물 바이러스의 혼입에 따른 인간에의 2차감염의 우려가 있어 이를 극복할 새로운 생산시스템의 개발이 절실하며 식물세포배양 시스템은 이러한 대안이 될 것으로 판단된다.
- 형질전환된 식물을 이용한 의료용 단백질 생산기술이 중요한 이유로서, 현재 생명공학산업에서 유용물질 생산을 위한 기존의 생산체계 (미생물, 동물세포 배양)의 문제점을 보완한 대

체기술로서 의미가 크다고 하겠다. 일반적으로 대부분의 의료용 단백질은 post-translational modification에 의하여 활성이 좌우되는데, 미생물의 경우 이러한 modification system이 진핵세포와 다르기 때문에 생리활성을 지닌 단백질 생산이 불가능한 경우가 많다. 이러한 경우에는 동물세포 배양에 의하여 단백질을 생산하여야 하는 바 이러한 system은 아래와 같은 단점을 가지고 있다.

- 배지에 혈청을 첨가하기 때문에 배지가격이 매우 높다.
- 동물바이러스 감염에 의하여 의료용 단백질이 감염될 우려가 있다.
- 배지에 여러 종류의 단백질이 다량 존재하기 때문에 생산, 분비된 의료용 단백질의 분리 정제가 매우 어렵고 비용이 많이 든다.

- 식물을 통한 유용단백질 생산 기술은 신기술 분야에 속하며, 우리나라에서는 본 기술의 중요성을 다른 선진국과 비교하여 빨리 인식하여 세계적으로도 본 최신기술의 국내 정착과 함께 식물을 이용한 단백질생산 기술에서 국제적인 경쟁력을 확보하고 있으므로 지금까지의 연구결과를 활용하여 재조합 단백질의 생산이 불가능한 기술을 확립함으로써 난발현성 단백질 생산 분야에서의 기술적 우위를 점할 수 있다.
- 단백질 분해효소는 단백질 특성으로 인하여 동물세포에서 생산이 어려운 난발현성 단백질로 생체에서 유래한 제품을 사용하고 있으나, 바이러스 감염우려와 비용 때문에 의약용으로 사용하는데 한계가 있다. 트립신은 동물세포배양에 필수적으로 사용되고 있는데, 거의 bovine 유래로 의약용 단백질 생산에는 사용이 매우 제한적이며 식물세포는 세포구조상 그러한 효소들이 발현되어도 숙주세포에 영향을 주지 않아 식물유래 단백질 분해효소가 개발된다면 의약용, 산업용 단백질로 매우 유용하게 이용될 것이다.
- 저가·고효율 (최저 현 단가의 1/10 ~ 1/100 수준)의 난발현성 단백질에 대한 재조합 단백질의 국내 생산을 통한 관련 산업의 발전 촉진 및 첨단 핵심기술의 선점을 통한 국가 경쟁력의 확보가 가능하다.

(4) 식물세포 배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석 (제 1 핵심 제 2 세부과제: 전북대학교)

- 치주질환은 성인의 치아상실을 초래하는 가장 중요한 원인으로 65세에 이르기까지 성인인구의 90% 이상이 치주질환을 경험했거나 경험하고 있는 것으로 나타나 사람에서 가장 빈발하는 질환이다
- 치주질환은 red complex에 속하는 혐기성 그람음성간균인 *Porphyromonas gingivalis*와 *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*, *Tannerella forsythensis*)가 가장 중요한 원인세균이다.
- 미생물이 감염조직에 접근, 부착함으로써 시작되고, 숙주의 방어기전을 피하면서 성공적으로 개체수를 늘여 안정적인 집락을 형성하면 감염이 이루어지고 그 결과 질병이 유발. 따라

서 감염과정에 나타나는 어떤 단계라도 차단할 수 있으면 감염질환의 예방이 가능하다.

- 식물형질전환을 이용한 유용 단백질 생산에 대한 연구 초기에 치주균인 *Streptococcus mutans*에 대한 항체단백질이 생산되었고 최근에는 이에 대한 상용화가 추진되고 있다.
- 이러한 항체 단백질을 식물세포 현탁배양을 이용하여 생산, 배지내로 분비하는 식물 발현 시스템의 이용한 항체단백질의 생산 및 분리는 동물세포나 미생물에 비해 유리할 것으로 판단된다.

#### 나. 제 2 핵심 연구 과제 수행의 필요성

- 생명과학 분야에 있어서 20세기의 엄청난 발전은 세포의 다양한 구성 및 운영 원리에 대한 기초지식을 제공하였으며, 동시에 이러한 기초지식의 무궁무진한 활용 가능성에 대한 이론적, 기술적 바탕을 제공해 주었으며, 세포는 지금까지 인간이 개발한 어떤 종류의 기계나 생산 기법을 능가하는 가장 탁월한 생산 시스템이라 생각된다.
- 기존에 존재하는 세포의 활성을 바꾸어 목적에 맞게 필요로 하는 물질 (단백질이나 화합물)을 대량 생산하기 위해서는 다양한 방법으로 세포를 인위적으로 reprogramming 하여 인공 세포(artificial cell)로 만들어야 하며, 이를 위하여서는 첫째 목적하는 반응에 필요한 효소의 유전자 확보되어야 하며, 20세기 후반 및 21세기 초에 수행된 수많은 genome project들을 통하여 여러 종류의 미생물, 식물 및 인간의 전체 genome의 서열에 대한 정보를 확보함으로써 다양한 유전자를 무제한적으로 활용할 수 있게 되었으며, 또한 유전공학 기술의 발전을 통하여 test tube 내에서의 유전자의 evolution이 가능하여 더 강력하고 우수한 유전자를 만드는 것이 가능하게 되었다.
- 둘째는 세포의 유전자 발현과정 및 단백질 분배 시스템을 자유자재로 조절하여 발현된 단백질을 적당한 소기관으로 targeting하는 기술을 확보하는 것으로, 이러한 기술들을 이용하여 목적하는 새로운 활성을 제공할 수 있는 단백질의 유전자를 도입하여 세포를 목적에 맞도록 reprogramming하여 세포를 하나의 생산 시스템으로 활용할 수 있을 것이다. 세포를 생산시스템으로 활용하고자 할 때 가능성이 가장 높은 것은 세포를 reprogramming하여 의약품 및 산업용 단백질을 저비용으로 대량으로 생산하는 시스템을 구축하는 것이다.
- 유전자 조작 기술과 식물형질전환 기술의 발달로 형질전환 식물체에서 외래 단백질 생산이 가능하게 되었으며 최초의 치료용 단백질인 human growth hormone이 담배 식물체에서 발현되는 등 여러 식물체에서 형질전환기법이 확립되었으며 식물체를 유용단백질이나 효소를 생산하기 위한 bioreactor로 이용하기 위한 연구들이 진행된다.
- 이러한 예를 통해서 식물세포에서 외래 단백질의 다량발현이 실현되면 고부가가치의 의약품 단백질, 동물 사료, 백신, edible plant vaccine, 산업용 단백질의 대량생산이 가능하며, 특히 식물세포를 이용하면 저비용으로 다양한 단백질의 생산이 가능하여 동물세포배양에 비하여는 약 1/30, 미생물 발효에 비하여 약 1/3의 비용이면 가능하다는 것이 검증된다.
- 식물세포에서 가능성이 높다고 판단되는 단백질로는 다양한 virus 백신용 단백질, 의약품

단백질 및 산업용 단백질 등으로 판단이 된다.

- 하지만 식물을 bioreactor로 이용하고자 하는 경우에 있어서 외래 단백질의 식물세포 내 발현수준이 매우 낮다는 어려움이 있으며, 따라서 이중단백질의 발현수준을 높일 수 있는 방법개발이 분자농업의 경제적 활용 측면에서 필수적이다.
- 식물 당쇄 구조는 동물에서 만들어지는 당쇄 구조와 다름으로 식물에서 만들어지는 단백질의 당쇄 구조를 인간화된 당쇄 구조로 바꿈으로써 동물세포를 대용하는 재조합 당단백질 발현 시스템 개발이 필요하며, 따라서 식물 당단백질의 당쇄 구조를 목적에 따라 재구성 또는 제어함으로써 효능과 안전성을 극대화시킴과 동시에 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 기반기술의 개발이 절실히 요구된다.
- 또 다른 측면의 중요한 연구 중의 하나는 edible vaccine과 같은 점막면역 시스템에 대한 기초 연구의 필요성이며 지금까지의 연구 결과는 점막은 음식을 비롯한 여러 미생물 및 병원균이 접촉하는 접점부분이며, 대표적인 점막면역계인 장내 점막 면역계에서 항원 유입은 M cell을 통하여 주로 이루어지며, M cell 주변에는 dendritic cell, T cell 및 B cell이 존재하여 항원에 대한 IgA가 만들어지는데 이의 체외 분비를 통하여 방어면역 시스템을 유지하며, 점막면역 순환기 경로를 통해 전신 면역계에 항원을 전달하여 항원 특이적인 전신 면역반응도 유도한다는 것이 밝혀진다.
- 따라서, 점막 백신 중 한 가지 방법인 경구백신은 투여의 수월성과 더불어 점막면역 뿐만 아니라 전신 면역계에서도 항원 특이적 면역 반응을 유도 할 수 있어 차세대 백신기술로 간주되고 있으며, 경구면역 증진 방안으로는 백신의 성공은 강력한 면역반응의 유도과 밀접한 관계가 있으며, 주사용 백신에서와 마찬가지로 경구백신의 효율 증진을 위한 보조제가 필요하며, 백신 보조제는 첫째, 여러 물리적 혹은 화학적 자극들에서 백신물질이 오래 유지되어야 하며, 둘째, 백신이 점막면역 유도 조직까지 도달해야 하고, 셋째, 선천성 면역과 후천성 면역을 모두 유도할 수 있어야 한다.
- 최근 이용되는 화학합성물 혹은 독소를 이용한 점막 보조제 중의 일부가 질병유도의 가능성이 밝혀짐에 따라, 백신 적용 대상에 해를 끼치지 않는 보조제의 개발 연구 및 경구백신 효율 증진 방안 연구가 필요하며, 백신 적용의 실용화를 위해서는 최종 대상에 적용하기 전에 실험동물을 대상으로 하는 효능 검증 및 적용 실험의 수행이 필요하다.

(1) 경구백신 효율 증진 방안 및 백신효능 검증 연구 (제 2 핵심 제 1 세부과제: 전북대학교)

○ 점막면역 시스템

- 점막은 음식을 비롯한 여러 미생물 및 병원균이 접촉하는 접점부분이며, 대표적인 점막 면역계인 장내 점막 면역계에서 항원 유입은 M cell을 통하여 주로 이루어진다.
- M cell 주변에는 dendritic cell, T cell 및 B cell이 존재하여 항원에 대한 IgA가 만들어지는데 이의 체외 분비를 통하여 방어면역 시스템을 유지하며, 점막면역 순환기 경로를 통해 전신 면역계에 항원을 전달하여 항원 특이적인 전신 면역반응도 유도한다.
- 따라서, 점막 백신 중 한 가지 방법인 경구백신은 투여의 수월성과 더불어 점막면역 뿐만

아니라 전신 면역계에서도 항원 특이적 면역 반응을 유도 할 수 있어 차세대 백신기술로 간주되고 있다.

○ 경구면역 증진 방안

- 백신의 성공은 강력한 면역반응의 유도과 밀접한 관계가 있으며, 주사용 백신에서와 마찬가지로 경구백신의 효율 증진을 위한 보조제가 필요하다.
- 백신 보조제는 첫째, 여러 물리적 혹은 화학적 자극들에서 백신물질이 오래 유지되어야 하며, 둘째, 백신이 점막면역 유도 조직까지 도달해야 하고, 셋째, 선천성 면역과 후천성 면역을 모두 유도할 수 있어야 한다.
- 최근 이용되는 화학합성물 혹은 독소를 이용한 점막 보조제 중의 일부가 질병유도의 가능성이 밝혀짐에 따라, 백신 적용 대상에 해를 끼치지 않는 보조제의 개발 연구 및 경구 백신 효율 증진 방안 연구가 필요하다.

○ 경구백신 효능 검정

- 백신 적용의 실용화를 위해서는 최종 대상에 적용하기 전에 실험동물을 대상으로 하는 효능 검정 및 적용 실험의 수행이 필요하다.

(2) 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발 (제 2 핵심 제 2세부과제: 고려대학교)

○ 식물체를 이용하여 유용한 단백질을 생산하는 것은 현재로도 가능한 기술임에도 불구하고 현실적으로 많은 문제점이 내포되어 있다. 단순히 대량생산만을 위해 식물체를 이용하는 방법은 형질전환 식물체의 제조에 걸리는 시간, 효율 및 효과 면에서 볼 때 박테리아나 곤충 세포, 또는 동물세포 및 동물 개체를 이용한 방법에 비해 우수하다고 볼 수 없다.

○ 식물체가 생산하는 단백질이 지니는 대표적인 장점은 안정성이다. 일반적으로 식물 단백질은 음식물의 형태로 섭취가능하기 때문에 식물체에서 생산한 단백질은 비섭취용 단백질에 비해 상대적으로 안전하다. 특히 식량으로 사용되는 식물의 경우에는 더욱 그러하다.

○ 유전자의 발현은 프로모터에 의해 조절되는데, 유용한 프로모터를 개발하면 식물의 발육단계나 조직에 따라 특이적인 발현을 이끌어 낼 수 있다. 따라서 외래유전자를 식물에 도입할 때 프로모터의 역할은 중요하며, 특히 조직 특이발현 프로모터는 유전자 발현의 효과를 극대화할 수 있다.

○ 종자와 뿌리는 인류의 주요 에너지원인 탄수화물, 단백질, 지질의 저장 장소이다. 종자와 뿌리 내 특정 조직에 특이적으로 발현을 유도할 수 있는 프로모터의 개발이 요구된다. 대부분의 쌍자엽 식물의 종자는 배유, 배, 종피로 이루어져 있다. 배나 배유 특이발현 프로모터는 작물육종 분야에서 많이 연구되고 있고 그 가치를 인정받고 있다.

(3) 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벡터 시스템 개발 (제 2 핵심 제 3 세부 과제: 경상대학교)

○ 유전자재조합 기술을 활용해 만든 단백질 의약품은 기존의 화학 합성의약품에 비해 안정성

및 치료 효과가 획기적으로 개선된 의약품이다.

- 바이오 의약품 시장규모는 2005년 910억 달러에서 2015년 3,000억 달러로 매년 10%이상 고속 성장 할 것으로 전망되고 있으며 단백질 의약품에 의해 그 성장이 견인되고 있다.
- 지금까지 고부가가치용 의약품 당단백질 생산은 동물세포 배양방법이 주로 사용되어왔으나 까다로운 세포주 개발, 고가의 생산비용, 바이러스 등의 병원균 오염 가능성, 생산설비 확장 의 한계 등의 문제점이 있기 때문에 동물세포 대용 재조합 당단백질 발현 시스템 개발이 절실하다.
- 식물체(세포)를 이용하면 저비용으로 다양한 단백질의 생산이 가능하기 때문에 국내·외의 여러 연구자들이 유용 단백질을 식물체나 식물세포를 이용하여 생산하는 기술을 개발하고 있다.
- 식물에서 발견되는 식물 특이 당쇄 구조를 인간화된 당쇄 구조로 바꿈으로써 동물세포를 대용하는 재조합 당단백질 발현 시스템 개발이 필요하다.
- 식물 당단백질의 당쇄 구조를 목적에 따라 재구성 또는 제어함으로써 효능과 안전성을 극대화시킴과 동시에 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 기반기술의 개발이 절실히 요구된다.

(4) 식물 세포에서의 단백질 고축적 기법 개발 (제 2 핵심 제 4세부과제: 포항공과대학교)

- 현재는 식물세포를 단백질 발현을 위한 시스템으로 구축하기 위한 다양한 시도가 되고 있으며 이러한 노력 중의 하나로 유전자의 전사량을 증대시키는 방법에 대해서 많이 연구되었으며 이로부터 강력한 프로모터의 개발, induction 기법 개발, 조직 특이적 발현 벡터개발 등에 대한 일부 성공적으로 수행되었다. 하지만 많은 경우에 이들은 특허로 등록되어 활용 가능성이 국내에서 활용할 수 없으며 학술적으로 만 사용이 가능하므로 국내에서 새로운 inducible 강력한 vector의 개발이 필요하다.
- 또한 최근에 단백질 분배 시스템에 대한 이해가 높아짐으로 인하여 단백질의 저장이 고효율 단백질 발현 시스템 구축에 필수적이라는 것으로 제안되었으며 이에 대한 많은 기초 연구가 진행되고 있다. 이의 일환으로 ER에 단백질을 저장하는 것과 단백질을 세포외로 분비하는 경우에 있어서의 효율성에 대한 연구가 진행 되었으며, 식물에서 단백질을 대량으로 저장하기에 가장 적합한 장소 중의 하나는 엽록체라는 연구 결과가 발표 되었으며, 엽록체에 직접적으로 유전자를 도입하여 단백질을 발현하고자 하는 기술이 개발되었다.
- 또한 단백질을 엽록체와 peroxisome과 같은 여러 종류의 소기관에 동시에 보냄으로써 세포 내의 단백질의 발현 양을 높일 수 있다는 연구 결과가 보고되었으며, 엽록체의 경우에는 유전자를 핵의 genome에서 발현시키는 경우와 엽록체의 genome에 유전자를 넣어서 발현하는 경우에 대한 단백질의 발현 정도에 대한 비교 연구들이 진행되었으며 특히 엽록체의 genome에 유전자를 삽입하는 경우에 대단히 높은 수율로 단백질을 만들 수 있다는 연구결과가 발표되었다.



- 또한 아직 특이적인 조건에 대한 발현의 조절 등 더 많은, 새로운 기술의 개발이 요구되고 있으며 특히, 발현된 단백질을 세포소기관으로 이동시켜서 단백질을 고효율로 발현·축적할 수 있는 기술의 개발이 필수적이라 판단되며, 세포내 소기관 단백질 분배 기술은 다양한 용도로 사용될 수 있는 다목적 생명과학 기술로서 국내의 농업 분야의 획기적인 발전을 위해서는 필수적이라 생각된다.

### 제 3 절 연구 개발의 범위

#### 1. 연차별 세부과제 연구 범위

가. 돼지유행성 설사병 예방을 위한 비 식품종 개발 (제 1핵심 제 1 세부과제: 전북대학교)

##### (1) 1차년도

- 식물에서 돼지설사병에 대한 항원단백질과 점막체계에서 항원의 흡수를 증진시키기 위한 ligands의 융합항원단백질 발현을 위한 식물발현벡터의 제작 및 식물의 형질전환을 함.
- 항원유전자와 E. coli heat-labile toxin B subunit의 융합유전자를 가진 식물발현벡터의 제작
- 항원유전자와 Cholera toxin B subunit의 융합유전자를 가진 식물발현벡터의 제작
- 식물발현벡터를 이용한 비의 형질전환

##### (2) 2차년도

- 식물발현벡터를 이용한 비의 형질전환체 선발
- 형질전환체의 재분화
- 형질전환체 및 재분화 비의 도입된 유전자의 발현을 확인
- 재분화 비의 homoline 선발

##### (3) 3차년도

- 발현이 확인된 calli를 대량배양후 항원단백질에 대한 실험동물에서 면역반응유도능력을 확인
- 선발된 homoline 비의 농업 형질검사 및 환경 위해성 검사

##### (4) 4차년도

- 선발된 homoline 비의 농업 형질검사 및 환경 위해성 검사
- 농업형질 검사가 된 종자를 이용한 실험동물의 면역성 유도 확인
- 효율적인 경구투여 방법 및 formulation 결정

##### (5) 5차년도

- 농업형질 검사가 된 종자를 이용한 목적동물(돼지)의 면역성 유도 확인
- 효율적인 경구투여 방법 및 formulation 결정
- 목적동물에서 돼지 유행성 설사병에 대한 방어능력의 확인
- 식물체의 식품종 등록 추진

나. 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 신품종 개발 (제 1 핵심 제 2세부과제: (주) 젠닥스)

(1) 1차년도

- 국내 노다바이러스의 구조단백질인 캡시드 유전자 분리
- 노다바이러스 항원단백질 유전자의 식물체 발현 최적화
- 색소체 형질전환 벡터내로 도입
- 노다바이러스 항원단백질 유전자의 담배 색소체내로 도입
- T<sub>0</sub> 세대 담배 색소체 게놈내에 도입된 항원유전자 검증

(2) 2차년도

- 대장균에서 재조합 단백질 발현 및 고농도 순수분리
- 분리된 재조합단백질의 항원성 검증
- 재조합단백질을 이용한 표준항체 생산
- 형질전환 식물체내의 항원 유전자단백질 발현량 조사

(3) 3차년도

- 실험동물 (mouse)에서의 항원성 검증
- 공격접종시 사용할 순수 노다바이러스 배양액을 세포배양을 통해 확보
- 실험용 nodavirus-free 능성어류 치어 확보
- 담배유래 항원을 이용한 치어 면역 및 이를 통한 항체가 확인
- 항체가 상승을 위한 vaccine formulae 개발
- 항체가에 따른 공격접종 실시 및 그로 인한 viral clearance 및 감염율 (유병율 등) 조사
- 조직부검을 통한 백신 효능 검증

(4) 4차년도

- 형질전환 식물체 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>세대에서 Southern analysis로 색소체로 도입된 유전자를 확인하고, Northern 분석으로 형질전환체 식물로 도입된 항원유전자의 발현정도를 측정
- T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> 세대 형질전환체 식물에서 발현된 항원단백질의 발현정도를 Western 분석을 통하여 최종적으로 형질전환 식물체의 형질 고정 확인
- T<sub>3</sub>세대 담배유래 항원을 이용한 치어 면역 및 이를 통한 항체가 최종확인

(5) 5차년도

- 품종 보호의 5가지 요건에 맞춘 색소체 형질전환체의 품종보호 출원 및 재배시험 절차준비

다. 재조합 산업용 효소 생산 신품종 벼 개발 (제 1핵심 제 3세부과제: (주) 엔비엠)

(1) 1차년도

- TEV endopeptidase 유전자 합성
  - 유전자 정보를 GeneBank에서 확보한 후에 Kazusa DNA Research Institute의 codon usage data base (<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>)를 이용하여 벼의 codon usage에 최적화된 염기서열로 치환
- 식물발현벡터의 제작 및 형질전환
  - 본 연구팀에 의하여 개발된 고발현 프로모터를 포함하는 발현벡터에 유전자를 도입
  - PCR 등의 분자생물학적인 방법을 이용하여 TEV endopeptidase 유전자의 도입을 확인

- 고생산 세포주의 확립
  - 형질전환이 확인 된 세포주에 대한 Northern blot analysis, Western blot analysis 등의 분자생물학적인 방법을 이용하여 TEV endopeptidase 유전자의 도입과 발현확인
- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화
  - TEV endopeptidase 고생산 식물세포주로부터 N6 식물 재분화 배지를 이용하여 식물체를 재분화

(2) 2차년도

- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화(1차년도 이후 계속)
  - TEV endopeptidase 고생산 식물세포주로부터 N6 식물 재분화 배지를 이용하여 식물체를 재분화
  - 재분화 된 식물체는 순화하여 육종을 위한 종자를 확보한다.
- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사
  - TEV endopeptidase 고생산 라인 중에서 homo line을 선발 및 농업형질 조사
- 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인
  - TEV endopeptidase 기질 단백질을 이용하여 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인
- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 현탁세포 확립
  - TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 액체배양을 위한 현탁세포를 유도한다.

(3) 3차년도

- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사
  - TEV endopeptidase 고생산 라인 T3 세대에서의 도입 유전자 안정성 확인 및 최종 elite line 선발
  - TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line에 대한 농업형질 조사
- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 cell bank 구축
  - 본 연구팀에서 기확립한 벼의 현탁세포 동결보존법에 따라서 trypsin 고발현 현탁세포주에 대한 cell bank를 구축한다.
- 식물세포유래 TEV endopeptidase에 대한 생화학적 특성 분석
  - 상용의 TEV endopeptidase와 식물세포유래 TEV endopeptidase에 대한 생화학적 특성을 비교분석 한다.

(4) 4차년도

- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사
  - TEV endopeptidase 고생산 최종 elite line의 T4 세대에서의 농업형질 조사
  - TEV endopeptidase 고생산 최종 elite line에 대한 환경위해성 평가 시작
- TEV endopeptidase 고생산 세포주 제조공정 확립
  - 단세포 배양 방법을 최적화하고 확립한다.
  - 생산수율 증진조건 확립한다.
  - 배양공정 및 정제공정을 10 mg/day 규모로 확립하고 최적의 제조지시서 완성
- TEV endopeptidase에 대한 분리·정제방법을 확립
  - 이온교환 수지법과 Recycling HPLC를 이용하여 순도 90%이상의 정제기술 확립

(5) 5차년도

- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line에 대한 특허출원 및 품종 등록 이행
- TEV endopeptidase 고생산 세포주 제조공정의 scale-up
  - 생산수율 증진조건 확립한다.
  - 배양공정 및 정제공정을 100 mg/day 규모로 확립하고 최적의 제조지시서 완성
- TEV endopeptidase에 대한 분리·정제방법 확립
  - 이온교환 수지법과 Recycling HPLC를 이용하여 순도 98%이상의 정제기술 확립

라. 식물세포 배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석 (제 1 핵심 제 2 세부과제: 전북대학교)

(1) 1 차년도

- Amylase와 protease의 발현억제를 위한 siRNA를 포함하는 식물발현벡터의 제작
- 항체 발현 식물체에 siRNA 식물발현벡터를 이용하여 형질전환.
- 식물세포현탁배양에서 생산된 항체의 phagocytosis와 실험동물에서 기능 확인

(2) 2차년도

- 식물발현벡터를 이용한 벼의 형질전환체 선발 및 분자생물학적 분석
- 형질전환 식물체 재분화
- 형질전환체의 도입된 유전자의 기능 확인 및 항체 생산 증가 확인

(3) 3차년도 연구내용

- 항체 고발현 형질전환체 선발 및 대량생산을 위한 조건 확립
- 고발현 형질전환 식물체 선발
- 항체단백질의 분리 및 그의 기능 확인

마. 경구백신 효율 증진 방안 및 백신효능 검정 연구 (제 2 핵심 제 1 세부과제: 전북대학교)

(1) 1차년도

- 소장의 점막면역 유도조직에서 lymphocyte 분리
- 소장점막면역 실험 조직에서 lymphocyte 분리
- 분리된 점막 면역계 세포들에 항 펩타이드 처리 후 나타나는 cytokine과 전자 조절 인자 분석에 의한 면역반응 특성 분석
- In vitro M cell model을 이용한 M cell 분화
- 분화된 M cell과 미분화된 M cell에서의 단백질 발현 양성 비교 분석
- 항 펩타이드를 포함하는 표지항원 발현 벡터 제작 및 재조합 단백질 확보

(2) 2차년도

- 소장점막면역 유도조직과 실험 조직에서 lymphocyte 분리
- Marker를 이용한 세포 분리 및 분리된 세포 그룹에서 항 펩타이드에 의해 유도되는 cytokine profile 분석
- M cell 분화시 분비되는 것으로 보이는 단백질의 유전자를 확보하여 cloning 한 후 재조합 단백질 생산
- 펩타이드와 항원을 이용한 ex vivo 연구를 통하여 항원 전달 분석

(3) 3차년도

- 실험동물 소장의 점막면역 유도조직과 실험 조직에서 분리된 lymphocyte로부터 분리된 세포군으로부터 작용점으로 추정되는 단백질의 양과 유전자 분석
- 펩타이드를 이용한 IP를 통한 작용점 분석
- M cell 분화 단백질의 처리에 의한 분화 양상 분석
- M cell 분화 관련 재조합 단백질과 표지항원을 이용한 ex vivo에서의 항원전달 효율 분석
- Target 항원에 대한 검정 system 확립
- 식물 형질전환체의 실험동물 경구 투여에 의한 전신 및 점막 면역반응 분석

(4) 4차년도

- 펩타이드, M cell 분화 단백질, 혹은 이의 복합 적용에 의한 실험동물에서의 경구면역
- 실험동물에서의 점막 및 전신 면역반응 유도특성 확인
- 형질전환체를 실험동물에 경구 투여한 후 혈청과 배설물에서 얻은 시료에서 항원 특이적 IgG 와 IgA 의 양을 ELISA 통해 확인

(5) 5차년도

- 펩타이드, M cell 분화 단백질, 혹은 이의 복합 처리에 의한 면역반응 유도 실험동물에서의 세포 반응 특성 확인
- 세포에서의 RT-PCR, cytokine ELISA 및 ELISPOT 분석
- 항원유전자 형질전환 식물체리 실험동물 경구투여를 통한 전신 및 점막 면역반응 유도 특성 분석

바. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발 (제 2 핵심 제 2세부과제: 고려대학교)

(1) 1차년도

- 당근에는 35S 프로모터와 고효율 뿌리 특이적 프로모터를 활용하고, 벼에서는 ubiquitin 프로모터와 과발현용 고효율 chemical-inducible 프로모터를 활용하여 MBP 유전자를 클로닝함.
- 과발현을 위해서 codon usage, G/C content, enhancer/intron 등을 고려하여 여러 가지 조합으로 클로닝함.
- 고축적을 위해서 엽록체 targeting 염기서열을 활용하여 여러 가지 조합으로 클로닝함.
- 벼와 당근의 형질전환 시스템은 이미 구축되어 있음. 벡터를 아그로박테리움에 형질전환하고, 아그로박테리움을 접종시켜 벼와 당근을 형질전환함.
- 형질전환체를 PCR과 Southern 분석 등으로 확인함.

(2) 2차년도

- 도입된 유전자가 정상적으로 발현되고 있는지 조사하기 위해 RT-PCR과 Northern 분석을 실시하고, 이미 제작한 항체를 사용하여 Western 분석을 수행함.
- 단백질이 과발현되고 있는 T<sub>1</sub> line을 온실 및 포장에 재배하여 대량 번식함.
- 실험동물에 단백질을 경구 투여하여 유효성을 검증하기 위해 형질전환 식물체에서 총 단백질을 분리하고 column을 이용하여 예비 정제를 실시함. 총단백질 분리는 SDS와 UREA를 사용하여 변성된 형태의 단백질을 분리하고 표지 분자를 접착시킨 column을 이용하여 예비 정제를 실시함. 단백질 분리조건을 변화시키며 최적의 단백질 분리 조건을 탐색함.

(3) 3차년도

- 종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발
- 외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축

(4) 4차년도

- 콩과 옥수수 종자에서 종자 특이적 발현 프로모터의 발현 분석
- 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색 및 선별
- 종자 특이적 프로모터의 고등식물 형질전환용 벡터 시스템 개발 및 형질전환
- 형질전환체에서 발현 분석

(5) 5차년도

- 종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발
- 외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축

사 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 신품종 개발 (제 2 핵심 제 3 세부 과제: 경상대학교)

(1) 1차년도

- 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 호스트 (세포) 개발: 돌연변이체 (cgl mutant)와 RNAi 기법을 이용한 벼, 애기장대 호스트 개발

(2) 2차년도

- 당 단백질 고 발현용 binary vector 시스템 구축 (조직 특이 발현 강력 promoter, signal sequence 이용)
- Target 유전자 발현 vector constructs 구축, Agrobacterium을 이용한 형질전환 및 고 발현 계통확립

(3) 3차년도

- 식물 ER-stress signaling, unfolded protein response (UPR) regulator를 이용한 target 당 단백질의 발현량 증가, quality control, 세포 외 분비 기술 개발

(4) 4차년도

- 식물세포 발현 단백질 분리용 affinity tag (vector) 개발, 단백질 고효율 순수 분리 기술 개발 및 이를 이용한 생산 단백질의 순수분리
- 생산 단백질의 당화, 활성, 안전성 분석: Con A-, HRP-,  $\alpha$ 1,3-fucose-,  $\beta$ 1,2-xylose- 항체를 이용한 N-glycan 분석, MALDI-TOF/MS 등을 이용한 N-glycan 분석

(5) 5차년도

- 고부가가치 단백질 발현 형질전환 식물체의 형질 고정 및 특허 출원

아 식물 세포에서의 단백질 고축적 기법 개발 (제 2 핵심 제 4세부과제: 포항공과대학교)

(1) 1차년도

- Constitutive 5' UTR에 대해서는 이미 본 연구실에서 어느 정도 분석이 진행 중이어서 새로운 5' UTR을 확보하고자 하며 이를 위하여 Arabidopsis genome의 전체 유전자를 다시 informatics approach를 통하여 분석하고 이들 중에서 Inducible 고효율 5' UTR의 screening을 하고자 함.
- 새로이 확보된 5' UTR을 중심으로 하여 일단 GFP를 이용한 reporter construct를 만들고

이들을 protoplast system을 이용하여 발현하여 이들 새로이 확보된 5' UTR들의 단백질 번역 효능을 검증함

- 전체 genome의 분석을 통한 새로운 5' UTR의 확보이외에도 targeted approach로 다양한 환경 stress inducible 유전자들의 5' UTR의 분석을 통한 inducible 5' UTR 가능성 탐색
- 이미 확보된 constitutive 5' UTR의 효능에 대한 기작을 규명하기 위하여 다양한 mutant construct를 만들고 이들을 통해서 번역의 효율을 결정하는 인자를 확인하고 이를 통하여 artificial 5' UTR enhancer의 구축 가능성을 탐색할 것임
- 5' UTR의 효능 증진에 이어서 translation factor들의 역할이 중요할 것이므로 다양한 translational factor들의 cDNA를 확보하고 이들의 기능을 규명하고자 할 것임.
- 특히 translation initiation factor들에 중점을 두고 이들이 translational initiation에서의 역할과 이들 translational initiation factor의 overexpression을 통한 단백질의 번역 증진 가능성을 검증할 것임.

#### (2) 2차년도

- 새로이 확보될 inducible 5' UTR를 이용하여 target 단백질 고발현 vector를 구축하고 이들을 이용하여 애기장대 형질 전환체 구축하고 형질전환체에서의 고번역 가능성을 탐색할 것임
- 5' UTR test용 vector와 translational initiation factor의 cotransformation을 위한 construct 구축과 protoplast에서의 효능 검증
- Inducible 5' UTR transgenic plant의 번역 효능 증진 가능성을 검증하기 위해서 inducible 5' UTR이 들어간 형질전환체로부터 protoplast를 만들어 여기에 다시 translational initiation factor를 overexpression하여 super induction의 가능성을 탐색할 것임
- 고효율 5' UTR을 이용한 발현용 vector를 구축하고 이들을 이용하여 애기장대 형질전환체 구축
- Translational initiation factor들의 overexpression 형질전환체 구축하여 번역 증진 가능성 탐색

#### (3) 3차년도

- 식물용 대량 발현 vector에 다양한 소기관 targeting signal에 따라서 target 단백질인 cellulase 단백질의 발현 vector의 구축
- Agrobacterium-mediated transformation 기법을 이용한 형질전환 벼 제조
- 애기 장대에서의 translational initiation factor의 과발현 형질전환체를 구축하고 translational initiation factor의 단백질 번역에서의 효능 증진 가능성을 탐색할 것임

#### (4) 4차년도

- Agrobacterium-mediated transformation기법을 이용하여 벼의 형질 전환체 구축과 이들 형질전환체들로부터 최우수 line 선발
- PCR 및 RT-PCR을 이용한 유전자의 발현 level 측정과 Western blot analysis를 통한 단백질의 level 측정
- 형질전환체의 유전적 특성 및 발현적 특성 연구를 단백질 level에서 localization, 단백질 activity 등을 통해서 형질전환체의 특성 규명

(5) 5차년도

- 세대에 따른 단백질의 활성 측정, RNA level에서의 유전자 발현 등의 형질전환체의 특성 규명
- transgenic plant의 field에서의 homoline 선발 및 세대 간 검증을 통해서 발현의 지속성 연구
- Cellulase 과발현 형질전환 벼의 사료 효율 증대 가능성 검증을 위한 동물 실험 대동물 실험: 이 실험을 위한 벼의 재배는 F&P 사의 포장을 활용할 것임 (현재 생명공학 venture 기업인 F&P에서 포장 실험 시설을 완비하였으며, 다른 과제에서 수행하고 있는 형질전환 벼를 포장 실험을 수행 중에 있으므로, 가능하다면 이 회사와의 협력 관계를 통해서 포장 실험을 수행할 것임)
- Cellulase 과발현 형질전환 벼가 경제적으로 가능성이 있다는 판단을 할 경우 기술 이전을 통하여 기술 이전을 받은 기업과 함께 환경안정성 평가 실험을 위한 과제를 제안하고 수행할 것임



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외의 기술동향 및 수준

#### 1. 분자 농업 분야의 연구 동향

현재 산업화가 이루어진 식물세포배양을 이용한 유용물질 생산은 일본과 러시아를 선두로 하는 선진국에서 대부분 식물 자체가 지니고 있는 taxol, alkaloids, 천연색소 등과 같은 식물의 2차 대사산물 등을 중심으로 산업화가 이루어져 왔다. 형질전환 식물체를 이용한 최초의 의료용 단백질인 human insulin이 생산 (1983년)된 이래 선진 국가에서도 영국의 Guy's Hospital, 미국 Scripps 연구소 및 Monsanto Inc. 등의 연구진을 중심으로 진행되어졌으며 최근에는 많은 관련 생명공학 기업들과 연구자들의 관심이 높아져가고 있는 상황이다. 특히 식물세포 현탁 배양을 이용한 의료용 단백질 생산은 매우 가능성이 큰 대안으로서, 주로 연구의 대상으로 많은 관심이 집중되고 있는 의료용 단백질로는 경제적 효용성이 높은 항원단백질, cytokine, 단클론항체 등이 주요 target이 되고 있다. 형질전환 식물체를 이용한 최초의 의료용 단백질인 human insulin이 생산 (1983년)된 이래 여러 식물체에서 형질전환기법이 확립되었으며 식물체를 유용단백질이나 효소를 생산하기 위한 bioreactor로 이용하기 위한 연구들이 진행되고 있으며 현재 의료용으로 허가된 것은 분비형 항체 백신 외 4 종이며 20 여개가 임상실험 중으로 특히 이스라엘 회사인 Protalix Biotherapeutics가 당근세포에서 생산한 Gaucher병의 치료제인 gluconocerebrosidase로 고세병 환자들을 대상으로 한 임상 III상에서 매우 긍정적인 결과를 얻었으며, 그 생산기술을 최대 규모의 제약회사인 Pfizer에 \$115 million에 기술 이전하여 조만간 Taliglucerase alfa (Uplyso<sup>®</sup>)라는 이름으로 출시될 예정이다. 그 외 Medicigo Inc.는 2011년 2월에 담배에서 생산된 고병원성 조류독감(H5N1) Virus-Like Particles (VLPs) 백신을 이용한 임상 II상의 긍정적인 중간 결과를 발표하였고, 홍화에서 생산된 insulin (SemBioSys)이 Humulin<sup>®</sup> (Eli Lilly에서 생산되어 북미에서 가장 많이 사용되는 인슐린 제품 대비 생물학적 동등성을 입증하고 곧 상용화될 것으로 예상되며, 유럽에서는 Meristem Therapeutics사가 옥수수에서 생산한 gastric lipase와 lactoferrin 그리고 Cobento Biotech이 애기장대에서 생산한 human intrinsic factor와 같은 제품이 임상실험 중에 있다. 그리고 외래 단백질을 높은 수율로 생산하기 위하여 1) 강한 발현 시스템에 의한 유전자의 발현 수준 향상, 2) 정제의 어려움, 3) 당수식의 동물단백질과의 차이 4) 상대적으로 빨리 성장하는 식물세포의 선발 등 식물발현시스템의 어려움에 관한 많은 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 위에서 언급한 다양한 가능성에도 불구하고 아직 vaccine의 생산에 대한 효용성에 대한 충분한 검증이 되지 않았으며 상품화되었으나 실용화 된 예가 없으며 이들을 저비용으로 대량 생산을 위한 활발한 연구가 진행되고 있으며 임상실험이 진행 중인 사례가 있으며, Biolex사 (<http://www.biolex.com>)에서는 식물세포에서 alpha interferon를 생산하여 식물체에서 생산한 alpha interferon에 대한 일차 임상 실험이 완료되었으며, 미국의 Prodigene에서는 식물세포에서 trypsin 및 aprotinin과 같은 단백질을 생산하고 있다. 또한 Biocatalyst로 사용 가능성이 있는 단백질들의 대량 생산이 많이 시도되고 있으나 아직 상업적으로 제한적인 성공에 그치고 있으며 다양한 단백질의 대량 생산이 아직 실용화된 경우가 많지 않다. 따라서 가능성은 무한하지만 식물세포에서의 더 많은 기초 연구를 통한 단백질의 발현 기술, 단백질 targeting 및

저장 기술, 단백질 정제 기술 등이 매우 절실하게 필요하다. 식물세포배양을 통하여 생산되는 당단백질의 경우 ER과 초기 Golgi apparatus에서 진행되는 N-glycosylation 과정은 동물세포와 동일하나, 후반기 Golgi apparatus에서 진행되는 당쇄 부가과정이 달라서 식물 특이적 (1,2)-xylose와 core(1,3)-fucose residue는 면역 유발성(immunogenicity)을 지니기 때문에 인체 유래의 재조합 당단백질 생산에 주된 문제점으로 제기되고 있다. 이러한 면역원성 문제를 해결하기 위해서 ER retential signal인 KEDL이 당단백질 C-말단에 결부된 형태로 발현시켜 면역유발성이 없는 high-mannose type의 당쇄가 부착된 당단백질로 발현하는 기술이 개발되었다.

또한, 식물 특이적 당쇄 구조인 (1,2)-xylose와 core (1,3)- fucose residue 부착에 관련된 유전자를 비활성화 시키는 기술도 제시되었다 (FEBS Lett (2004) 561, 132). 그리고, 식물체에 동물 유래의 당전이 효소 유전자들을 발현시켜 인간화 당쇄 생합성 경로를 구축하는 기술 등에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있으며, 이러한 식물유래 당단백질의 당쇄를 인간화 시키는 기술의 정립은 식물발현시스템을 이용한 난발현성 단백질인 EPO 등과 같은 고부가가치의 의료용 단백질의 생산가능성을 높여주고 있다. 지금까지 식물에 외래 유전자의 도입을 통하여 외래단백질을 생산하고자 하는 시도는 많이 있으나, 대부분이 식물의 세포 내에 외래단백질을 축적시키는데 지나지 않았고, 외래 단백질의 축적비율도 대부분 1%를 넘기지 못하고 있다. 특히, 의료용 단백질과 같은 경우에는 세포 내에 많은 양이 축적되어 있어도 이후의 정제단계가 복잡하여 지는 단점이 있으므로, 최근에는 식물 세포 현탁 배양을 이용하여 배지로 분비되도록 유도한 후 분리 정제를 시도하고 있으나 생산수율이 매우 낮아 다른 시스템과 비교하여 상업성이 떨어지고 있다.

현재 유럽에서 광범위하게 사용되고 있는 공인된 생물의약품 제조 방법으로는 동물세포배양 제조(mammalian cell culture manufacturing)와 미생물 발효(microbial fermentation)를 들 수 있다. 많은 생산량과 레이아웃 비용, 하류공정에서의 애로사항, 미생물 오염 취약성, 소요시간 및 제한된 수용력 등 기존 생물의약품 제조 공정에 동반되는 문제점들로 인하여 형질 전환 동물 및 식물(transgenic animal and plant) 활용과 같은 혁신적이고 효율적인 대안의 수요가 높아지고 있다. 기술 분석 전문회사인 프로스트 앤 설리번에 의하면 현재까지 인체용 PMP 시장 상업화를 위한 마케팅 승인을 받지 못하여 유럽에서는 생물의약품 생산에 형질전환 식물을 사용하는 식물 분자농업(Plant Molecular Farming 혹은 Biopharming이라고도 불림)이 아직은 초기 단계에 있다고 보고하고 있다. 식물 분자농업 관련해 시행된 세계 전체 실험들 중 약 8%만이 유럽에서 시행됐으며, 세계 식물 분자농업 특허권 중 약 19%를 유럽이 보유하고 있다. 하지만 기술 platform과 억제 설비에 관한 공공부문 연구 활동은 미국 수준과 동등하며, 유럽연합 내에서 독일, 영국, 프랑스, 이탈리아, 스페인이 식물 분자농업 공공부문 연구를 선도하고 있는 것으로 파악된다. 대부분 분자농업 산업화 초기 단계로 기술의 격차가 크지 않으며, 조기 사례창출을 통한 세계 시장 선점이 가능할 것으로 알려지고 있으며, 전 세계적으로 약 33개의 기업에서 분자농업 연구를 하고 있으며, 대부분 임상 진입(1/2상) 단계로 일부 선진 국가에 집중되어 있다.

**개발 단계별 기업 분포**

단계	기업 수
1상	3
1상/상용화	1
2상	15
필드실험	1
N/A	13
합계	33



< 분자농업 기업 분석 및 산업화 수준 >

< 주요 분자농업 관련 회사현황 >

회사명	홈페이지
SemBioSys Genetics (Calgary, Canada)	<a href="http://www.sembiosys.com/">http://www.sembiosys.com/</a>
Ventria Biosciences and Meristem Therapeutics	<a href="http://www.ventria.com/">http://www.ventria.com/</a>
ORF Genetics Ltd.	<a href="http://www.orfgenetics.com/">http://www.orfgenetics.com/</a>
Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology	<a href="http://www.fraunhofer.org">http://www.fraunhofer.org</a>
Medicago Inc. (Quebec, Canada)	<a href="http://www.medicago.com">http://www.medicago.com</a>
Icon Genetics(Bayer; Halle, Germany)	<a href="http://www.icongenetics.com">http://www.icongenetics.com</a>
Texas A&M (College Station, TX) and Kentucky BioProcessing LLC (Owensboro, KY)	<a href="http://www.kbpllc.com/">http://www.kbpllc.com/</a>
Terrasphere	<a href="http://terraspheresystems.com/">http://terraspheresystems.com/</a>
Protalix Biotherapeutics, Inc.(Israel)	<a href="http://www.protalix.com">http://www.protalix.com</a>
DowAgroSciences(Indianapolis, IN)	<a href="http://www.dowagro.com/">http://www.dowagro.com/</a>
ROOTec Bioactives Ltd	<a href="http://www.rootec.com/">http://www.rootec.com/</a>
Greenovation GmbH	<a href="http://www.greenovation.com/">http://www.greenovation.com/</a>
Biolex, Inc.(Pittsboro, North Carolina)	<a href="http://www.biolex.com">http://www.biolex.com</a>
Syngenta	<a href="http://www2.syngenta.com/en/index.html">http://www2.syngenta.com/en/index.html</a>
Agrenvec	<a href="http://agrenvec.com/">http://agrenvec.com/</a>

< 식물유래 의료용 단백질의 산업화 현황 >

회사명	대상식물	제품/용도	단계
Ventria Bioscience (미국)	벼	유아용 식품첨가제 (항감염, 항염증제)	판매 중
Protalix (이스라엘)	당근	고서씨 병 치료제	판매승인
Dow Agrosciences LLC (미국)	담배	Newcastle disease vaccine (닭 치료용)	승인
SemBiosys (캐나다)	홍화	인슐린	승인
Cobento AS (덴마크)	애기장대	Vitamin B12 deficiency	사전승인
MeristemTherapeutics (프랑스)	옥수수	낭포성 섬유증 치료용 리파아제	제 2 상
	옥수수	락토페린	제 1 상
Monsanto (미국)	옥수수	결장·직장암에 대한 IgG	제 2 상
Planet Biotechnology (미국)	담배	충치예방을 위한 IgGs	제 2 상
	감자	일반 감기 예방	제 1 상
	감자	항암치료시탈모예방제	제 1 상

< 식물유래 산업용 단백질의 산업화 현황 >

Product	Trade Name	Pharma Crop	Gene source	Commercial Purpose	Company Producing	Company Selling (product number)
Aprotinin	AproliZean	Corn	Cow	Research and manufacturing	ProdiGene	Not available
Aprotinin	Apronexin	Tobacco	Cow	Research and manufacturing	Large Scale Biology	Sigma Chem. Co. (A6103)
Avidin	Recombinant avidin	Corn	Chicken	Research and diagnostic reagent	ProdiGene	Sigma Chem. Co. (A8706)
$\beta$ -glucuronidase (GUS)	Not available	Corn	Bacteria	Research and diagnostic reagent	ProdiGene	Not available
Trypsin	TrypZean	Corn	Cow	Research and manufacturing	ProdiGene	Sigma Chem. Co. (T3568 and T3449)
Lactoferrin	Not available	Rice	Human	Research	Ventria Bioscience	Sigma Chem. Co. (L4040)
Lysozyme	Not available	Rice	Human	Research	Ventria Bioscience	Sigma Chem. Co. (L1667)

2. 어류 백신 연구 동향

근래에 해산어 자원의 보호 및 확보를 위해 약 40 종류의 해산어가 국내에서 양식되고 있을 뿐만 아니라 수많은 종류의 치어도 양식의 종묘로서 생산되고 있다. 이러한 생산에 대한 종묘 생산 기술 및 양식 기술도 개발되고 있지만, 감염 특히 바이러스감염에 의해 일어나는 질병에 대한 제어는 점점 곤란에 직면하고 있다. 예를 들어, 방어 등에 대한 YAV

(yellowtail ascites virus)에 의한 비르나바이러스 (birnavirus) 감염, 능성어나 넙치 등에 대한 노다바이러스 (nodavirus) 감염에 의한 VNN (viral nervous necrosis: 바이러스성 신경 괴사증) 등이 보고되어 있다.

국내 양식장의 규모가 점차적으로 대형화함으로써 높은 밀집사육과 수질의 저하로 어류 감염성 질병 발생율이 증가하는 추세다. 국내 양식어류 중에서 생산량이 가장 많은 넙치의 경우 문제시 되고 있는 질병으로는 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리요증, 활주세균증 등의 세균성 질병과 이리도바이러스, 림포시스티스 바이러스, 버나바이러스, 노다바이러스와 같은 바이러스성 질병 등이 보고되고 있다.

바이러스성 질환의 경우, 감염 후 특별한 치료제가 없으며 높은 전염력과 폐사율로 인해 막대한 손실을 유발하는 질환이다. 그 중 수온이 높은 여름철 주로 남해 연안의 양식장에서 참돔 (*Pagrus major*), 방어 (*Seriola quinqueradiata*), 농어 (*Lateolabrax sp.*)와 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)을 포함하는 여러 해산 양식어류에 감염되어 매년 막대한 경제적 피해를 입히고 있는 것으로 알려져 있다.

어류의 세균성질병 발생을 막기 위해서 항생제가 사용되지만 바이러스성 질병은 수평 감염뿐만 아니라 수정란에 의한 수직감염이 되기 때문에 한번 발생되면 치료가 불가능하고 대량폐사를 일으키는 경우가 많다.

최근 국내 양식장에서 바이러스 질병실태 조사를 한 결과 능성어, 돔류, 넙치에서 노다바이러스로 인한 폐사가 발생된 것으로 확인됨. 노다바이러스 감염은 주로 부화 후 15-30일령의 어체에서 발생되고, 특히, 성장 초기 단계의 자치어 시기에 치사성이 매우 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다. 양식 어류의 감염 질병을 방지하기 위한 항생제의 지속적인 사용은 내성균을 유발시키며 환경오염 등의 문제를 일으키고 있어 이에 대한 대책으로 수산선진국인 노르웨이, 영국, 미국, 캐나다 등에서는 항생제 사용을 제한하는 대신 백신 개발을 적극적으로 추진하고 있다.

어류백신의 종류는 크게 불활화백신 (inactivated vaccines), 약독화백신 (live attenuated vaccines), DNA 백신, 재조합단백질백신 (recombinant vaccines) 등이 있다 (RUMA guidelines 2006; Toranzo et al. 2009). 불활화백신은 주로 박테리아나 바이러스를 포르말린이나 특정 화학품으로 처리한 것으로 항원보강제와 함께 투여해야 면역 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Caipang et al. 2006). 약독화백신 경우는 병원성을 일으키지 않고 숙주 세포내에서 면역반응을 유도하여 항체를 생산하는 장점이 있으나, 간혹 질병을 유발할 가능성이 있다.

최초의 어류백신으로는 1942년 *Aeromonas salmonicida*를 포르말린에 불활화한 백신으로 실험실내에서 사용한 예가 있다. 1976년 미국에서 포르말린으로 처리한 비브리요 (*Vibrio anguillarum*) 침지백신이 개발되어 1980년대 초부터 양식 산업에 적용되기 시작하였다. 이후 부스럼병, 에드워드병, 콜롬나리스병, 비브리요병, 연쇄구균증 및 구적병 백신 등이 개발되어 유럽, 미국, 일본, 캐나다 등에서 상용화되었다.

전 세계적으로 최초로 허가된 어류 백신은 1976년도 미국에서 개발된 enteric red mouth에 대한 백신이며, 현재 북미와 유럽에서는 수십 종의 어류 백신이 생산되고 있다. 국내에서는 넙치의 에드워드 (*Edwardsiella sp.*) 백신이 세계 최초로 상품화 되었으며, 넙치의 연쇄상구균증 (*Streptococcus sp.*) 백신도 최근에 개발되어 상용화된 상태이다.

바이러스성 질병을 예방하기 위한 백신으로서는 koi herpesvirus (KHV), 전염성채장괴사증바이러스 (IPNV), 바이러스성 출혈증바이러스 (VHSV), 전염성연어빈혈증바이러스 (ISAV),

초어아콰레오바이러스 (GCR), 이리도바이러스 (iridovirus) 등에 대한 백신이 있으나 몇몇 백신은 효과나 안정성 문제로 현장적용이 힘든 실정이다.

지금까지 상용화된 어류 백신의 대부분은 북유럽, 칠레, 캐나다 및 미국의 대단위 양식연어와 송어 질병 예방 백신들이며, 주로 주사 혹은 침치법으로 투여하는 불활화, 약독화 백신에 국한되어 있다. 최근 해수어, 담수어 및 열대어를 포함한 양식관상어 시장이 우리나라 뿐만 아니라 전 세계적으로 급성장 하는 추세에 있다. 국내의 경우도 해양의 아열대화가 진행되면서 새로운 어류 질병이 나타나기도 하고 기존 어류 질병의 감염율도 높아지고 있어서 수산용 백신의 필요성이 더욱 높아지고 있다. 우리나라의 대표적인 어류질병으로는 에드워드병, 연쇄구균증, 비브리오증, 활주세균증, 이리도바이러스병, 스쿠티카증, 아가미흡충증 등이 있으며, 수산동물 질병으로 인한 국내 총 피해규모는 연간 약 2,500 억원으로 추정된다.

넙치의 경우 2005년 이후 입식량은 매년 약 1억 2천만마리이며, 질병 및 자연재해에 의한 폐사량은 4천 8백만 마리로 폐사율은 40%에 달한다고 보고되어 있다. 따라서 안전하고 건강한 양식 어류 대량 생산을 위해 양식어류질병을 예방하는 고효능 백신개발 필요성이 부각되고 있으며 국내에서도 국립수산과학원을 중심으로 어류 백신 개발에 대한 연구 인프라 구축에 관심이 높아지는 추세이다.

### 3. 재조합 단백질 유래 바이러스 백신 연구 동향

인체 대상의 재조합 단백질의약품 개발을 중심으로 가축 질병 예방과 더불어 전 세계적으로 이슈화되고 있는 생물무기 (두창, 탄저균), SAR (중증급성호흡기 증후군), AI (조류인플루엔자), 신종플루 (H1N1)등 인수공통전염병에 대한 치료 및 예방 백신 개발 및 생산 시스템 구축에 대한 연구가 전세계적으로 주목을 받고 있으며, 다양한 발현 시스템을 활용한 재조합 백신 개발이 미래핵심 기술로 부상되고 있는 추세이다.

### 4. 바이러스 유사입자 (VLP) 기반 백신 개발에 대한 연구 현황

#### 가. VLP 백신의 면역원성

VLP 백신은 기존에 사용되던 individual proteins subunit 백신보다 중화항체 유도 능력에서 뛰어나다. VLP는 표면에 viral spike와 반복되는 단백질의 구조로 B 세포에 더 잘 인식되고 이로 인한 B cell signaling 과 MHC class II의 up-regulation으로 인하여 항원 특이적인 항체의 형성이 높게 되는 것이 특징이다. 또한, VLP로 제작된 백신이 B-cell-mediated 면역 반응뿐 아니라, CD4 T세포, cytotoxic T세포 (CTL)과 같은 T-세포의 면역 반응에도 크게 효과를 보여 백신으로서의 효용성이 검증되었다 (Schirmbeck et al., 1996; Paliard et al., 2000).

#### 나. VLP 백신의 상업적 판매 및 임상실험

자궁경부암 예방 백신인 가다실과 서바릭스는 각각 머크와 GSK사에 의하여 개발되었고 2006년에 미국 FDA로 승인 받은 최초의 VLP 백신이다. 두 백신 모두 자궁경부암 예방에 뛰어난 효과를 보이고 있으며, 백신 접종으로 인한 부작용 또한 보고된 바가 극히 적다. 예방 효과 기간은 30 - 50 년으로 알려져 있으며, 널리 사용되는 백신인 만큼 이에 대한 효능 비교, 부작용 보고, 보조제의 역할 등 부가적인 연구와 역학 조사가 활발히 진행 중이다(Harper et al., 2006; D'souza G et al., 2007).

미국 베일러 의과대학의 Robert L. Atmar 연구팀은 노로바이러스 VLP 백신과 보강제로 MPL A를 사용하여 노워크 바이러스 감염에 의한 급성 바이러스 위장염을 예방하는 효과, 안전성, 면역원성을 평가함. 백신을 투여한 피험자 중 70%에서 노워크 바이러스 특이적 IgA 혈청 반응이 감지되었고, 바이러스 유발성 위장염 (위약 그룹 69% vs. 백신 그룹 37%, P=0.006)과 바이러스 감염 (위약 그룹 82% vs. 백신 그룹 61%, P=0.05)의 빈도가 유의하게 감소함. 연구진은 노로바이러스 VLP 백신은 동종 바이러스 접종 후 발생하는 질환과 감염을 예방할 수 있다고 보고하였다 (Atmar et al., 2011).

일반적으로 VLP는 cellular와 humoral immune responses 둘 모두 강하게 자극할 수 있는, 신규 백신의 후보로 알려져 있고, 그 사용이 바이러스 구조의 난해함이나 종류에 국한되지 않는다. 2003년 기준으로 개발된 VLP 백신 같은 경우 30여 가지 이상의 바이러스에 해당되며 점차 여러 종류의 바이러스성 질병에 대한 대항백신으로 사용이 될 것으로 전망된다.

## 5. 경구용 백신의 연구동향

경구용 백신은 주사제에 비하여 사용 또는 저장이 용이하고, 생산하는 단계에서 정제 등의 공정이 제외되어 가격적으로 큰 경쟁력이 있으며, 무엇보다 점막자체에서 병원균의 침입을 예방할 수 있다는 장점이 있어 개발에 많은 관심을 받고 있다.

인간의 점막은 피부의 200배에 달하는 면적을 지니고 있으며, 병원균 감염의 70%가 점막을 통해서 이루어지는 것으로 조사된 보고가 있다 (Neutra et al., 1996). 주사제를 통한 백신의 접종은 점막상에서 감염을 예방할 수 있는 능력이 부족하다는 취약점을 지니고 있다 (Lamm et al., 1997). 경구 또는 비강과 같은 점막을 통한 백신의 접종이 mucosal 그리고 systemic 면역 방어 체계를 형성하여 효과적으로 감염에 대비할 수 있다는 장점을 지니고 있다 (Neutra et al., 1996).

## 6. 점막 면역 반응에 대한 연구

경구용 백신은 낮은 항원 보존성, 신체 내 산성 환경 또는 단백질 분해 효소에 대한 노출, 면역 관성 등으로 인하여 사용과 연구에 많은 어려움이 존재한다 (SMcGhee et al., 1998). 이를 타계하기 위해 LT, CTB, Saponin, Cyokines 등의 수많은 경구용 백신 보조제의 사용이 거론되었으나 안전성의 문제와 가격대비 낮은 효율로 인하여 실용화가 되지 않았다 (Rhee et al., 2012).

식물체로부터 표적항원을 발현하는 형질전환 된 식물체로 제작하여 경구용 백신을 개발하는 연구가 시도되고 있다. 그러나, 형질전환된 식물체를 섭취 시 항체가 형성될 수 있으나 식물체의 발현되는 항원의 당구조가 달라서 원치 않는 면역반응을 일으킬 수가 있어 실제로 임상에 적용하기에는 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

현재 사용되고 있는 백신은 백신의 보관과 수송에 냉장저장이 필요하고, 백신의 접종에 주사기가 요구되는 방식이다. 주사용 백신은 신체적 통증 및 정신적 두려움이 수반되며, 접종을 위한 의료 인력이 필요하다. 따라서 최근 국내외 백신연구의 동향 중 가장 두드러진 특징은 백신의 안전성 및 경제성, 그리고 접종의 수월성에서 주사용 백신의 문제점을 극복할 수 있는 경구백신에 대한 관심이 높아지고 있다는 점이다. 경구백신은 안전성, 경제성 및 접종 수월성 외에도 매우 중요한 장점을 가지고 있다. 예컨대, 주사용 백신은 전신면역을 통해서 유도되는 IgG에 의한 면역반응이 주 효과이지만, 인플루엔자나 결핵 등과 같이 큰 위험이

되는 주요 병원균은 호흡기에서 생식기까지 펼쳐져 있는 광범위한 점막조직을 통하여 감염되기 때문에 질병의 효과적인 예방을 위해서는 점막조직에 방어 면역반응을 구축하는 것이 중요하다. 이러한 측면에서 이의 달성이 가능한 점막을 백신 적용의 target으로 하는 점막백신은 그 효용성이 매우 높다고 할 수 있다. 또한, 점막으로 적용된 백신은 전신면역계에서도 항원 특이적인 면역반응을 유도할 수 있기 때문에 다양한 감염 경로를 통하여 침입하는 병원체에 대한 포괄적인 방어가 가능한 방어 면역체계를 점막과 전신에 갖추는데 매우 유용한 system이라 할 수 있다.

점막백신의 여러 접종 경로 중에서도 점종의 수월성 때문에 경구용 백신이 가장 선호되고 있다. 그런데, 경구로 투여되는 항원은 면역반응의 유도보다는 면역관용의 유도 특성이 강하다는 문제가 있어 경구백신이 극복해야 하는 가장 큰 숙제는 백신을 점막 면역반응이 잘 일어날 수 있는 면역 기관까지 전달하여 면역반응을 유도할 수 있게 해야 한다는 점이다. 이를 위한 방법으로 가장 선호되는 방법이 백신 보조제(adjuvant)를 사용하는 방법인데, 이는 cholera toxin 등을 사용하여 실험적으로 입증되었다. 하지만, 아직 안전성과 효율성을 모두 갖추고 있는 효과적인 점막면역 adjuvant가 제시되고 있지 않아 효율적인 경구백신 개발에 있어서 adjuvant에 대한 연구는 필수적인 분야라고 할 수 있다. 백신의 경구 투여를 통한 점막 면역반응 유도에서의 가장 큰 난관은 백신의 전달 과정에 있다. 경구로 투여된 항원단백질은 소화기를 거쳐 장내로 전달되어야 하기 때문에 여러 물리·화학적 악조건에 노출되게 된다. 또한, 점막조직 자체가 외부 물질의 침투로부터 신체를 보호하기 위하여 긴밀하게 조직되어 조절되고 있기 때문에 경구로 투여된 항원이 장에 도달한다 하더라도 장 점막 상피조직을 통과해야 하는 마지막 장애를 극복해야만 효과적인 면역반응 유도의 첫 단계를 시작할 수 있다. 따라서 adjuvant의 사용은 백신을 보다 효율적으로 외부환경으로부터 보호하여 면역기관까지 전달하는 기능을 갖거나, 백신이 면역기관에 전달 된 후 주변 면역세포들의 활성화를 유도하여 면역반응을 높이는 기능을 한다는 측면에서 경구백신에서 매우 중요한 요소라 할 수 있다. 백신의 지속시간을 높이고, 주변 면역세포들에게 백신을 잘 전달하기 위해 사용되는 보조제로는 alum, PLG microparticle/nanoparticle, liposome/virosome, ISCOMs/saponin/QS21, emulsion, chitosan 등이 있는데, 이들은 innate immune response를 유도하며, antigen presenting cell에 활성 신호를 전달한다. Th1, Th2 및 Th17과 같은 T cell 신호 전달을 유도 하는 보조제로는 Toll like receptor ligand(CpG, MPL, flagellin, imiquinod), NOD-like receptor ligand, non-toxic bacterial toxin(cholera toxin과 heat-labile *E. coli* enterotoxin), cytokine 등이 고려되고 있다. 특히 최근 점막 보조제의 주요 기능중 하나로 기대되는 것은 memory Th17 cell의 분화 유도이다.

Memory Th17 cell는 항원에 대한 면역 반응 및 방어기작에도 중요하게 작용하는 것으로 최근 보고되고 있어 memory Th17 cell에 대한 분석 및 분화 조절 물질의 발견은 경구 백신의 성패를 좌우할 주요 요인으로 기대 되고 있다. 또한 많은 연구들이 항원 특이적 항체 형성을 위해 germinal center형성의 중요성에 관심을 갖고 있다. germinal center의 형성을 follicular dendritic cell(FDC)에 의해 많은 영향을 받고 있으며 FDC의 조절에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 경구백신을 위한 adjuvant의 경우 점막 내에서 외부항원을 특이적으로 유입하는 특성을 갖는 세포인 M cell에 백신을 전달하고자 하는 전략이 주된 연구 방향인데, M cell은 점막 내 항원 유입의 가장 잘 알려진 경로이기 때문이다. 하지만, M cell에 대한 marker 및 특성에 대한 연구가 부족하고, M cell의 분포율이 높지 않아 연구에 많은 어려움이



있어 아직은 정확한 항원 전달 경로에 대한 지식이 부족한 형편이다. M cell을 백신 전달의 target으로 이용하고자 하는 전략의 경우 mouse M cell의 가장 잘 알려진 marker인 UEA-1을 microparticle 표면에 coating시켜 M cell targeting adjuvant로 이용하고자 하였으나 lectin의 특성상 세포에 여러 신호전달을 유도함으로써 안전성 문제가 제기되었다. 또 다른 방법으로는 M cell을 침입경로로 사용하는 것으로 알려진 세균인 *Yersinia* 등을 이용하는 방법인데, 이 역시 안전성 문제가 대두되었다. 최근, *Ulex europaeus* agglutinin-1(UEA-1)과는 결합하지만 WGA(Wheat germ agglutinin)과는 결합하지 않는 M cell의 특성을 이용하여 M cell에 특이적인 항체가 개발되었으며, 이 항체를 백신 보조제로 이용하고자 하는 연구도 진행된 바 있는데, 이 연구에서 M cell에 특이적인 항체를 이용하면 항원은 효과적으로 전달되지만 M cell을 통한 항원 전달만으로는 효과적인 면역반응의 유도를 보장하지 않는다는 사실을 알게 되었다. 최근의 M cell에서 특이적 receptor를 통한 항원 유입시 항원 특이적 면역 반응이 유도된다는 보고가 있다. 예를 들어 glycoprotein 2는 M cell 특이적으로 발현하는 분자이며 동시에 박테리아의 FimH 분자와의 특이적 반응을 통해 M cell로의 유입을 도울 뿐 아니라 항원 특이적 면역 반응도 유도 하는 것으로 보고되었다. 따라서, 최근의 경구백신 adjuvant 개발 방향은 단순한 M cell targeting이 아닌 M cell에서 발현되는 분자들을 대상으로 하기 위해서 먼저 항원 유입과 관련된 분자들을 밝히고 응용하는 방향으로 나아가고 있다. 경구 백신 보조제의 개발에서 항원의 유입 이외 면역 증강 효과를 높이기 위해 Th17 type의 cytokine들 (IL17A/F, IL-23)등이 중요하게 작용하는 것이 많은 백신 모델에서 검증되었다. 예를 들어 *Mycobacterium tuberculosis*의 백신 효과에서 IL-17 나 IL-23의 발현이 제한 될 경우 백신 효과가 줄어들 뿐 아니라, 병원균에 대해 대응하지 못하는 결과를 보여준다. 이는 Th17 type의 cytokine들은 백신의 효능을 결정하는 항원 특이적 memory cell유도에 매우 밀접하게 관련되어 있을 뿐 아니라 병원균에 대한 방어기작에도 깊게 관여 하고 있기 때문인 것으로 확인 되었다. 또한, 이미 잘 알려진 adjuvant들인 CT 이나 CFA등도 Th17 type의 cytokine를 유도 하여 그 adjuvant의 효과를 높이는 것으로 밝혀졌다. 따라서 경구 백신 보조제 개발 시 Th17 type의 cytokine을 우선하게 유도하는 특성은 경구 백신 보조제의 기능을 보다 높일 것으로 기대 되고 있다.

## 제 2 절 국내의 기술동향 및 수준

전북대학교와 (주) 엔비엠 연구팀이 돼지 바이러스설사병(Porcine Epidemic Diarrhea Virus), 돼지 흉막폐렴균(*Actinobacillus pleuropneumiae*), cholera toxin B subunit, 텅기열 바이러스 등 다양한 항원에 대한 항원유전자 형질전환 식물 경구백신 개발을 진행 중이다. 농촌진흥청의 농업생명공학연구원 김종범 박사팀은 돼지열병바이러스에 대한 항체단백질을 알파과에서 생산하였다. 단국대학교 황철호 교수팀이 돼지대장균 2종과 살모넬라균 1종의 치료 및 예방용 당근 백신 개발하였다. 한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터 김현순 박사는 B형 간염바이러스 항원단백질 경구백신을, (주) 젠닥스의 정화지 박사팀은 능성어류에 감염하는 노다바이러스 식물 경구백신 개발을 수행하는 등 다수의 식물유래 단백질을 이용한 경구백신 연구 수행 중이다. 전주생물소재연구소 신윤지 박사 연구팀, 중앙대학교 고기성 교수 및 경상대학교 이균오 교수 연구팀에서는 식물 특이적 당패턴의 변형기술을 개발하고 있다. 포함

공대 황인환교수 연구팀은 단백질 고발현 시스템과 고축적 시스템을 개발하여 이를 식물 유래의 influenza 백신 개발에 적용하고자 연구를 진행하고 있다. (주) 엔비엠은 고가의 산업용 효소인 Enterokinase를 벼 세포배양 기술을 이용하여 대량생산에 성공하여 시판을 시작하여 국내 최초의 분자농업 산업화를 이루었고, 벼 세포배양을 이용하여 생산한 Enterokinase는 기존 제품과 비교하여 생산단가를 1/10로 절감할 수 있어 국제적인 경쟁력을 확보하고 있음. 또한, 기능성 화장품 소재인 hEGF를 생산하여 국내외에 시판 중에 있다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용 현황
국립농업과학원	EPO 발현 식물체 개발, 식물을 이용한 혈전용해제 t-PA 생산	연구단계
국립농업과학원	돼지콜레라 예방용 백신 알팔파 개발	실증단계
(주) 엔비엠/전주생물소재연	식물을 이용한 돼지콜레라 경구백신 개발	실증단계
전북대학교/ (주) 엔비엠	가축 질병 예방을 위한 경구백신 연구	실증단계
	유용단백질 생산	산업화 진입단계
포스텍	단백질 고발현 시스템과 고축적 시스템 개발	실증단계
경희대학교	식물 바이러스 복제 시스템을 활용한 고발현 시스템 개발	실증단계
(주) 넥스젠	식물을 이용한 진단용 항원 생산	산업화 진입단계
(주) 젠다스	식물 경구 백신에 대한 연구	실증단계
단국대학교	자돈 설사병 방지를 위한 경구백신용 형질전환 당근 개발	실증단계
한국생명과학연구원	B형간염과 치매 예방을 위한 경구백신 개발	실증단계

### 제 3 절 국·내외 관련 시장 현황

#### 1. 시장 규모 및 성장률 예측

의약품 단백질 제품 세계시장 규모는 1997년 125억 달러 규모이고, 2002년 269억 달러, 2003년도 규모는 약 300억 달러로 성장하였다. 현재 제품개발이 완료되어 허가 단계에 있거나 임상시험 과정에 있는 의약품 단백질이 수백 종에 달하므로 향후 의약품 단백질 시장의 시장 규모는 지속적으로 증가할 것으로 예상되며, 2013년에는 의약품 단백질의 세계시장 규모가 1,000억 달러에 육박할 것으로 예상된다. 단백질제품은 생물산업 분야 전체의 60% 정도를 차지하고 있는 핵심 부문으로 생물산업 성장 및 발전을 선도하고 있으며, 시장규모 성장의 핵심을 담당한다. 의약품 단백질의 구성비는 생물산업 전체의 40% 내외, 생물의약품의 구성 비율은 생물산업 전체규모의 50% 정도이고, 의약품 단백질은 생물의약품의 80% 정도, 산업용 단백질의 구성비는 생물산업 전체의 20% 내외, 생물화학, 바이오식품, 바이오에너지 및 자원,

생물환경의 구성비는 생물산업 전체규모의 40%이고, 산업용 단백질은 생물화학, 바이오 식품, 바이오에너지 및 자원, 생물환경의 50% 정도를 차지하고 있다.

<단백질제품 세계시장 규모 >

구 분	현재의 시장규모 ( 2006 년 )	예상 시장규모 (2011 년)	예상 시장규모 (2015 년)
세 계 시 장 규 모	610,000 억원	1,100,000 억원	1,800,000 억원
한 국 시 장 규 모	15,883 억원	65,230 억원	90,000 억원

\* 산출근거: 산업자원부 자료(Technology Roadmap: 단백질 제품), 한국부품소재산업진흥원 자료(의료용 및 산업용 단백질 소재 가공 및 생산을 위한 난발현성 효소 생산 기술)를 근거로 추정.

1999년도 산업자원부의 자료에 따르면 국내 생물산업 전체시장에서 바이오의약품 (생물의약품)이 차지하고 있는 비중은 50%가 넘으며, 총 시장규모도 약 4,000억원 (98년 기준) 정도로 파악되었고 성장률은 매우 높게 추정되어 2010년에는 약 5조원을 넘을 것으로 추정된다 (아래 그림 및 표 참조). 이는 다소 과장된 측면이 있고 의약품을 일반의약품과 바이오의약품을 구분하는 기준이 모호한데서 기인한 것으로 생각되지만 분명한 것은 국내 바이오의약품 시장(제조합 단백질 의약품 시장이 포함됨)이 급속히 커지고 있다는 사실이다. 단백질제품에 대한 국내시장규모는 2001년 5,002억원, 2006년 1조 5,883억원, 2011년 6조 5,230억원, 2015년 약 9조원으로 추정된다.

국내시장에서 제조합 단백질 의약품 중 가장 많이 팔리고 있는 품목은 표에 정리된 EPO, 인간 성장호르몬, G(M)-CSF, 그리고 인터페론 등 4가지 품목들이 대표적이라고 할 수 있으며 나머지 품목들은 비교적 시장규모가 적은 편이다. IMS health 자료(2010년 4분기)에 따르면 각 판매사의 G(M)-CSF 관련 제품 국내 매출액을 합산하여 계산하였을 때, 2001년 국내 시장 규모는 116억원(G-CSF 및 GM-CSF 시장 합산)이었다. 현재, LG 생명과학(GM-CSF, 류코젠), 제일기린(G-CSF, 그라신), 중외제약 (G-CSF, 뉴트로진), 동아제약 (G-CSF, 류코스팀) 등이 시장에서 사용되고 있다.

< 단백질제품 국내시장규모 >

(단위:억원)

구 분	의약용 단백질	산업용 단백질	합 계 <sup>1)</sup>
1997년	1,274	1,273	2,547
2000년	2,750	1,330	4,080
2001년	3,555	1,447	5,002
2006년	13,663	2,220	15,883
2011년	120,800	15,000	135,800
2015년	220,000	23,000	243,000
2016년	242,000	27,500	269,500
2017년	266,000	30,100	296,100
2018년	298,000	31,500	329,500
2019년	310,000	33,000	343,000
2020년	341,000	35,000	376,000
2021년	355,000	39,500	394,500

\* 산출근거: 산업자원부 자료(Technology Roadmap: 단백질 제품), 한국부품소재산업진흥원 자료(의료용 및 산업용 단백질 소재 가공 및 생산을 위한 난발현성 효소 생산 기술)를 근거로 추정.

## 2. 시장구조 및 경쟁현황

분자농업 기술은 미생물 및 동물 체제를 이용하여 생산이 불가능하였던 고부가가치 재조합 단백질의 생산을 가능하게 하였으며, 다른 체제를 이용하여 생산하였던 단백질도 식물 발현 체제를 통하여 생산할 수 있게 되어 안전하고 경제적인 생산이 가능하게 된다. 특히, trypsin 등과 같은 경우에는 생명공학의 발전에 따라서 산업용으로도 수요가 증가하고 있으나 기존에 동물 장기에서 추출하여 사용하였던 방법이 광우병 등의 인수공통전염병의 문제로 사용이 불가능하게 되어 식물에서의 재조합 trypsin이 대안이 되고 있으며, 식물공장을 통한 생산기반이 확보되면 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 예측된다. 분자농업은 GMO 식물을 기본으로 하기 때문에 분자농업 관련 GMO 작물의 원활한 재배가 불가능하다는 문제가 세계적으로도 공통적으로 산업화에 장애가 되고 있으며, 이를 해결하기 위한 식물공장에서의 재배 및 분리정제 기술 확보 여부가 국제적 경쟁에서 우위를 점할 수 있는 핵심이 될 것으로 예상된다.

## 3. 시장 성숙정도

최근 새로운 질병 치료기술로 주목을 받고 있는 cell therapy (세포치료)방법의 적용을 위한 cell의 생산을 위하여 특정한 단백질 분해효소를 사용해야 하나 이러한 단백질 분해효소는 단백질 분해효소의 특성상 유전자발현에 의한 재조합 단백질로서의 생산이 불가능한 실정이어서 동물 유래의 trypsin을 분리 정제하여 사용할 수밖에 없으나 동물유래의 단백질 정

제과정에서 동물 바이러스의 혼입에 따른 인간에의 2차 감염의 우려가 있으므로 식물에서 생산된 trypsin 등의 수요는 급증 할 것으로 예상된다. 주요 의약품 단백질인 thrombin, factor Xa 등은 동물세포에서 발현시키면 숙주세포가 사멸하는 관계로 동물세포배양을 이용한 재조합단백질의 생산에 제약이 따르며, 동물세포에서만 생산이 가능한 단백질의 경우에도 동물 바이러스의 혼입에 따른 인간에의 2차감염의 우려가 있어 식물에서 생산된 thrombin, factor Xa 등의 수요는 급증 할 것으로 예상된다. 단백질 연구에 필수적인 특정부위를 절단하는 endopeptidase 등 역시 재조합단백질 생산에 어려움이 있으나 생명공학의 발전에 따라서 특정 부위를 절단하는 다양한 endopeptidase의 수요가 급격하게 증가할 것으로 예상된다.

## 제 4절 정책 및 제도 현황

유전자변형농산물이 인체 및 환경에 미칠 수 있는 잠재적 위해성에 대한 우려로 국제적으로 2000년 1월 캐나다 몬트리올에서 유전자변형생물체의 국가간 이동에 있어서 환경 및 인체 안전성 확보를 목적으로 한 국제규범인 바이오안전성 의정서(Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity)가 채택되고, 이에 따라서 지식경제부 주관으로 2001년 3월 ‘유전자변형생물체의 국가 간 이동 등에 관한 법률’이 제정 공포되었다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1절 연구개발수행 내용

### 1. 돼지 유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발 (제 1핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 식물체에서 항원단백질 생산을 위한 식물발현 벡터 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-항원유전자와 Cholera toxin B subunit의 융합유전자를 가진 식물발현벡터의 제작</li> <li>-항원유전자와 E. coli heat-labile toxin B subunit의 융합유전자를 가진 식물발현벡터의 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·벼에서 형질전환을 시키기 위하여 3개의 다른 프로모터를 이용하여 CTB-COE 융합유전자를 포함하는 식물발현벡터를 제작하였음.</li> <li>·벼에서 형질전환을 시키기 위하여 3개의 다른 프로모터를 이용하여 LTB-COE 융합유전자를 포함하는 식물발현벡터를 제작하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환체에서 항원단백질 생산을 위한 벼의 형질전환</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-식물발현벡터를 이용한 벼의 형질전환</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·식물발현벡터를 가지고 벼의 캘러스를 이용하여 bombardment를 이용하여 형질전환 시킴</li> <li>·형질전환된 캘러스로부터 genomic DNA PCR를 수행하여 융합유전자의 도입을 확인하였음.</li> </ul>
<p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식물발현벡터를 이용한 형질전환체 선발 및 재분화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-식물발현벡터를 이용한 벼(신동진)의 형질전환체 선발</li> <li>-형질전환체의 재분화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·3개의 다른 프로모터를 이용하여 CTB-COE 융합유전자로 형질전환된 벼의 형질전환체 선발.</li> <li>·3개의 다른 프로모터를 이용하여 LTB-COE 융합유전자로 형질전환된 벼의 형질전환체 선발.</li> <li>·선발된 형질전환체에서 식물체로의 재분화 유도</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환체의 도입된 유전자의 발현을 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·선발된 형질전환체에서 genomic DNA PCR를 이용한 도입된 유전자의 확인.</li> <li>·항원유전자의 발현을 확인하기 위하여 Northern blot 분석과 western blot 분석을 이용하여 항원유전자의 발현 확인.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-재분화 벼의 homoline 선발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·형질전환체중에서 재분화된 벼를 이용하여 homoline을 선발하기 위하여 약배양을 수행함</li> </ul>
<p>&lt;3차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항원단백질을 발현하는 형질전환체를 이용한 실험동물에서 면역반응유도능력을 확인</li> <li>○ 항원단백질을 발현하는 형질전환 벼의 homoline 선발, 농업형질검사, 환경 위해성 검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-항원단백질 발현 형질전환 식물체 선발 및 확보</li> <li>-발현이 확인된 형질전환 calli를 대량배양을 하여 수확한 후에 실험동물인 쥐에 대하여 경구적인 방법으로 투여하여 항원단백질에 대한 면역반응 유도능력을 확인함.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·항원단백질을 생산하는 형질전환 callus로부터 계속적으로 형질전환 식물체 재분화, 선발, 및 재배</li> <li>·형질전환이 확인된 calli의 cell suspension culture 시스템을 확립하여 대량생산하여 동물실험에 필요한 재료 확보</li> <li>·투여량을 늘리기 위하여 식물체에서 단백질을 추출하여 농축하여 동물실험에 경구적인 방법으로 투여함.</li> <li>·식물 유래 항원단백질을 경구적으로 투여하여 실험동물에서 IgG, IgA 항체, ELISPOT 분석</li> </ul>

	<p>-아그로박테리움을 이용한 벼의 형질전환</p>	<p>·LTB-COE 융합항원유전자를 Ubiquitin promoter의 조절하에 식물발현 벡터를 제작하여 아그로박테리움을 이용한 벼의 형질전환 및 형질전환체 선발</p> <p>·Genomic DNA PCR을 이용하여 target 유전자의 도입 확인</p> <p>·Northern blot 분석을 이용하여 항원유전자의 발현 확인</p> <p>·Western blot 분석을 통하여 융합항원단백질의 발현 확인</p> <p>·Gm1-ELISA를 이용하여 발현된 항원단백질의 수용체에 대한 결합능 확인 및 형질전환체에서 항원단백질 발현량 확인.</p> <p>·Real-time PCR를 이용하여 식물체에 도입된 항원유전자의 copy 수를 확인</p>
	<p>- M-cell binding peptide Col과 융합항원단백질 발현 형질전환체</p>	<p>·Col-COE 융합항원단백질 발현을 위한 식물발현벡터 제작</p> <p>·벼의 형질전환 및 형질전환체 선발</p> <p>·Genomic DNA PCR을 이용하여 target 유전자의 도입 확인</p> <p>·Northern blot 분석을 이용하여 항원유전자의 발현 확인</p> <p>·Western blot 분석을 통하여 융합항원단백질의 발현 확인</p> <p>·형질전환체에서 항원단백질 발현량 확인</p> <p>·Real-time PCR를 이용하여 식물체에 도입된 항원유전자의 copy 수를 확인</p>
	<p>-약배양을 이용하여 homoline인 계통을 확보하고 각 계통에서 항원단백질을 고발현하는 개체를 선발을 함</p>	<p>·LTB-COE 형질전환 식물체 pMYV109#6와 pMYV110#3, #6를 선택하여 약배양 수행함.</p> <p>·약배양을 수행하여 배수체로 보이는 식물체를 토양에 이식하여 종자를 만들고 있음.</p>
<p>&lt;4차년도&gt; ○ 항원단백질을 발현하는 형질전환체를 이용한 실험동물에서 면역반응유도능력을 확인</p> <p>○ 다른 epitope를 포함하고 있는 항원단백질의 발현을 위한 식물 형질전환 및 동물실험</p>	<p>-전년도에 확인된 동물실험결과를 다시 확인하고 동물실험에서 효율적인 면역반응 유도의 증진을 위한 조건의 확립</p>	<p>·LTB-COE, CTB-COE와 COE-Col 항원단백질을 발현하는 형질전환 벼의 캘러스에서 단백질을 추출하여 농축한 후에 항원단백질의 양을 2 배 정도 늘려서 동물실험을 수행한 결과 전년도 결과를 재확인하였음.</p> <p>·전년도 결과와 유사하게 항원단백질을 먹인 실험군에서 대조군에 비해서 확실한 IgG와 IgA 항체 유도를 보였고 COE-Col 항원단백질을 먹인 실험군에서 LTB-COE와 CTB-COE 실험군에 비해서 높은 면역반응을 보였음.</p>
	<p>-LTB-COE 항원단백질을 발현하는 형질전환 벼의 종자를 이용한 실험동물인 쥐에서 경구적인 방법을 feeding하여 동물실험</p>	<p>·LTB-COE 항원단백질을 발현하는 형질전환 벼의 종자를 항원단백질의 발현을 유도하여 발현을 확인하였고 또한 수용체인 GM1-ganglioside에 대한 기능을 확인하였음.</p> <p>·항원단백질의 발현을 유도한 종자를 쥐에 자의적인 방법으로 먹게 한 후에</p>

		<p>항원단백질에 대한 항체를 분석한 결과 LTB 항원단백질에 대한 항체 반응은 확인되었으나 COE 항원단백질에 대한 항체를 확인하지 못하였음.</p>
	<p>-약배양을 이용하여 확보된 homozygous lines과 agrobacterium 방법으로 형질전환한 lines에서 도입된 유전자를 분석하여 event line의 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·약배양을 이용하여 얻은 homozygous 형질전환 벼(pMYV110와 pMYV109)를 재배하여 wild type과 유사하게 성장하는 것을 확인함.</li> <li>·약배양에서 얻은 homozygous 형질전환 벼와 Agrobacterium- mediated 형질전환 방법에 의해서 얻은 형질전환 식물체에서 1 copy 항원유전자를 확인하기 위하여 quantitative Real Time PCR 수행하여 항원유전자의 copy number를 결정하였음.</li> <li>·RT PCR 결과 1 copy로 확인된 식물체에 대해서 Southern blot analysis를 수행하여 재확인함.</li> <li>·도입된 항원유전자의 도입부위를 확인하기 위하여 Flanking T-DNA sequencing 분석 결과 intergenic 위치에서 도입된 것을 확인함.</li> <li>·5 차년도 목적동물을 대상으로 수행할 동물실험에 이용하기 위하여 event line을 재배 중임.</li> </ul>
	<p>-면역반응의 효율 높이기 위하여 다른 epitope 부분을 포함하고 있는 S1D 항원유전자에 대한 식물형질전환, 분자생물학적 분석 및 동물실험</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·S1D, CTB-S1D, S1D-Co1 융합항원유전자를 transient expression을 위하여 식물발현 벡터를 제작함.</li> <li>·Transient expression을 이용하여 N. benthamiana에서 S1D, S1D-Co1와 CTB-S1D 항원유전자의 발현을 확인하였음.</li> <li>·S1D, S1D-Co1,S1D-LL37 항원유전자를 벼에서 발현하기 위한 식물발현 벡터 제작</li> <li>·S1D, S1D-Co1, S1D-LL37 항원유전자를 벼에 형질전환하였고 genomic DNA PCR, Northern blot 분석, western blot analysis를 이용하여 항원유전자의 발현을 확인 하였음.</li> <li>·발현된 S1D 항원단백질의 N-glycosylation을 deglycosylation enzymes를 처리하여 확인하였음.</li> <li>·S1CD, S1CD-Co1 항원유전자의 transient 발현을 위한 식물발현벡터 제작</li> <li>·S1CD와 S1CD-Co1 항원유전자를 N. benthamiana에서 vacuum infiltration 방법을 이용하여 대량생산이 가능한 것을 확인함.</li> <li>·식물에서 만들어진 S1D, S1D-Co1와 S1D-LL37 항원단백질을 경구적인 방법으로 feeding한 동물실험에서 4 주째 sample에서 S1D, S1D-Co1와 S1D-LL37 항원단백질을 먹인 실험군에서 대조군에 비해 높은 IgG 항체 유도를 확인함.</li> <li>·7 주째 까지 feeding한 후에 항원단백질에 대한 IgA에 대한 면역반응을 확인함</li> </ul>
	<p>-항원단백질을 생산하는</p>	<p>·목적동물인 돼지에서 동물실험을 위한</p>



<p>&lt;5차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 목적동물에서 항원단백질을 발현하는 형질전환 식물체에 대한 면역반응 유도 능력 확인</li> <li>○ 항원단백질을 발현하는 형질전환 벼의 event line의 선발</li> </ul>	<p>형질전환 식물체를 이용한 목적동물에서 면역반응 유도능력 확인.</p>	<p>형질전환 식물체를 대량 생산하여 동물실험에 필요한 재료 확보하였고 전북대학교 수의대학 김원일 교수 팀과 실험을 같이 수행함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·형질전환 식물체에서 항원단백질의 발현을 유도하고 목적동물에서 경구적인 투여로 면역반응 유도능력 확인을 위하여 경구적인 방법으로 투여하여 항체단백질에 대한 항체 반응을 확인함</li> <li>·목적동물에서 자돈에 대한 passive 면역반응 분석 결과 돼지 유행성 설사병에 대한 방어능력에 대한 가능성을 확인</li> </ul>
	<p>-S1CD 항원단백질에 대한 면역반응 유도 능력의 확인을 위한 동물실험</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·형질전환 식물체에서 발현된 S1D 항원단백질에 대한 면역반응 유도 능력 확인을 하기 위하여 실험동물인 쥐에 경구적인 방법으로 투여</li> <li>·실험동물에서 항원단백질에 대한 IgG와 IgA 항체 반응을 확인하지 못 하였음.</li> </ul>
	<p>-선발된 항원단백질을 발현하는 event line의 농업형질검사 및 환경위해성 검사를 수행함.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·도입된 항원유전자가 1-2 copy인 식물체의 종자를 확보하고 선발된 형질전환 식물 계통에 대한 농업형질을 확인하기 위하여 경북대학교 부속실험실습장 내의 농촌진흥청 지정 “GMO 벼 특성 평가 포장”에서 2013년 하계에 수행함.</li> <li>·성숙기에 최종적으로 불임성이 없이 정상적으로 등숙한 개체를 수확함.</li> </ul>

2. 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 신제품 개발 (제 1핵심 2 세부과제: (주)젠다스)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;1-2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 노다바이러스 항원단백질 유전자 분리 및 재조합단백질 생산</li> </ul>	<p>-노다바이러스 particle로부터 항원단백질 유전자를 PCR로 클로닝</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·뇌 및 척추대 신경에 병변을 일으켜 특이적인 신경증상 (선회 또는 돌발적 유행과 척추만곡등의 증상)을 보이므로 이러한 증상을 보이는 개체를 구입, 선별하여 실험에 이용함</li> <li>·감염개체의 뇌, 비장, 신장으로부터 total RNA를 추출하였음</li> <li>·RT-PCR로 유전자 클로닝 후 pRSET 벡터로 도입, 염기서열 확인</li> </ul>
	<p>-대장균에서 재조합 항원단백질 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Sequence가 확인된 construct를 대장균 BL21로 도입</li> <li>·IPTG로 단백질 발현을 유도하고 매 시간마다 sampling하여 SDS-PAGE에서 전개하고 Coomassie blue로 염색하여 단백질의 발현을 확인</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 노다바이러스 항원단백질 항체생산</li> </ul>	<p>-토끼에서 노다바이러스 항원단백질 항체 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·6주령 암컷 토끼 (New Zealand albino)에 재조합 항원 500<math>\mu</math>g을 Freund's complete adjuvant 500<math>\mu</math>l와 혼합 후 피하접종을 실시</li> <li>·2주 간격으로 동량의 항원에 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 2회 더 boosting을 실시</li> <li>·최종 접종 후 7일 후 토끼에서 혈청을</li> </ul>

		분리하고 항원-항체반응을 ELISA로 확인
○ 항체가 상승을 위한 키토산 formulae 개발	-chitosan formulae 개발을 위한 resin 합성가능여부 확인	·Chitosan 결정화제인 STP (sodium triphosphate)를 첨가함 ·다양한 용매로 결정화 시도
○ 어류 사료내의 담배 식물재료 최적 formulae 개발	-어류사료 최대 함유율 측정	·식물함유량을 10, 20, 30%가 되도록 사료성분 조정 후 급이실험
○ 노다바이러스 항원단백질 유전자의 식물체 발현 최적화를 위한 코돈 최적화 및 색소체 형질전환 벡터내로 도입	-원핵생물 유래의 유전자를 담배색소체 translational machinery에 맞도록 코돈을 최적화	·노다바이러스 항원단백질유전자를 담배색소체 codon usage에 적합하게 변환 ·유전자합성을 위한 올리고 디자인 ·overlap extension PCR으로 유전자 합성 ·합성된 유전자를 클로닝벡터로 도입 후 염기서열을 확인
	-제한효소와 ligase를 이용한 TIARclpGAH 색소체 형질전환벡터 제작	·TIARclpGAH 벡터에서 mGFP를 제거하고 노다바이러스 항원단백질 유전자를 도입하여 TIARclp::synNoda를 제조
○ 노다바이러스 항원단백질 발현 색소체 형질전환 담배 개발	-Bombarding 방법으로 색소체 형질전환체 생산	·TIARclp::synNoda를 Qiagen 사의 plasmid midi kit을 사용하여 DNA를 분리하여 준비함 ·0.6um gold particle로 DNA를 코팅하여 Bio-Rad 사 PDS-1000 기종을 사용하여 Bombarding 방법으로 색소체 형질전환체 생산
	-항원유전자 발현을 DNA 수준에서 조사	·Spectinomycin 선발배지에서 선별된 shoot로부터 genomic DNA 분리하여 PCR분석
○ 노다바이러스 항원단백질 발현 핵 형질전환 담배 개발	-핵형질전환 벡터 제작 및 담배식물체 개발	·담배 핵 codon usage에 맞게 합성된 노다바이러스 유전자를 도입한 핵형질전환용 벡터(pHC30::SynNoda)를 제작한 후 아그로박테리움 매개방법으로 담배 식물체에 형질전환함 ·항생제가 포함된 선발배지에서 shoot을 유도하여 순화시킴
○ T <sub>0</sub> 세대 담배 핵으로 도입된 항원유전자 확인	-항원유전자 발현을 DNA 수준에서 조사	·항생제 첨가 배지에서 재분화된 식물체로부터 genomic DNA를 추출함. ·벡터 특이적인 프라이머 조합 (35S forward 와 NosT reverse)으로 벡터 도입을 확인하여 총 8개 라인을 선별함. ·선별된 라인들 대상으로 Agrobacterium 특이적 프라이머 조합(592 forward 와 592 reverse)으로 PCR을 수행하여 Agrobacterim 오염을 확인한 결과 1개 라인에서 오염이 확인되어 제외시킴.
	-선발배지에서 선별한 핵형질전환체의 RT-PCR 분석	·Genomic DNA PCR로 선별된 식물체를 대상으로 노다바이러스 유전자 특이적 primer로 RT-PCR을 수행하여 RNA 수준에서 유전자 발현이 확인된 세 라인을 선별함.
○ 바실러스에서 노다바이러스	-바실러스 형질전환 벡터 제조	·노다바이러스 항원단백질 유전자를 제한효소를 이용하여 pIC215에 넣은

<p>항원단백질의 생산</p>	<p>-노다바이러스 항원단백질 유전자의 바실러스 형질전환체 개발</p>	<p>·바실러스 발현벡터 (pIC215y::Noda)를 제작함. ·노다바이러스 발현벡터를 단백질 발현용 바실러스 균주 (KCTC1326)에 형질전환하여 xylose로 단백질 발현을 유도함. ·총 단백질을 추출한 후 SDS-PAGE와 western blot 분석으로 단백질 발현을 확인함.</p>
<p>○ Viral expression을 이용한 노다바이러스 항원단백질 생산</p>	<p>-노다바이러스 viral expression 벡터 제조</p>	<p>·노다바이러스 항원단백질을 viral expression system을 이용하여 <i>Nicotiana benthamiana</i> 안에서 transient expression 방법으로 발현시키고자 함. ·노다바이러스 유전자를 pUC18 벡터에 클로닝한 후 단백질 발현벡터인 pGD-AltMV 벡터에 도입하여 최종 viral expression 벡터 (pGD-AltMV::Noda, pGD-AltMV::Noda-Flag)를 제작함</p>
	<p>-Viral expression을 이용한 노다바이러스 항원단백질 생산</p>	<p>·노다바이러스 유전자가 도입된 벡터를 <i>Agrobacterium</i>에 형질전환 한 후 <i>Nicotiana benthamiana</i> 잎에 주사기로 접종시킴. ·접종 후 3, 5, 7, 9일 간격으로 접종부위를 샘플링하여 바이러스 항원단백질 유전자의 발현 및 단백질 발현을 확인함.</p>
<p>&lt;3차년도&gt; ○ 담배(<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun) 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증</p>	<p>-T0, T1세대 항원유전자 발현을 DNA, RNA, 단백질 수준에서 조사</p>	<p>·T0, T1세대 식물체로부터 genomic DNA를 추출한 후 trnI/trnA primer를 이용하여 색소체 게놈내에 목적유전자가 도입 유지됨을 확인함 ·T0, T1세대 식물체로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR로 색소체 형질전환체에서 목표유전자가 발현됨을 확인함 ·Western blot을 통해 T0, T1세대 형질전환체에서 노다바이러스 항원단백질이 발현하는지 여부를 확인함 ·Homoplasmy를 유지하고 있는 색소체 형질전환담배(<i>Nicotiana tabacum</i> Samsun) T1 독립개체 3라인의 검증으로 통해 목표유전자가 세대 간 유지되어 단백질 발현까지 유지됨을 검증 완료함 ·실험동물 급이실험을 위해 western blot의 densitometer를 이용하여 식물체내의 항원단백질의 순수농도를 측정하여 급여량을 결정함 ·항원단백질 발현수준은 total soluble protein의 19.1% - 50.7%에 달하는 매우 높은 수준임 ·노다바이러스 항원단백질의 virus like particle (VLP) 형성을 확인하기 위해 sucrose step/linear gradient를 이용하여 분리정제하였으며 현재 TEM으로 관찰중임</p>
<p>○ 담배(<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun) 핵형질전환 식물체의</p>	<p>-T0세대 항원유전자 발현을 DNA, RNA, 단백질 수준에서 조사</p>	<p>·항생제 첨가 배지에서 재분화된 식물체로부터 genomic DNA를 추출함. ·Genomic DNA PCR로 선발된 식물체를</p>

항원단백질 발현 검증		<p>대상으로 노다바이러스 유전자 특이적 primer로 RT-PCR을 수행하여 RNA 수준에서 유전자 발현이 확인된 세 라인을 선발함.</p> <p>·Western blot을 통해 항원단백질이 발현하는 지 여부를 확인한 결과 단백질수준에서는 검출이 되지 않음</p>
○ 공격접종을 위한 순수노다바이러스 배양	-바이러스 분리 및 배양	<p>·노다바이러스 감염 능성어로부터 바이러스를 분리한 후 RT-PCR로 감염바이러스 최종 확인함</p> <p>·세포 lysate를 fish SSN-1 cell line에 접종하여 CPE 생성을 최종확인하고 cell line을 보관</p>
○ 치어 면역을 통한 항체가 형성 확인	-실험동물에서의 항체유도 조사	<p>·CM-chitin이 adjuvant로 효능이 있는지 최종 확인함</p> <p>·양성대조군 확보 및 감염실험 시 감염개체 양성을 조사에 필요한 3개의 단클론항체 B13, B26, E54에 대한 역가 및 반응능 테스트 완료함</p> <p>·항원단백질이 발현되는 담배로부터 급이실험에 필요한 파우더를 준비하여 현재 마우스에 1주간격으로 4회 구강투여 중이며 투여 완료후 IgG, IgA 농도를 측정하여 항체유도 확인예정</p> <p>·능성어 치어는 봄계절에만 확보 가능함으로 치어 항체유도실험을 봄에 실시할 계획임</p>
○ 니코틴프리 담배( <i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609) 색소체 형질전환 기술 확립(사업단 기반기술)	-Bombarding 방법으로 색소체 형질전환체 T0세대 생산	<p>·TIARclp::synNoda를 Qiagen 사의 plasmid midi kit을 사용하여 DNA를 분리하여 준비함</p> <p>·0.6um gold particle로 DNA를 코팅하여 Bio-Rad 사 PDS-1000 기종을 사용하여 Bombarding 방법으로 니코틴프리 담배 색소체 형질전환체 T0세대 독립라인 13개체 생산함</p>
	-항원유전자 발현을 DNA, RNA, 단백질수준에서 조사	<p>·T0 식물체로부터 genomic DNA를 추출한 후 trnI/trnA primer를 이용하여 색소체 게놈내에 목적유전자가 도입 유지됨을 확인함</p> <p>·T0세대 식물체로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR로 색소체 형질전환체에서 목표유전자가 발현됨을 확인함</p> <p>·Western blot을 통해 T0세대 형질전환체에서 노다바이러스 항원단백질이 발현하는 지 여부를 확인하였으며 최종 11개의 독립라인을 확보함</p>
○ 담배 transient expression system을 이용한 목적단백질 대량생산법 확립(사업단 기반기술)	-노다바이러스 viral expression 벡터 제조	<p>·노다바이러스 항원단백질을 viral expression system을 이용하여 <i>Nicotiana benthamiana</i> 앞에서 transient expression 방법으로 발현시키고자 하였음</p> <p>·노다바이러스 유전자를 pUC18 벡터에 클로닝한 후 단백질 발현벡터인 pGD-AltMV 벡터에 도입하여 최종 viral expression 벡터 (pGD-AltMV::Noda, pGD-AltMV::Noda-Flag)를 제작함</p>
	-Viral expression 벡터를 이용한 transient agro-infiltration assay	<p>·노다바이러스 유전자가 도입된 벡터를 Agrobacterium에 형질전환 한 후 <i>Nicotiana benthamiana</i> 앞에 주사기로 접종시킴.</p> <p>·접종 후 3, 5, 7, 9일 간격으로 접종부위를 샘플링하여 바이러스 항원단백질 유전자의</p>

		<p>발현을 확인함.</p> <p>·그러나 Western blot을 통해 항원단백질이 발현하는 지 여부를 확인한 결과 단백질수준에서는 검출이 되지않음</p> <p>·Agrobacterim vectors pTRAc, pTRAc-rcbs1-cTP, pTRAc-ERH를 이용하여 transient expression를 하고자 함</p>
<p>&lt;4차년도&gt;</p> <p>○ 담배(<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun) 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증</p>	<p>-T2, T3, T4세대 항원유전자 발현을 DNA, RNA, 단백질 수준에서 조사</p>	<p>·T2, T3, T4세대 식물체로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR로 색소체 형질전환체에서 목표유전자가 발현됨을 확인함</p> <p>·Western blot을 통해 T2, T3, T4세대 형질전환체에서 노다바이러스 항원단백질이 발현하는 지 여부를 확인함</p> <p>·Homoplasmy를 유지하고 있는 색소체 형질전환담배 (<i>Nicotiana tabacum</i> Samsun) T2, T3, T4 독립개체 3라인의 검증으로 통해 목표유전자가 세대 간 유지되어 단백질 발현까지 유지됨을 검증 완료함</p>
<p>○ 니코틴프리 담배 (<i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609)색소체 형질전환 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증 (계속)</p>	<p>-T1세대 항원유전자 발현을 DNA, RNA, 단백질 수준에서 조사</p>	<p>·T1세대 식물체로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR로 색소체 형질전환체에서 목표유전자가 발현됨을 확인함</p> <p>·Western blot을 통해 T1세대 형질전환체에서 노다바이러스 항원단백질이 발현하는 지 여부를 확인함</p>
<p>○ 담배 transient expression system을 이용한 목적단백질 대량생산법 확립</p>	<p>-Agrobacterim vectors pTRAc, pTRAc-rcbs1-cTP, pTRAc-ERH를 이용한 transient expression system 확립</p>	<p>·Agrobacterim vectors pTRAc, pTRAc-rcbs1-cTP, pTRAc-ERH를 이용하여 infiltration을 수행</p> <p>·접종 후 3, 5, 7일 간격으로 접종부위를 샘플링하여 바이러스 항원단백질 유전자의 발현을 확인함.</p> <p>·Western blot을 통해 항원단백질이 발현하는 지 여부를 확인한 결과 chloroplast target vector에서 단백질수준에서 발현이 되는 것을 확인함</p>
	<p>-단백질 고발현 벡터 시스템 개발</p>	<p>·pCAMBIA1302 vector의 GFP 유전자 앞부분에 CPMV RNA-2 5' leader (R2L) sequence 도입 후 타겟 단백질 발현 level 확인</p> <p>·Western blot을 통해 항원단백질의 발현 level이 증가 하는지 여부를 확인한 결과 발현이 증가되지 않는 것을 확인함</p> <p>·보유하고 있는 다른 벡터들에도 적용</p>
<p>○ 담배유래 백신효능 실험</p>	<p>-노다바이러스 항원단백질의 면역유도 특성조사 및 중화실험</p>	<p>·능성어 치어에 담배발현 항원단백질 구강투여 후 항원특이적 면역 반응 분석</p>
	<p>-백신의 안전성 조사</p>	<p>·담배발현 항원단백질 구강투여 후 어체 조직의 병리조직학적 검사를 하여 백신의 독성여부 확인</p>
	<p>-mini/midi-scale의 공격접종 실시</p>	<p>·노다바이러스에 노출시킨 후 상대생존을 조사</p>
<p>&lt;5차년도&gt;</p> <p>○ 니코틴프리 담배 (<i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609)색소체</p>	<p>-T2세대 항원유전자 발현을 DNA, RNA, 단백질 수준에서 조사</p>	<p>·T2세대 식물체 생육중 seed 수확인 되는대로 분석실시</p>

형질전환 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증 (계속)		
<p>○ 담배 transient expression system을 이용한 목적단백질 대량생산법 확립</p>	<p>-Agrobacterim vector pTRAKc-rbcs1-cTP::Noda vector 를 이용한 transient expression system 확립</p>	<p>·Agrobacterium vector pTRAKc-rbcs1-cTP::Noda vector에 p19(RNA silencing suppressor)를 적용하여 infiltration을 통한 단백질 발현확인 ·접종 후 5, 10, 15, 20일 간격으로 접종부위를 샘플링하여 바이러스 항원단백질 유전자의 발현을 확인함. ·Western blot을 통해 항원단백질이 발현하는 지 여부를 확인한 결과 chloroplast target vector에서 단백질수준에서 발현이 되는 것을 확인함 ·Agrobacterium vector pTRAKc-rbcs1-cTP::Noda vector를 vacuum inoculation을 통한 단백질 발현 최적 조건 확립 ·실험조건으로는 silwet 농도(0, 100, 200, 300, 400, 500 µl/L), vacuum 압력(5, 15, 25 Hg), vacuum 시간(5, 10, 15, 20분), sampling 시기(3, 6, 9, 12, 15일), sampling 위치(leaf number)로 각각 조건별로 실험을 진행함 ·Western blot을 통해 항원단백질의 발현을 조건별로 확인함 ·최적 조건으로는 silwet 농도 200 µl/L, vacuum 압력은 25 Hg, vacuum 시간은 15분, sampling 시기는 6 ~ 12일, sampling 위치는 7 ~ 8번 앞에서 단백질 발현이 가장 높게 되는 것을 확인함</p>
<p>○ 담배 유래 백신효능 실험</p>	<p>-단백질 고발현 벡터 시스템 개발</p>	<p>·pCAMBIA1302 vector를 이용하여 infiltration 수행 ·Noda 유전자와 Noda 유전자 앞에 signal sequence를 붙인 2개의 벡터를 제작 ·2개 vector 모두 infiltration 을 통해 단백질 발현을 확인 결과 발현이 되지 않는 것을 확인함</p>
<p>○ 담배 유래 백신효능 실험</p>	<p>-담배항원에 대한 능성어 항체 유도 실험(항원 투여농도를 조절한 급이 재실험) -담배항원에 대한 능성어 항체 유도 실험(Transient expression system 유래 담배 항원 급이 실험)</p>	<p>·능성어 치어에 담배 항원단백질을 투여 후 면역원성 확인 ·노다바이러스에 노출시킨 후 상대생존을 조사 ·능성어 치어에 transient expression system 유래 담배 항원단백질을 투여 후 면역원성 확인 ·노다바이러스에 노출시킨 후 상대생존을 조사</p>
<p>○ 형질전환 담배의 품종 보호 출원 및 등록</p>	<p>-형질전환 식물체의 형질 고정 및 특허 출원 -field test를 통한 신품종보호 출원 및 등록과 산업화 추진</p>	<p>·색소체 형질전환 식물체의 형질 고정 확인 ·색소체 형질전환 식물체 관련 특허 출원 ·한국생명공학연구원 생명자원센터에 종자를 기탁 ·field test를 통한 신품종보호 출원 및 등록과 산업화 추진</p>

3. 재조합 산업용 효소 신제품 개발 (제 1핵심- 3 세부과제: (주)엔비엠)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<1차년도> ○ TEV endopeptidase 유전자 합성	-Overlap PCR을 이용한 유전자 합성	·식물코돈에 기초한 고발현 유전자 디자인 ·80mer의 primer 합성 ·Overlap PCR을 이용한 유전자 제작
○ 식물발현벡터의 제작 및 형질전환	-RAmy3D promoter를 이용한 식물발현벡터 제작	·고발현벡터 pMYN77을 이용한 벼 현탁세포 특이적 발현벡터 제작
○ 고생산 세포주의 확립	-유전자총을 이용한 벼의 형질전환	·유전자총을 이용한 벼의 형질전환
○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화	-형질전환 식물체의 재분화	·형질전환 식물체의 재분화
<2차년도> ○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화	- 고생산 식물세포를 이용하여 식물체를 재분화 - 재분화 된 식물체로부터 종자를 확보	·TEV endopeptidase 고생산 식물세포주로부터 N6 식물 재분화 배지를 이용하여 식물체를 재분화 (3 종류 이상의 elite line 확보) ·재분화 된 식물체는 순화하여 포토에 정식하고 유전자변형식물체 전용의 유리온실에서 재배한다. ·형질전환 식물체로부터 종자를 확보한다.
○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사	- TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 - elite line에 대한 농업형질 조사	·Northern blot analysis, Western blot analysis, 효소활성 등의 분자생물학적인 분석결과를 기초로하여 TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 ·TEV endopeptidase 고생산 라인 중에서 homo line을 선발 및 농업형질 조사
○ 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인	- 기질 단백질을 이용하여 TEV endopeptidase의 활성 확인	·TEV endopeptidase 기질 단백질을 이용하여 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인
○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 현탁세포 확립	- TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 액체배양을 위한 현탁세포 유도	·TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 액체배양을 위한 현탁세포를 유도한다. ·air-bubble type bioreactor (10 L) 운용을 위한 기술을 확립 ·air-bubble type bioreactor를 이용하여 TEV endopeptidase 고생산 현탁세포의 대량배양을 위한 기반 확립
<3차년도> ○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line	-TEV endopeptidase 고생산 T1, T2 세대의 종자를 이용하여 <i>in vitro</i>	·TEV endopeptidase 고생산 T1, T2 세대의 종자로부터 callus와 이를 이용한 현탁세포 배양을 실시한다

선발 및 농업형질 조사(2차년도 이후 계속)	내에서의 특성 확인	·상기의 현탁세포로부터 정상적으로 TEV endopeptidase의 생산 여부를 확인 한다
○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주의 cell bank 구축	-세포 동결보존 체계를 확립한다 -생산 공정구축을 위하여 Master Cell Bank와 Working Cell Bank를 구축한다	·TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주를 대상으로 세포 동결보존 체계를 확립하였음 ·TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 공정구축을 위하여 Master Cell Bank와 Working Cell Bank를 구축한다
○ 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 에 대한 생화학적 특성 분석	-식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 생화학적 특성 확인	·식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 생화학적 특성(온도, pH, 활성 Unit 등)을 확인한다
○ 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 대량생산 및 분리정제 체계 확립	-세포주의 대량 배양 최적 조건 확립 -분리정제 체계 확립 (순도 80% 이상)	·TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주의 대량 배양 최적 조건을 확립한다 ·식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 분리정제 체계를 확립한다 (순도 80% 이상)
<4차년도> ○ 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 대량생산 공정 확립(20L/회 이상 생산 능력 확보)	- 20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor의 10대 동시 운용기술 확립	·20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 운용기술 확립 ·20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 10대 이상 동시 운용시설을 구축한다
○ 90% 이상의 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 분리정제 체계 확립	- 90% 이상의 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 분리정제 체계 확립(순도 90% 이상)	·TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주의 대량 배양 후 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 분리정제 체계를 확립 한다(순도 90% 이상)
○ 고순도(90% 이상) TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 생화학적 특성 규명	- 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 생화학적 특성 확인	·식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 생화학적 특성(온도, pH, 활성 Unit 등)을 확인 한다
○ 분리 정제한 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 저장 및 포장기술 확립	- 식물유래 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 최적 buffer 개발 여부 - 최적 제형개발(동결건조 또는 액상) 여부 - 고순도 효소별 specific activity확인 및 1 unit 결정 - 효소활성 확인을 통한 최적 저장조건 확립(저장온도, 저장기간 등) 여부	·식물유래 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 최적 buffer 개발 ·최적 제형개발(동결건조 또는 액상) ·고순도 효소별 specific activity확인 및 1 unit 결정 ·효소활성 확인을 통한 최적 저장조건 확립(저장온도, 저장기간 등)
< 5차년도 > ○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주 선발 완료 식물특허출원	- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주 선발 완료 - TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 에 대한 식물특허출원	·분자 생화학적 방법을 이용하여 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주를 선발 ·연구결과를 근거로 하여 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 에 대한 식물특허출원



<p>○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 제조공정의 scale-up(200L급 이상 바이오 리액터 운용)</p>	<p>- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 연속배양방법 확립 - 200L 규모의 바이오리액터 운용기술 확립 - 200L급 대용량 바이오리액터를 활용한 단백질 생산의 SOP 확립 - 생산된 재조합 단백질의 품질관리(QC) 체계 확립</p>	<p>·관련 연구결과를 종합하여 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 연속배양방법 확립 ·200L 규모의 바이오리액터 운용기술 확립 ·200L급 대용량 바이오리액터 운용을 위한 최적 SOP 확립 ·관련 연구결과를 활용한 최적 품질관리(QC) 체계 확립</p>
<p>○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 고순도(95% 이상) 분리·정제방법 확립</p>	<p>- 200L/회 용량의 배양액 농축기술 확립 - 200L/회 용량의 배양액으로부터 고순도(95% 이상)의 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 분리정제 - 고순도(95%) 효소별 specific activity확인 및 1 unit 결정 - 고순도(95%) 효소에 대한 저장성 확인(저장온도, 저장기간 등)</p>	<p>·200L/회 용량의 배양액 농축기술 확립 ·200L/회 용량의 배양액으로부터 고순도(95% 이상)의 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 분리정제 ·고순도(95%) 효소별 specific activity확인 및 1 unit 결정 ·고순도(95%) 효소에 대한 저장성 확인(저장온도, 저장기간 등)</p>

4. 식물세포배양을 이용한 항체 대량생산 및 기능 분석 (제 1핵심-4 세부과제: 전북대학교)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;1차년도&gt; ○ Amylase와 protease의 발현억제를 이용한 항체 단백질의 발현 증진  ○ 현탁배양에서 생산된 항체에 대한 기능확인</p>	<p>-Amylase와 protease에 대한 siRNA를 제작 및 식물발현 벡터 제작  -FimA 항체를 생산하는 형질전환체에 형질전환  -현탁배양에서 항체 고발현 조건 확립  -현탁배양에서 생산된 항체의 phagocytosis 및 실험동물에서 기능 확인</p>	<p>·Amylase와 CysP 유전자의 발현 억제를 위한 siRNA에 대한 유전자를 제작하여 35S CaMV promoter 조절 하에 식물발현벡터 제작  ·Mylase와 CysP 유전자에 대한 siRNA constructs를 가지고 있는 식물발현벡터를 이용하여 항체를 생산하는 rice callus에 particle bombardment 방법을 이용하여 형질전환을 수행하고 형질전환체 선발 중  ·항체를 생산하는 현탁배양에 대체성 탄소원(fumaric acid, succinic acid, malic acid), 삼투성 제제(NaCl)를 첨가하여 고발현 조건 확립  ·Protein G column를 이용하여 항체 단백질의 분리 및 정제 ·분리된 항체에 의한 P. gingivalis의 부착에 대한 억제 효능을 확인</p>
<p>&lt;2차년도&gt; ○ 식물발현벡터를 이용한 벼의 형질전환체 선발 및 분자생물학적 분석  ○ 항체 발현 현탁배양에서</p>	<p>-Amylase와 Cysteine proteinase의 ihpRNA를 발현하는 식물발현 벡터를 이용한 형질전환 및 분자생물학적분석</p>	<p>·Amylase와 cysteine proteinase의 발현 억제를 위한 pMYP128를 가지고 FimA 항체단백질의 고발현을 보이는 형질전환 캘러스에 형질전환 실시하여 형질전환 캘러스를 확보하였음. ·Genomic DNA PCR를 이용하여 pMYP128 유전자의 도입을 확인함.</p>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>·Western blot 분석 결과 항체 단백질의 증진을 확인하지 못하였고 형질전환 캘러스 갯수가 적어 항체유전자의 heavy와 light chain 유전자와 pMYP128를 동시에 rice embryogenic 캘러스에 형질전환을 수행함.</li> <li>·Genomic DNA PCR를 수행하여 항체유전자와 pMYP128의 도입을 확인함.</li> <li>·SDS-PAGE를 수행하여 분비된 amylase의 감소를 확인함.</li> <li>·Western blot 분석을 수행하여 단백질분해효소의 저해제인 C1-T1 단백질의 발현을 확인함.</li> <li>·Cysteine proteinase의 축적이 감소되었음을 Western blot 분석을 이용하여 확인하였고 배지내의 분비된 cysteine protease의 활성이 감소되었음을 확인함.</li> <li>·항체단백질 #123에서는 생산량이 증진되었음을 확인하지 못하였고 항체단백질 #265에서 2.2 배정도의 증진되었음을 확인함.</li> </ul>
<p>Amylase와 protease의 발현 억제에 의한 항체 생산 증진</p> <p>○ 식물유래 항체에 대한 기능 확인</p>	<p>-FimA 항체단백질의 발현을 증진시키기 위하여 식물에서 외래단백질의 고발현 시스템으로 알려진 transient expression 방법을 이용하여 N. benthamiana에서 수행함</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Agroinfiltration 방법을 이용하여 transient expression을 하기 위하여 pTRAc(cytoplasm), pTRAc-rbcs-1-cTP(chloroplast), pTRAc-ERH(ER)에 대해서 항체유전자를 cloning하여 식물발현벡터를 제작하였음.</li> <li>·N. benthamiana에 agroinfiltration 방법을 이용하여 발현을 확인한 결과 cytoplasm과 chloroplast에서는 발현을 확인하지 못하였고 ER에 targeting한 항체단백질의 발현을 확인하였음. ·항원단백질의 발현량은 agroinfiltration 후 6일째에 total soluble protein의 0.13%으로 확인하였음.</li> </ul>
	<p>-식물세포현탁배양에서 발현된 항체단백질의 기능 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·식물세포현탁배양에서 생산하여 크로마토그래피 방법을 이용하여 순수분리한 #265 항체단백질의 invasion assay를 수행하여 항체단백질의 치주균에 대한 세포내 침투 능력이 억제되었음을 확인함.</li> <li>·식물세포배양에서 생산하여 순수분리한 #265 항체단백질의 phagocytosis assay를 수행하여 neutrophill를 이용하여 FimA 항체에 의해서 치주균의 phagocytosis가 증가되었음을 확인함.</li> <li>·식물세포배양에서 생산하여 순수분리한 #265 항체단백질의 bacterial killing assay를 수행하여 항체에 의해서 neutrophill의 치주균의 사멸능이 증가되었음을 확인함.</li> </ul>
<p>&lt;3 차년도&gt;</p> <p>○ 항체 단백질 고발현 형질전환 세포주 선발 및 대량생산을 위한 조건 확립</p> <p>○ 항체 단백질 발현</p>	<p>-항체단백질 고발현 형질전환 세포주 선발 및 대량생산을 위한 조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·형질전환 세포주에서 항원단백질 고생산 식물 세포주를 선발하기 위하여 식물세포 현탁 배양 확립함</li> <li>·식물세포 현탁배양에서 항체단백질, amylase, proteinase activity, C1-T1 발현등을 확인함</li> <li>·항체단백질 발현을 하는 세포주 특허를 위한 출원 준비함</li> </ul>

형질전환 식물체 선발		·고발현세포주의 대량생산을 조건 확립
	-항체단백질 발현 형질전환 식물체 선발	·Rice amylase 1A promoter 조절하에 항체유전자 발현을 위한 식물형질전환을 위한 식물발현벡터 제작 · 식물발현 벡터의 Agrobacterium 형질전환 ·Agrobacterium-mediated 형질전환 방법을 이용한 벼의 형질전환을 수행함 · 형질전환 식물체의 종자에서 항체단백질 낮은 발현을 확인함 · 벼의 종자에서 강력한 promoter를 찾기 위하여 실험을 하고 있음.

5. 경구백신 효율 증진 방안 및 백신 효능 검정 연구 (제 2핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;1차년도&gt;</p> <p>○ 소장 점막 면역계에서 항 펩타이드에 의하여 유도되는 면역반응 특성 분석</p>	<p>- 소장의 점막에서 점막 면역세포 확보</p> <p>- 분리된 점막 면역계 세포들에 항 펩타이드를 처리한 후 나타나는 cytokine의 mRNA를 qRT-PCR을 통하여 확인</p> <p>- 분리된 점막 면역계 세포들에 항 펩타이드 처리 3일 후 나타나는 cytokine의 양을 ELISA 및 ELISPOT을 통하여 확인</p> <p>- 분리된 점막면역계 세포들에 항 펩타이드 처리 3일 후 특정 cytokine을 발현하는 세포 집단 확인</p>	<p>· 소장의 점막면역 유도조직 및 실행조직으로부터 collagenase와 Percoll을 이용한 면역세포 확보</p> <p>· 분리된 소장의 점막 면역세포들에 항 펩타이드 LL-37을 처리한 후 시간별로 Th17 cell 유도에 중요한 cytokine으로 알려진 IL-6와 TGF-b mRNA 변화를 qRT-PCR을 통하여 측정하여 발현 특성을 규명</p> <p>· 분리된 소장의 점막 면역세포에 항 펩타이드 LL-37을 처리하고 LL-37 농도에 따른 IL-17의 발현 특성 규명</p> <p>· 분리된 소장의 점막 면역 세포들에 대한 항 펩타이드 LL-37을 배양한 결과 3일째 IL-17을 발현하는 세포수의 증가 규명</p> <p>· 분리된 소장의 점막 면역 세포들에 대한 항 펩타이드 LL-37을 배양한 결과 3일째 IL-23R mRNA(Th17 cell 특성) 발현 증가 규명</p> <p>· 분리된 소장의 점막 면역 세포들에 대한 항 펩타이드 LL-37을 배양한 결과 3일째 LL-37의 예상 receptor인 P2X7 receptor mRNA 발현 규명</p> <p>· 분리된 소장 면역 유도조직 면역 세포들에 항 펩타이드 LL-37을 처리한 결과 3일째 IL-17을 발현하는 세포가 증가하는지 FACS로 확인</p>
<p>○ M cell model 단백질 분석</p>	<p>- <i>In vitro</i> cultured M cell에서 mouse 및 human M cell marker로 알려진 GP2 protein의 발현을 통해 M cell 분화 검증</p> <p>- 분화된 M cell과</p>	<p>· <i>In vitro</i> M cell model을 이용한 M cell 분화 및 GP2 단백질의 발현을 confocal laser scanning microscopy를 통해 확인</p> <p>· 사전연구에서 알게 된 M cell targeting ligand Col1의 정보를 바탕으로 cultured M</p>

	<p>미분화된 M cell에서 CD88의 발현을 confocal laser scanning microscope(CLSM)를 통해 확인</p>	<p>cell에서 CD88의 발현을 확인한 결과 Caco-2 mono-cultured cell에서는 발현하지 않지만, co-cultured M cell 에서는 발현하는 CD88의 발현 특성 규명</p>
<p>○ 표지 항원 및 항 펩타이드 확보</p>	<p>- 항 펩타이드를 포함하는 표지항원 발현 벡터 제작 및 재조합 단백질 확보</p>	<p>· 표지항원인 EGFP의 c-terminal에 항 펩타이드 LL-37 유전자를 삽입하여 재조합 벡터 제조 · <i>E. coli</i> system에서 발현 및 Ni-NTA affinity chromatograph를 통해 재조합 항원단백질의 분리 및 정제</p>
<p>&lt;2차년도&gt; ○ 소장 점막 면역계의 유도 조직에서 항 펩타이드(LL-37) 처리에 의한 면역 세포들의 변화 특성 분석</p>	<p>- 점막 면역계에서 Th17 cell 분화에 깊게 관여 하는 CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> 세포가 항 펩타이드 LL-37에 의해 유도되는 것을 FACS, real time PCR 및 CLSM 을 통하여 검증  - LL-37에 의해 conditioning 된 PPL이 Th17 cell의 분화를 유도함을 검증</p>	<p>· 소장의 점막면역 유도조직(Peyer's patch; PP)으로부터 collagenase를 사용하여 세포들을 분리한 후, percoll을 사용한 밀도차를 이용하여 lymphocyte(PPL)만 분리 · 분리된 PPL중 CD4<sup>+</sup> T cell을 depletion시켜 CD4<sup>-</sup> PPL population을 확보  · CD4<sup>-</sup> PPL은 항펩타이드 LL-37과 함께 1시간, 3시간, 또는 24시간 배양 · LL-37과 함께 배양된 CD4<sup>-</sup> PPL surface marker(CX3CR1 및 CD70)의 발현 변화를 FACS, real-time PCR, 그리고 CLSM을 통하여 분석 · CD4<sup>-</sup> PPL은 LL-37과 3시간 배양을 통해 conditioning 된 후, CD4<sup>+</sup> T cell population과 <i>in vitro</i> 배양 후 5일째 Th17 cell의 분화를 FACS로 확인</p>
<p>○ M cell에서 발현 되는 C5aR 특성 분석을 통해 M cell의 항원 유입 기작에 대한 이해</p>	<p>- human cell line Caco-2 와 Raji를 이용한 <i>in vitro</i> M like cell을 분화 유도 및 분화 유도된 M cell에서 얻은 cell lysate로부터 C5aR의 발현을 real time PCR 과 Western을 통해서 검증  - Mouse PP의 M cell 및 villi에서 C5aR의 발현을 CLSM을 통해 확인  - Mucosal pathogen(<i>Y. enterocolitica</i>)의 경구 투여를 통한 infection후 M cell에서 <i>Y. enterocolitica</i> 와 C5aR의 발현 및 phosphorylation을 CLSM 을 통해 확인  - C5aR의 target receptor 로써의 기능을 <i>Y.</i></p>	<p>· 1차 년도에 <i>in vitro</i> human M-like cell에서 CLSM을 통하여 그 발현이 확인되었고, M cell targeting ligand Col1의 receptor로 확인된 C5aR를 real time PCR 및 Western 과 FACS를 통해 검증  · C5aR가 mouse PP M cell 및 villi에서도 발현됨을 mouse C5aR 항체를 이용한 CLSM으로 검증  · Mucosal pathogen <i>Y. enterocolitica</i>의 경구 투여를 통한 M cell invasion을 확인 · <i>Y. enterocolitica</i>의 M cell invasion에 의한 C5aR의 발현 및 phosphorylation을 CLSM을 이용하여 확인 · C5aR의 mucosal target receptor로써의 기능을 예측  · <i>Y. enterocolitica</i>의 OmpH를 C-terminal에서 발현하는 reporter protein EGFP를 경구 투여를 통해 oral priming 효과가 OmpH에</p>

	<p><i>enterocolitica</i>의 outer membrane protein H(OmpH)의 targeting을 이용하여 oral priming 효과로 검증(3차년도 예정 연구 내용)</p>	<p>의해 증가 높아짐을 확인하여 C5aR의 target receptor로써의 가능성을 검증(3차년도 예정 연구 내용 진행 중)</p>
<p>○ 항 펩타이드 LL-37의 항원 전달 능력 분석을 통한 효과적인 점막 백신 보조제의 개발</p>	<p>- <i>In vitro</i> cultured M-like cepp의 분화를 유도한 후 LL-37의 receptor인 P2X7 receptor의 mRNA의 발현을 real time PCR을 통해 확인</p> <p>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37의 mouse M cell에 targeting을 CLSM을 통해 확인</p> <p>- 항 펩타이드를 포함하는 EGFP-LL-37을 이용한 경구투여는 항원 EGFP에 대한 점막 및 전신 면역 반응을 증가시킴으로써 점막 보조제로의 가능성을 검증(3차년도 예정 연구 내용)</p>	<p>· <i>In vitro</i> cultured M-like cell이 분화 유도 되었을 때 LL-37의 receptor로 알려진 P2X7 receptor의 발현이 증가됨을 확인함으로써 항 펩타이드 LL-37의 M cell targeting에서의 기능을 예측</p> <p>· Mouse의 점막 유도조직 PP의 cryosectioned sample에서 <i>in vitro</i>에서 LL-37이 M cell에 결합하는 특성 및 경구투여를 통하여 얻은 PP의 M cell targeting을 통한 항원전달 능력을 CLSM을 통해 검증</p> <p>· 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37의 mouse system에서 경구투여를 통한 oral priming 효과를 ELISA 및 ELISPOT을 통해 확인(3차년도 예정 연구 내용 진행 중)</p>
<p>&lt;3차연도&gt; ○ 항 펩타이드의 점막면역 조절 기작에 대한 분석</p>	<p>- <i>In vitro</i> M-like cell model을 이용하여 modulation된 Peyer's patch lymphocyte(PPL)의 surface marker 및 발현 cytokine을 FACS 분석을 통하여 확인</p> <p>- <i>In vitro</i> M-like cell에서 항 펩타이드 LL-37의 발현을 qRT-PCR 및 Western blotting을 통하여 확인</p> <p>- <i>In vivo</i> mouse model에서 commensal bacteria의 대사산물인 butyrate 및 독소</p>	<p>· <i>In vitro</i> M-like cell과 함께 배양된 PPL은 M-like cell에 의한 micro-environment에 의해 modulation 될 것으로 기대되어 surface marker인 CX3CR1과 CD70의 발현 정도를 FACS를 통하여 확인한 결과 M-like cell에 의한 modulation은 whole PPL에서 CX3CR1과 CD70의 발현을 증가시키는 것으로 확인하여 예측이 정확했음을 확인</p> <p>· M-like cell에 의해 modulation된 cell population의 특성 분석을 위하여 cytokine ELISPOT 분석 결과 IL-17A와 IFN-g secretory cell의 증가를 확인하여 LL-37에 의한 점막면역계 세포의 조절에 대한 사전 지식 확보</p> <p>· M-like cell에서 발현되는 modulator로써 항 펩타이드 LL-37이 발현되는 것을 qRT-PCR을 통한 mRNA level과 Western blot을 통한 protein level에서 확인하여 점막면역계에서 LL-37 발현 검증</p> <p>· Mouse CRAMP의 발현양을 조절하는 <i>in vivo</i> mouse model에서 CRAMP의 증가 환경에 의한 PP M cell 근처에서의 CX3CR1<sup>+</sup> cell의 증가 및 IL-17 secretory cell의 변화를 ELISPOT 및</p>

	단백질인 CT에 의한 점막 면역세포들의 변화를 FACS 및 ELISPOT 분석을 통하여 확인	FACS를 통해 검증(4차년도 예정 연구 내용 추가 진행 중)
○ 항 펩타이드의 점막 보조제로써 기능 및 특성 분석	<p>-펩타이드를 포함하는 EGFP-LL-37을 경구 백신 모델에 적용 후 항원 특이적 면역반응의 유도를 ELISA와 ELISPOT 분석을 통하여 확인</p> <p>-펩타이드를 포함하는 EGFP-LL-37을 경구 백신 모델에 적용 후 유도되는 면역반응의 특성을 cytokine ELISPOT 및 T cell proliferation 분석을 통해 검증</p> <p>-펩타이드를 포함하는 dengue virus(DENV) EDIII-LL-37을 경구 백신 모델에 적용 후 EDIII 특이적 면역반응의 유도를 ELISA 및 ELISPOT 분석을 통해 확인</p>	<p>·펩타이드를 포함하는 EGFP, EGFP-LL-37, EGFP + CT를 2주간 경구로 투여한 후 4주 동안 serum과 fecal extract를 얻은 후 항원인 EGFP에 대한 IgG와 IgA의 level을 ELISA를 통하여 확인한 결과 LL-37을 포함하는 항원이 투여된 개체에서 EGFP 특이적 면역반응이 매우 높게 유도된 것을 확인</p> <p>·항 펩타이드 LL-37의 점막 보조제로써의 특성을 파악하기 위해 spleen과 PP에서 lymphocyte를 확보한 후 항원 특이적 항체를 분비하는 세포의 수 증가 확인</p> <p>·항 펩타이드 LL-37의 점막 보조제로써의 특성을 파악하기 위해 spleen과 PP에서 lymphocyte를 확보한 후 Th1/2/17 secretory cell을 분석한 결과 Th1/17 secretory cell이 높게 증가한 것을 확인하여 LL-37의 점막면역 보조제로서의 작용 기작에 대한 정보 확보</p> <p>·항 펩타이드 LL-37의 점막 보조제로써의 특성을 파악하기 위해 spleen에서 lymphocyte를 얻은 후 항원에 따른 proliferation을 tritium uptake를 통해 검증한 결과 T cell mediated immune response의 유도가 확인</p> <p>·Oral tolerance를 유도하지 않음은 systemic challenge를 통해 동일한 방법으로 다시 검증</p> <p>·실제 항원에 적용 여부를 검증하기 위하여 DENV의 EDIII protein의 C-terminal에 LL-37을 적용한 결과 모델 항원의 EGFP 결과와 동일하게 항원 특이적 면역 반응 유도 및 Th1/17 유도 면역 반응이 진행된 것을 검증</p> <p>·펩타이드를 포함하는 EDIII-LL-37을 경구 백신 모델에 적용 후 유도되는 면역반응의 특성을 cytokine ELISPOT 및 T cell proliferation 분석을 통해 검증</p>
○ M cell의 target receptor, C5aR를 통한 점막 보조제 개발	<p>- C5aR knock-out mouse를 이용하여 <i>Y. enterocolitica</i>의 OmpH <math>\alpha 1</math> helix의 점막 보조제로의 가능성을 검증</p> <p>- <i>Y. enterocolitica</i>의 OmpH의 <math>\alpha 1</math> helix를 포함하는 재조합 단백질</p>	<p>·C5aR의 M cell targeting receptor로써의 기능 검증을 위해 C5aR knock-out mouse에 EGFP-OmpH 경구백신 모델을 적용한 결과 C5aR knock-out mice에서는 OmpH의 효과가 보이지 않음을 확인하여 OmpH의 점막면역 보조제의 기능이 C5aR로의 항원 targeting 및 신호전달 유도에 의함을 확인</p> <p>·OmpH ligand의 실제 항원에서의 적용을 확인하기 위해 DENV의 EDIII protein의 c-terminal에 OmpH ligand를 적용한 후 경구</p>

	<p>DENV EDIII-OmpH를 경구 백신 모델에 적용 후 항원 특이적 면역반응의 유도를 ELISA 및 ELISPOT 분석을 통해 확인</p> <p>-C5aR의 ligand 중 하나로 기대되는 <i>Y. enterocolitica</i>의 OmpH의 <math>\alpha</math> 1 helix를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-OmpH를 경구 백신 모델에 적용 후 유도되는 면역 반응의 특성을 cytokine ELISPOT 및 T cell proliferation을 통해 확인</p>	<p>백신 모델에 적용 후 항원 특이적 면역 반응의 유도를 확인한 결과 OmpH ligand에 의한 항원 특이적 항체의 증가를 serum 과 fecal extract로부터 ELISA를 통해 확인하여 model 항원뿐만 아니라 병원체 항원에서도 OmpH ligand가 효과적으로 사용될 수 있음을 확인</p> <p>·OmpH ligand에 의해 항원 특이적 항체를 분비하는 세포들이 전신 및 점막 면역계에서 모두 증가한 것을 ELISPOT을 통해 확인</p> <p>·Oral priming effect를 systemic challenge를 통해 확인 한 결과 OmpH ligand를 포함하는 항원이 경구 투여된 개체에서 항원 특이적 면역 반응 유도 및 T cell-mediate immune response의 유도가 ELISPOT 과 tritium uptake를 통해 검증</p> <p>·따라서 현재까지 잘 알지 못하였던 M cell로의 항원유입 경로를 파악할 수 있는 시스템으로서의 C5aR 이용 가능성을 확보</p>
<p>&lt;4차년도&gt; ○ <i>In vivo</i> mouse 모델에서 항 펩타이드 LL-37 의 점막 면역 조절 체계 분석</p>	<p>- 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질에 의한 점막 면역세포들의 innate &amp; adaptive 관련 유전자들의 profiling을 PCR array를 통해 확인</p> <p>- 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 germinal center 형성 및 isotype switch에 대한 특성을 confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 통해 검증</p> <p>- 항 펩타이드 LL-37 및 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 <i>in vitro</i> 처리에 따른 Th17 세포성 면역 조절 특성 분석을 flow</p>	<p>· 항 펩타이드 LL-37의 보조제로서의 기능 검증을 위해 점막 유도조직의 면역 세포들을 얻어 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 항원을 24시간 동안 처리한 결과 germinal center 형성에 관련된 chemokine(CXCL13, BAFF 등) 들의 발현이 transcript 수준에서 증가한 것을 PCR array system을 이용하여 확인</p> <p>· 항 펩타이드 LL-37의 보조제로서의 기능 검증을 위해 점막 유도조직의 면역 세포들을 얻어 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 항원을 24시간 동안 처리한 결과 면역증진효과에 기여하는 inflammatory cytokine들의 mRNA발현의 증가를 PCR array를 이용하여 확인</p> <p>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 항원의 경구 투여 7일 후 점막의 유도조직 Peyer's patch에서의 germinal center가 크고 조직화 되어있으며, IgA isotype switching이 촉진되고 있음을 항 GL7 항체와 항 IgA항체를 이용한 CLSM을 통해 확인</p> <p>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 항원의 경구 투여 14일에 점막과 전신 면역계를 연결하는 mesenteric lymph node에서 germinal center의 수가 증가 하였으며, IgG isotype switching이 촉진되고 있음을 항 GL7 항체와 항 IgA항체를 이용한 CLSM을 통해 확인</p> <p>· 점막 유도조직의 면역세포에 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질을 처리 했을 때, IL-2, IL-6, IL-17A, TNF 발현의 증가를 CBA assay를 통해 확인</p> <p>· 점막 유도조직의 면역세포에 항 펩타이드</p>

	<p>cytometry, cytometry bead array assay(CBA assay) alc CLSM을 통하여 검증</p> <p>- 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 Th17 세포성 면역 조절 특성 분석을 flow cytometry, CBA assay 및 CLSM을 통해 검증</p>	<p>LL-37을 포함하는 재조합 단백질을 처리 했을 때 CD4<sup>+</sup>IL17A<sup>+</sup>세포의 비율이 재조합 단백질만 처리된 세포들에 비해 증가함을 intracellular cytokine staining을 이용한 flow cytometry를 통해 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 점막 유도조직의 면역세포에 항 펩타이드 LL-37를 처리 5일 후 IL-2, IL-6, IL-17A, TNF의 발현의 증가를 CBA assay를 통해 확인</li> <li>· 점막 유도조직의 면역세포에 항 펩타이드 LL-37를 처리 5일 후 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>이 scramble peptide처리 보다 증가 한 것을 확인 하여 LL-37을 포함하는 재조합 단백질에 의한 Th17 세포의 증가가 LL-37 펩타이드에 의해 유도된 것을 intracellular cytokine staining을 이용한 flow cytometry 분석을 통해 검증</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여 7일에 얻은 면역 유도조직 Peyer's patch의 CD4<sup>+</sup>면역세포들은 항원에 대해 IFN-<math>\gamma</math>, IL-6, IL-17A의 발현을 증가함을 CBA assay를 통해 확인</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여 7일에 얻은 면역 유도조직 Peyer's patch의 CD4<sup>+</sup>세포들은 항원에 대해 IL-17A의 분비가 증가하는 것을 intracellular cytokine staining을 이용한 flow cytometry 분석을 통해 검증</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여 7일에 얻은 면역 유도조직 peyer's patch의 Th17세포들은 주로 germinal center에 위치하고 있는 특성을 파악</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여 3일 후 CD11c<sup>+</sup> 세포들을 MACS column을 통해 확보</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37의 경구 투여에 의해 활성화된 CD11c<sup>+</sup> 세포들은 주로 IL-6를 분비하고 있음을 확인</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37의 경구 투여에 의해 활성화된 CD11c<sup>+</sup> 세포들은 CD70을 발현하는 mature 형태의 DC임을 CLSM을 통해 확인</li> </ul>
<p>○ 항 펩타이드의 점막면역 보조제로써 기능 및 특성 분석</p>	<p>- 항 펩타이드 LL-37를 포함하는 덴기 바이러스의 병원성 항원을 이용한 경구 백신 모델에서 항 펩타이드의 점막 보조제로써 기능을 항원 특이적 항체에 대한 ELISA, ELISPOT을 통해 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 병원성 항원에서 항 펩타이드 LL-37의 점막 보조제로서의 기능검증을 위해 덴기 바이러스의 envelop protein domain III를 확보한 후 oligomer cloning을 통해 C-terminal에 LL-37의 융합하여 재조합 단백질을 <i>E. coli</i> system에서 확보</li> <li>· 확보된 재조합 단백질 EDIII-LL37은 마우스 시스템에 50 <math>\mu</math>g씩 일주일 간격으로 두 번 투여 한 후 4주 동안 serum과 fecal을 확보</li> <li>· 각 serum에서 항원 EDIII에 대한 항체의</li> </ul>



	<p>- 항 펩타이드 LL-37를 포함하는 병원성 항원의 경구 백신 모델에서 유도되는 면역 특성 분석을 Th1/17 type cytokine을 ELISPOT을 통해 분석 및 [H<sup>3</sup>] uptake를 통한 lymphocyte proliferation 분석을 통해 경구 내성 극복을 검증</p> <p>- 병원성 뎅기 바이러스를 이용하여 경구 백신으로부터 생성된 항체가 바이러스에 대한 중화 기능 여부를 microneutralization plaque</p>	<p>증가를 ELISA를 통해 확인한 결과 EDIII-LL37이 경구 투여된 마우스 그룹에서 다른 경구 투여된 마우스들에 비해 증가된 항체량을 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 각 fecal extract에서 전체 SIgA의 양을 ELISA를 통해 확인한 결과 EDIII-LL37에 의해 유도된 SIgA 항체량이 높게 유도된 것을 확인</li> <li>· 각 fecal extract에서 EDIII 특이적 IgA의 양을 ELISA를 통해 확인한 결과 점막 보조제 중 하나이니 CT에 의해 유도되는 것과 비슷한 수준으로 유도됨을 확인</li> <li>· 전신 면역계 spleen으로부터 확보된 면역세포들로부터 EDIII특이적 IgG를 분비하는 세포 수가 EDIII-LL37 경구 투여로 증가함을 ELISPOT을 통해 확인</li> <li>· 점막 면역 유도 조직인 Peyer's patch로부터 확보된 면역세포들로부터 EDIII 특이적 IgA를 분비하는 세포 수가 EDIII-LL37 경구 투여로 증가함을 ELISPOT을 통해 확인</li> <li>· 점막 면역 실행 조직인 lamina propria로부터 확보된 면역세포들에서 EDIII 특이적 IgA를 분비하는 세포 수가 EDIII-LL37 경구 투여로 증가함을 ELISPOT을 통해 확인</li> </ul> <p>· 경구 내성 유도 검증을 위해 각 항원으로 경구 투여 후 5주에 항원 EDIII 50 μg 씩을 복강에 주사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 복강 주사 3일 후 얻은 serum으로부터 EDIII 특이적 IgG 양을 ELISA를 통해 확인 한 결과 EDIII-LL37이 경구 투여된 마우스에서 항체량이 증가되어 경구 내성이 극복되었음을 확인</li> <li>· 복강 주사 10일 후 얻은 spleen의 lymphocyte들에서 EDIII 특이적 IgG를 분비하는 세포 수의 증가를 ELISPOT을 통해 확인</li> <li>· 복강 주사 10일 후 얻은 spleen의 lymphocyte들이 EDIII 항원 자극에 의해 proliferation 함을 [H<sup>3</sup>] uptake 분석을 통해 검증</li> <li>· 복강 주사 10일 후 얻은 점막의 유도조직 및 실행 조직의 면역 세포들이 항원 특이적 IgA를 분비하는 높은 세포 수가 유지되고 있음을 ELISPOT을 통해 확인</li> <li>· 복강 주사 10일 후 얻은 spleen, Peyer's patch, lamina propria 면역 세포들이 항원에 대해 IFN-γ 와 IL-17A를 분비하는 것을 ELISPOT을 통해 확인</li> </ul> <p>· 항 펩타이드 LL-37로부터 유도된 EDIII 특이적 항체가 virus에 대한 중화 특성여부를 검증하기 위해 C6/36 세포에서 ELISPOT을 기본으로 하는 microneutralization plaque assay를 확인 한 결과 항 펩타이드 LL-37에 의해 효과적인 중화 항체가 형성됨을 확인</p>
--	---	---

	assay를 통해 확인	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ M cell target receptor 검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 기작 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M cell target receptor C5aR와 병원균 <i>Y. enterocolitica</i> 유입에 따른 신호 전달 체계를 CLSM과 cAMP PCR array와 bacteria invasion assay를 통해 확인</li> <li>- 항 펩타이드 LL-37에 대한 receptor, formyl peptide receptor-2 (FPR-2)가 M cell에서 발현됨을 CLSM을 통해 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <i>Yersinia enterocolitica</i>의 감염동안 M cell에서 C5aR와 TLR의 발현을 CLSM을 통해 확인</li> <li>· <i>Y. enterocolitica</i>의 감염 동안 M cell에서 변화되는 cAMP 관련 유전자들의 변화를 mRNA 수준에서 PCR array kit을 이용하여 확인</li> <li>· C5aR antagonist 처리에 의해 M cell에서 <i>Y. enterocolitica</i> 감염 후 survival 효율이 감소함을 bacteria invasion assay를 통해 확인</li> <li>· Mouse M cell에서 LL-37 receptor 중 하나인 FPR-2의 발현을 CLSM으로 확인</li> <li>· Mouse M cell에서 FPR-2가 CX3CR1<sup>+</sup> DC와 밀접하게 연관 되어있음을 CX3CR1<sup>GFP</sup> 마우스를 이용하여 CLSM을 이용하여 확인</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질이 mouse M cell중 FPR-2를 통해 전달됨을 CLSM을 이용하여 확인</li> </ul>
<p>&lt;5차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로써의 기능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로써의 기능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증을 위해 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 점막 면역유도조직에서 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal center B cell의 증진을 검증함.</li> <li>· 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증을 위해 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 점막 과전신 면역계를 연결하는 mesenteric lymph node에서 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal center B cell의 증진을 검증함.</li> <li>· 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증을 위해 peyer's patch에서 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 CD40<sup>+</sup> cell의 증가를 확인함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ M cell target receptor 검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석을 통해 경구 백신 보조제에 적용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M cell target receptor 검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석을 통해 경구 백신 보조제에 적용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· M cell에서 항 펩타이드 LL-37의 receptor중 하나인 FPR-2의 특이적 발현을 확인하였으며 이 receptor를 통한 신호 체계가 점막의 DC들의 유도과 밀접하게 관련되어있음을 확인</li> <li>· 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질이 M cell의 FPR-2를 통해 효과적으로 항원을 전달하는 것을 확인하여 항 펩타이드의 점막 보조제의 기능 중 항원 전달기능을 검증</li> <li>· M cell target receptor중 하나인 C5aR는 병원균 <i>Y. enterocolitica</i>의 감염동안 TLR와 함께 M cell에서 발현 되는 것을 확인</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ M cell target receptor C5aR와 TLR 사이의 상호 신호전달에 의한 병원균 유입기작에 대한 이해 증진</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M cell target receptor C5aR와 TLR 사이의 상호 신호전달에 의한 병원균 유입기작에 대한 이해 증진</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 병원균 <i>Yersinia enterocolitica</i>가 감염되는 동안 human M-like cell에서 C5aR와 TLR1/2의 clustering을 확인함.</li> <li>· 병원균 <i>Yersinia enterocolitica</i>가 감염되는 동안 human M-like cell에서 C5aR와 TLR4의 clustering을 확인함.</li> </ul>

6. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발 (제 2핵심-2 세부과제: 고려대학교)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ hMBP 단백질을 식물에서 발현시키기 위한 형질전환용 벡터 제작 및 식물 형질전환</li> </ul>	<p>-hMBP 단백질을 식물에서 발현시키기 위한 형질전환 벡터 제작</p>	<p>·식물형질전환 벡터인 pCHF 벡터를 기본으로, 기존의 CaMV 35S 프로모터와 당근의 식용 섭취 부분인 뿌리 쪽의 과다발현을 위한 고구마의 ibAGP1 small subunit의 프로모터와 엽록체로의 축적을 위한 transit peptide를 이용하여 벡터를 제작함.</p> <p>·이들 벡터를 각각 pCHF3-hMBP, pCHF3-ibAGP1-pro-TP-hMBP, pCHF3-ibAGP1-pro-hMBP라고 명명함.</p>
	<p>-애기장대 형질전환</p>	<p>·제작한 형질전환 벡터의 식물체에서의 발현을 확인하기 위해 아그로박테리움을 이용하여 형질전환 애기장대 식물체를 제작함. T1세대에서 서열의 삽입을 PCR로 확인하고 다음 세대로 선별을 진행 중.</p>
	<p>-당근 형질전환</p>	<p>·제작한 형질전환 벡터를 포함한 아그로박테리움을 이용하여 형질전환 당근 식물체를 제작함. PCR을 통해 서열의 삽입과 발현을 확인하였음.</p>
	<p>-35S promoter를 포함하는 pK2GW7-MBP 벡터를 담배에 형질전환</p>	<p>·예비실험으로 MBP 유전자를 담배에 과다발현시켜 Western blot을 수행하였으나, 검출이 되지 않았음. 항체의 검출능력이 떨어지거나, 발현양이 너무 낮은 두 가지 사유 중 하나로 판단되어, 항체를 직접 제작하거나 발현수준을 높일 필요가 있음.</p>
	<p>-pET300-MBP, pET22b-MBP, pET32-Trx-MBP 벡터를 대장균에서 발현</p>	<p>·MBP 유전자를 다양한 대장균 벡터에 발현시켰음. 모든 벡터에서 발현이 잘되었으나, 특히 thioredoxin(Trx) fusion 시 대장균에서 더 안정적으로 발현됨을 알 수 있었음.</p>
	<p>-종자특이 promoter인 Prolamin 조절 하에 pIPKb-MBP, pIPKb-TS<sub>1</sub>-MBP, pIPKb-TS<sub>2</sub>-MBP 벡터를 제작하고 벼에 형질전환</p>	<p>·MBP 발현 형질전환 벼를 획득하기 위해 종자특이 promoter인 rice prolamin을 사용하였고, 엽록체내 축적을 위해 transit sequence(TS<sub>1</sub>, TS<sub>2</sub>) 서열을 추가하였고, 현재 벼 형질전환 중임.</p>
<p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당근 형질전환체에서 hMBP 단백질 과발현 확인 및 총 단백질 분리</li> </ul>	<p>-당근 형질전환체에서 단백질 과발현 여부 조사</p>	<p>·당근 형질전환체에서 유전자의 전사 정도를 확인하기 위한 RT-PCR 분석 수행</p> <p>·당근 형질전환체에서 hMBP 재조합 단백질 발현 수준의 검정을 위하여 Western 분석 수행</p>
	<p>-당근 형질전환 식물체의 대량생산</p>	<p>·선별된 당근 형질전환체는 기내배양을 통하여 대량생산</p> <p>·대량생산된 식물체는 온실에서 순화하여 종자 확보</p>
	<p>-형질전환 식물체에서 총 단백질 분리</p>	<p>·여러 가지 단백질 추출 방법으로 최적의 단백질 추출 조건을 탐색</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고효율 발현 식물</li> </ul>	<p>-MBP 고효율 발현 당근 형질전환체를 위한</p>	<p>·human 유래의 MBP 유전자를 당근의 translational machinery에 맞도록 코돈을</p>

형질전환용 벡터 시스템 구축 및 형질전환	코돈의 최적화	최적화
	-단백질 고생산 벡터 시스템 구축 및 형질전환	·조직특이 과발현 프로모터, transit peptide와 translation enhancer를 이용하여 단백질의 고생산 벡터 시스템 구축 ·당근에 코돈 최적화한 MBP 유전자를 도입한 <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 형질전환
○ 형질전환 벡에서 MBP 단백질 발현 확인 및 CIP 조절 유전자 발현 벡터 구조물 구축 및 형질전환 벡 육성	-CIP 인 TDC promoter 확보 및 TDC promoter + TYDC 유전자 fusion 벡터 구축 및 벡 형질전환	·종자특이 promoter인 rice prolamin을 사용하여 다양한 형태의 MBP 발현 형질전환 벡 확보
	-MBP 단백질을 생성하는 형질전환 벡에서 MBP 발현 확인	·획득한 형질전환체로부터 MBP 단백질 발현을 Western 분석 ·MBP mRNA 발현을 RT-PCR로 분석
	-TDC promoter + TYDC 발현 형질전환 벡 육성 및 발현 특성 분석	·TDC promoter + TYDC 발현 형질전환 벡 14계통을 육성하였고, 이들의 발현 양상을 mRNA 수준에서, TYDC 유전자 발현 산물인 tyramine 생산 능력으로 분석
<3차년도> ○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	-종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발	·고구마 유래 뿌리 특이적 발현 프로모터 2건 특허 등록 ·종자 특이 cis-element search를 통해 350개 프로모터를 확보하고 그 중 2개 신규 유전자(at1g22600, at1g29680) 프로모터 분석 ·TAIR/ATTED DB에서 종자에만 특이적으로 발현하는 유전자 115개를 선별하여 그 중 37개의 novel 유전자의 프로모터를 분석
	-외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축	·개발된 프로모터들을 활용하여 고효율 발현 벡터 시스템을 구축 중.
<4차년도> ○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	- 콩과 옥수수 종자에서 종자 특이적 발현 프로모터의 발현 분석	· 콩과 옥수수 종자를 이용해 seed-specific cis-element를 포함한 promoter의 transient expression 분석
	- 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색	· Microarray data와 RT-PCR 분석을 통한 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색 · 탐색된 프로모터 중 기존에 알려지지 않은 종자 특이적 프로모터를 선별
	- 종자 특이적 프로모터의 고등식물 형질전환용 벡터 시스템 개발	· 13개의 프로모터를 우선 선별하여 GUS 유전자를 포함하는 binary 벡터에 클로닝 · <i>Agrobacterium</i> GV3101에 벡터를 형질전환
	- 형질전환 후 형질전환체에서 발현 분석	· 꽃 침지 방법을 이용하여 애기장대에 형질전환 후 항생제 배지에서 선별 · 형질전환체에서 조직별, 특히 종자 내 발현 양상 분석
5차년도> ○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	- 종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발	· TAIR/ATTED DB와 PLACE DB를 활용하여 선별한 종자/뿌리 특이적 유전자의 프로모터 분석
	- 외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축	· 콩 종자 일시 시스템을 활용하여 검증된 프로모터로 형질전환체를 제작하여 종자/뿌리 특이적 고효율 발현 벡터 시스템 구축

7. 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 신품종 개발 (제 2핵심-3 세부과제: 경상대학교)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>gnt1 (cgl)</i> mutant나 <math>\beta</math> 1,2-xylosyltransferase 와 <math>\alpha</math> 1,3-fucosyltransferase 의 knockout 또는 knock-down을 기법을 이용한 immunogenic <math>\beta</math> 1,2-xylose와 <math>\alpha</math> 1,3-fucose가 없는 당단백질 생산 호스트 개발</li> <li>○ Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체를 이용한 호스트의 N-glycan 분석</li> </ul>	<p>- RiceGE (Rice Functional Genomic Express Database) 나 T-DNA Express (Arabidopsis Gene Mapping Tool)에서 N-glycosylation의 인간화와 관련된 돌연변이체를 동정하고 이들의 N-glycan pattern을 항원항체반응과 MALDI-TOF/MS 등을 통해분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·벼에서 5개 애기장대에서 18개의 N-glycosylation관련 돌연변이체를 분리하였고 이들의 N-glycan pattern을 항원항체 반응과 MALDI-TOF/MS로 분석하였음</li> <li>·벼와 애기장대 <i>gnt1 (cgl)</i> mutant에서 <math>\beta</math> 1,2-xylose와 <math>\alpha</math> 1,3-fucose가 붙지않는 것을 항원항체반응과 MALDI-TOF/MS 등을 통해 확인하였음</li> </ul>
<p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조직 특이적으로 단백질 발현을 유도하는 강력한 promoter, 단백질 glycosylation에 필수적인 signal sequence를 이용한 유용 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축</li> <li>○ 목표(target) 단백질 발현용 재조합 벡터 구축, Agrobacterium을 이용한 식물체 형질전환 및 고 발현 계통확립</li> </ul>	<p>- 2-D와 MALDI-TOF/MS 등을 통해 조직 특이적으로 강하게 발현되는 단백질 유전자를 선별하고 그 promoter를 이용하여 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템을 구축</p> <p>- 조직 특이적으로 강력한 promoter, 단백질 glycosylation에 필수적인 signal sequence, 단백질 분리를 용이하게 해주는 affinity tags 등을 이용하여 목표(target) 유전자 발현 재조합 벡터 구축하고, Agrobacterium을 이용해 식물체를 형질전환 시키고 고 발현 계통을 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·최소 1개의 조직 특이적으로 강하게 발현되는 유전자의 promoter 확보 및 이를 이용한 고 발현용 식물·미생물 이원벡터(binary vector) 시스템을 구축</li> <li>·glucocerebrosidase 유전자 발현 재조합 벡터 구축, Agrobacterium을 이용한 형질전환 및 고 발현 계통확립</li> </ul>
<p>&lt;3차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ xylose와 fucose가 없는 N-glycan 생산 벼 homo line 및 <i>gnt1</i> cell line 확립</li> <li>○ 당 단백질의 발현량 증가 및 단백질 quality control 기술 개발</li> </ul>	<p>- <math>\alpha</math> 1,3-fucosyltransferase I, N-acetylglucosaminyltransferase I (<i>gnt1</i>) 활성이 없는 벼 homo line 분리 및 <i>gnt1</i> homo cell line 확립, <math>\beta</math> 1,2-xylosyltransferase RNAi construct 구축 -식물 ER-stress signaling,</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·<math>\alpha</math> 1,3-fucosyltransferase I, N-acetylglucosaminyltransferase I (<i>gnt1</i>) 활성이 없는 벼 homo line 분리 및 <i>gnt1</i> homo cell line 확립, <math>\beta</math> 1,2-xylosyltransferase RNAi construct 구축</li> <li>·주요 당단백질 폴딩 조절 인자 분리 및 생화학적 분자생물학적 특성규명 (3개 이상)</li> <li>·당 단백질 분해 표현형을 나타내는 <i>bril-5</i>, <i>bril-9</i> 등의 돌연변이체와 교배를 통한</li> </ul>

	<p>unfolded protein response (UPR) regulator screening 및 생화학적 분자생물학적 특성규명-이들을 이용한 target 당 단백질quality control 및 분해 조절 기술 개발</p>	<p>당단백질 분해기구와의 연류성 검증 (1개 이상)</p>
<p>&lt;4차년도&gt;          ○ 식물세포 발현 단백질 분리용 affinity tag (vector) 개발 및 단백질 고효율 순수 분리 기술 개발          ○ Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체를 이용한 단백질의 N-glycan 분석          ○ MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석</p>	<p>- 식물세포 발현 단백질의 고효율 분리를 위한 tandem affinity purification (TAP) tag 의 design, 유전자합성 및 binary vector에 cloning 이를 이용한 식물 생산 단백질의 고효율 순수 분리 기술 개발          - 개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트의 Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체를 이용한 단백질의 N-glycan 분석          - 개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트의 MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석</p>	<p>· 효율적인 tandem affinity purification (TAP) tag 개발여부 (1건)          · 개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트의 Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체를 이용한 단백질의 N-glycan 분석 여부 (2건)          · 개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트의 MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석 (2건)</p>
<p>&lt;5차년도&gt;          ○ 고부가가치 단백질 발현 형질전환 식물체의 형질 고정          ○ 연구결과의 특허 출원</p>	<p>- 유전학적인 방법을 이용한 고부가가치 단백질 발현 식물체의 형질 고정 및 특허 출원</p>	<p>· 고부가가치 단백질 발현 형질전환 식물체의 elite line 선별 및 형질 고정          · 형질전환 식물체의 특허 출원</p>

8. 식물세포에서의 단백질 고축적 기법 개발 (제 2핵심-4 세부과제: 포항공과대학교)

연구 범위	연구수행방법 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;1-2차년도&gt;          ○ Translational enhancer의 mutagenesis를 통한 high level translational enhancer 개발</p>	<p>- 5'UTR sequence의 분석          - protoplast에서의 transient expression을 이용한 translation efficiency 확인          - Serial mutant를 구축하여 sequence motif의 확인</p>	<p>·전체 Arabidopsis genome의 5' UTR의 분석을 통한 grouping과 이들 중에 대표적인 5' UTR에 대한 translational efficiency를 규명함          ·5' UTR 35에 대한 triple T substitution mutagenesis를 통하여 UTR의 3' downstream sequence가 critical 하며, 또한 5' UTR의 중간 부위에는 TTT로 substitution한 것이 두 배 정도로 translation 효율이 높아지는 것을 확인함.</p>
<p>○ 고효율 번역인자의 개발을 위한</p>	<p>- Translational initiation factor</p>	<p>·Translational initiation factor들 중에서 Elf4b and xx의 cDNA를 확보함</p>

<p>translational factor들의 기능 분석</p>	<p>의 확보 - Initiation factor의 overexpression을 이용한 translational efficiency 증진 검증 - Translational initiation factor의 mutant 확보 및 phenotype 규명</p>	<p>·Overexpression을 통한 translational efficiency를 검증한 결과 eIF4B는 translational efficiency를 500 % 증진시키는 효과를 나타냄 ·Translational initiation gene eIF1A, eIF2A, eIF3에 T-DNA가 insertion된 homoline을 확보하고 phenotype을 관찰하는 연구를 시작함.</p>
<p>◦ 엽록체 targeting의 기작 규명을 통한 엽록체 단백질 고축적 기술 개발</p>	<p>- Chloroplast outer envelope membrane targeting 기능 규명 - AKR2의 엽록체 단백질 targeting에서의 기작 규명</p>	<p>·엽록체의 외막 단백질의 targeting 기작을 규명하기 위하여 transmembrane domain의 원리를 규명함 ·AKR2의 ribosome binding 기작을 규명함 ·Toc159-dependent pathway의 기작을 규명함</p>
<p>◦ Mitochondrial targeting의 기작 규명과 이를 이용한 mitochondria 단백질 고축적 기술 개발</p>	<p>- Mitochondrial targeting 기작 규명</p>	<p>·두 개의 Mitochondrial protein의 presequence를 분석하여 critical sequence motif를 확보함 ·두 mitochondrial presequence의 critical sequence motif가 확연히 다를 것을 확인함 ·Presequence에 존재하는 arginine residue가 중요하지만 이들이 amphiphathic helix를 만드는 것이 중요하지 않음을 확인함.</p>
<p>&lt;제3차년도&gt; ◦ Translational enhancer의 mutagenesis를 통한 high level translational enhancer 개발</p>	<p>-5' UTR 중에서 poor UTR과 good UTR의 비교 분석을 통한 translational efficiency 조절 기작 규명 -protoplast에서의 transient expression을 이용한 translation efficiency 확인 -Serial AAA substitution mutant를 구축하여 sequence motif의 확인 -Translational efficiency 조절 기작의 conservation 확인</p>	<p>·5' UTR 850에 대한 triple AAA substitution mutagenesis를 통하여 UTR의 3' 위치에 AAA가 들어가는 경우에 poor UTR을 good UTR로 translational efficiency가 증가하는 것을 확인함 ·이들 중에서 -3 to -5 position에 AAA로 치환된 mutant가 가장 효율이 좋으며 심지어 35번 UTR보다도 더 높은 효율을 보인다는 것을 확인함. ·UTR에 의한 translational efficiency 조절을 규명하기 위해서 good UTR과 poor UTR을 yeast 유전자에 도입하여 이들의 기능이 conserve되어 있음을 확인함</p>
<p>◦ 고효율 번역인자의 개발을 위한 translational factor들의 기능 분석</p>	<p>-Translational initiation factor의 확보 -Initiation factor의 overexpression을 이용한 translational efficiency 증진 검증 -Translational initiation factor의 mutant 확보 및 phenotype 규명</p>	<p>·Translational initiation gene eIF1A에 대한 두 개의 independent mutant line을 확보함 ·이들 mutant들의 phenotype을 확인하고 eIF1A가 ABA 및 heat stress more sensitive하다는 것을 확인함 ·eIF1A 유전자가 knock-out 되었을 때 단백질이 잘 만들어지지 않은 유전자를 확보하기 위해서 proteomics를 진행하고 있으며 candidate 유전자로 ABA 및 stress 관련 유전자를 일차적으로 동정함</p>

<p>○ 엽록체 targeting의 기작 규명을 통한 엽록체 단백질 고충적 기술 개발</p>	<p>-다양한 chloroplast outer envelope membrane protein을 확보하고 이들의 sequence들을 분석함          -Mitochondrial membrane protein들의 서열을 chloroplast protein들의 서열과 비교 분석을 통해 차이를 확인함          -Hydrophobicity를 조절하는 다양한 substitution mutant를 제조하고 이들을 protoplast에 발현함</p>	<p>·엽록체의 외막 단백질의 targeting 기작을 규명하기 위하여 transmembrane domain이 targeting specificity에 관여하는 원리를 규명함          ·특히 mitochondrial targeting과 엽록체의 targeting에 대한 특이성을 부여하는 기작을 규명함</p>
<p>○ Mitochondrial targeting의 기작 규명과 이를 이용한 mitochondria 단백질 고충적 기술 개발</p>	<p>-Presequence의 critical sequence motif를 alanine substitution mutant를 제작하고 GFP에 fusion 하여 reporter construct를 만듦          -Protoplast에 이들 mutant를 도입하여 targeting 여부를 western blot analysis와 fluorescence microscopy를 이용하여 분석함</p>	<p>·F1-ATPase gamma subunit의 presequence에 대한 많은 alanine substitution mutant를 만들고 이들을 이용하여 in vivo targeting을 실시함.          ·이를 통해서 presequence에 많은 종류의 critical sequence motif가 존재함을 확인하였음.          ·이들 critical sequence의 역할을 규명하기 위해서 import 과정을 자세히 분석함.          ·Critical sequence motif가 mitochondrial targeting, outer membrane crossing, inner membrane crossing 등 다양한 step에 관여하고 있는 것들을 classify할 수 있었음.</p>
<p>○ PRA 및 PRA interacting protein YIP를 이용한 단백질 trafficking 기작의 규명과 이를 이용한 선택적 단백질 분비 시스템 구축</p>	<p>-PRA1의 trafficking에 대한 효과 검증하기 위해서 overexpression 및 atPRA1 knock-out mutant 확보          -Protoplast에서 trafficking assay          -Fructosidase의 trafficking motif 확인</p>	<p>·PRA1이 trafficking에 미치는 영향을 확인하기 위해서 protoplast에 PRA1의 overexpression한 상태에서 다양한 cargo protein들의 trafficking을 Western으로 확인함          ·PRA1 knock-out mutant에서 protoplast를 확보하여 다양한 cargo protein들의 trafficking efficiency를 확인함          ·Fructosidase의 trafficking pathway를 규명하기 위해서 protoplast에 GFP fusion 형태로 발현하여 localization을 확인함          ·Fructosidase의 다양한 N-terminal region mutant를 만들고 이들의 trafficking efficiency를 확인함</p>
<p>&lt;제4차년도&gt;          ○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발</p>	<p>- 다양한 transient expression 시스템에서 Translational enhancer의 활용가능성 확인          - Eukaryotic translation initiation factor 1a(eIF1A)의 기작연구</p>	<p>· 애기 장대의 잎 protoplast에서 발현이 높은 UTR의 발현을 다양한 식물에서 확인하고자 하였다. 이를 위하여 담배의 잎에 agrobacterium mediated infiltration을 이용하여 두 가지 construct를 발현시켰다. Transformation 효율이 일정하지 않아 Real-time qRT-PCR로 확인한 mRNA level은 poor 5'UTR을 합성한 GFP가 더 높았으나, 상대적으로 낮은 mRNA level에도 불구하고 good 5'UTR을 합성한 GFP가 더 높은 효율로</p>



		<p>translation 되었음을 확인할 수 있었다. 또한 <i>in vitro</i> translation을 이용하여 5'UTR enhancer의 효율을 확인하였다. 특히 이 경우 애기장대의 tissue culture로부터 extract를 만들어 <i>in vitro</i>에서 단백질의 합성의 efficiency를 확인하는 새로운 방법을 활용하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 전년도 연구를 통해서 애기장대의 eIF1A KO 돌연변이인 식물체가 스트레스 관련 호르몬인 ABA와 heat stress하에서 영향을 받는다는 사실을 확인하였고, 2DE analysis를 통하여 어떠한 protein의 translation이 조절되는지 확인하였다. Heat stress 조건하에서 서로 다른 regulation pattern을 보인 protein중 하나인 AT4G20360(RAB1b)를 eif1a의 direct target 후보로 보고, RAB1b의 5'UTR 21 nt를 GFP에 fusion시킨 reporter construct를 col-0/eif1a protoplast에 발현시켜 관찰하였다. 그 결과 GFP의 expression pattern이 33 ° C, 36 ° C의 두가지 heat stress조건에서 wild type과 eif1a에서 반대임을 확인하였다.</li> </ul>
<p>○ Chloroplast targeting 기작 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 애기 장대와 인간 내에 존재하는 엽록체 및 미토콘드리아 SA 단백질의 이동신호서열 비교</li> <li>-미토콘드리아 수송 시 3가지 특이 요소들의 역할 검증</li> <li>- 효모 및 인간 미토콘드리아 SA 단백질을 통한 3가지 특이 요소들의 역할 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 미토콘드리아 SA 단백질의 특이적 이동을 결정짓는 요소를 찾기 위해 엽록체 SA 단백질의 이동신호서열과 비교 분석한 다음 추출된 특이 요소들이 인간 미토콘드리아 SA 단백질의 이동신호서열에도 존재하는지 알아보았다.</li> <li>· 엽록체 및 미토콘드리아 SA 단백질들의 막관통영역 내의 아미노산별 존재 비율은 큰 차이를 보이지 않았지만 미토콘드리아 SA 단백질 막관통영역의 아미노 및 카르복시 말단 부근에서 3가지 특이적 요소들이 관찰되었다. 첫째, 아미노 말단 부위에 1개 이상의 라이신 또는 아르기닌 등의 양성을 띠는 아미노산이 존재하였고 둘째, 카르복시 말단 부위에 타이로신, 트립토판 및 페닐알라닌 등의 방향족 아미노산들이 1개 이상 분포하였다. 마지막으로, CPR이 라이신보다는 아르기닌 아미노산 위주로 구성되어 있음을 알 수 있었다</li> </ul>
<p>○ Mitochondrial targeting 기작 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-애기장대 미토콘드리아로의 단백질 이동에 필요한 presequence 내 기능적 모티프 규명과 상호 관계 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· F1-ATPase-gamma subunit의 presequence에 존재하는 DQEEG와 VVRNR 모티프가 애기장대 미토콘드리아로의 단백질 이동에 중요한 역할을 한다는 것을 규명하였다. 이렇게 발견한 모티프들이 F1-ATPase-gamma subunit 외 다른 애기장대 미토콘드리아 단백질에도 존재하는지 알아보려고 global sequence alignment를 수행하였다.</li> <li>· 분석 결과 198개의 애기장대 presequence 중 각각 32개와 40개의 presequence 에 DQEEG-like 또는 VVRNR-like 모티프가</li> </ul>

		<p>존재한다는 것을 알 수 있었다. 이들 중 NDS8B와 FAb의 presequence를 각각 동정하고 각 presequence에서 기능적 모티프로 예측된 부분이 실제로 미토콘드리아로의 단백질 이동에 중요한 역할을 하는지를 실험적으로 알아보고자 하였다</p>
<p>○ Protein trafficking 기작의 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AtPRA1.B6의 세포내 단백질 수송의 조절과 pathogen에 대한 저항성</li> <li>- 애기장대 식물의 endocytic adaptor의 발견과 그 기능에 대한 연구</li> <li>- Glo3p-type ArfGAP들로 매개로한 골지체로의 Arf1-GDP 이동에 관한 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· AtPRA1.B6 inducible 과 발현 형질 전환체에 곰팡이 병원균인 <i>A. brassicicola</i>를 처리하여 방어 능력을 관찰하였다. <i>A. brassicicola</i> 처리에 의하여 AtPRA1.B6의 단백질의 발현양이 증가 하였고, 대조군보다 AtPRA1.B6 과 발현 형질 전환 식물체 내에서 <i>A. brassicicola</i> 포자 형성이 감소하는 것을 관찰 하였다.</li> <li>· Arabidopsis Epsin-like clathrin adaptor1 (AtECA1)과 그의 homologs인 AtECA2, AtECA4을 연구하였다. clathrin adaptor로서 기능할 것이라고 유추하였다. 흥미롭게도, 뿌리 세포에서는 분열하는 세포와 그렇지 않은 세포를 함께 관찰 할 수 있었는데 분열하는 세포에서 AtECAs이 분열의 마지막 시기에 세포질의 분리를 위해 형성되는 세포판으로 accumulation되는 것을 관찰하였다.</li> <li>· AGD8과 AGD9 유전자가 정상보다 낮은 수준으로 발현이 되는 RNAi 형질전환 식물체가 야생형 애기장대에 비해 식물 발달과 성장에 아주 큰 결함을 보여 주었다. 흥미롭게도 transmission electron microscopy를 이용하여 RNAi 형질전환 식물체내 골지체의 구조 형태가 아주 심각하게 변형되어 있음을 보여주었다.</li> </ul>
<p>&lt;5 차년도&gt; ○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 '-UTR의 고효율 결정 기작의 규명</li> <li>- eIF1A의 기능 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 5'-UTR어떤 기작을 통해서 translational efficiency를 결정하는지 규명하고자 하였다. 이를 위해 good 5'-UTR과 poor 5'-UTR의 이용하여 in vitro에서 translation system을 구축한 후 ribosome의 assembly 과정을 규명하였다. 이 과정에 처음에 mRNA로 small ribosomal subunit이 recruit된 후 60S large subunit이 recruit되어 whole complex가 형성되어야 하는데 이 과정에서 good 5'-UTR이 poor 5'-UTR에 비해서 아주 효율적으로 whole complex의 형성을 유도한다는 것을 확인하였다. 이를 통해서 functional whole complex의 assembly에 5 '-UTR의 서열이 중요한 역할을 한다는 것을 최초로 규명하였다.</li> <li>· eIF1A의 기능을 연구하기 위해서 이 유전자의 knock-out plant를 확보하고 이의 표현형을 연구한 결과 ABA에 대해서 약간의 abnormal sensitivity를 보이는 것으로</li> </ul>

		<p>확인하였으며, 또한 전체적으로 growth에 defective하다는 것을 확인하였다. 이에 대한 원인을 규명하기 위해서 단백질의 발현이 차이가 나는 다수의 단백질을 proteomics를 통해서 identity를 확인하였다. 이들의 계속해서 연구하고자 한다.</p>
<p>○ Chloroplast targeting 기작 규명</p>	<p>- Transit peptide의 기능 연구</p>	<p>· 엽록체로 targeting 하는데 필수적인 transit peptide의 역할에 대해서 많이 알려져 있지만 이것이 어떻게 실제로 channel을 통과하게 해주는지는 아직 불명확했다. 본 연구에서는 transit peptide에 존재하는 proline residue에 대해서 alanine substitution을 도입하고, 이들을 single, double, triple and quadruple mutant를 만들고 이들을 이용해서 이들 mutant transit peptide가 어떻게 단백질을 엽록체 내로 이동하는가를 규명하였다. 이 결과 이들 mutant들 중 특히 T2, T4 및 T7에 존재하는 proline residue들이 ratchet activity에 필수적이다.</p>
<p>○ Mitochondrial targeting 기작 검증</p>	<p>- Membrane protein의 미토콘드리아 targeting 기작 규명</p>	<p>· Mitochondrial targeting 기작을 규명하기 위해서 다양한 membrane protein들의 targeting 기작을 규명하기 위해서 다양한 alanine substitution mutant를 제조하도 이들의 targeting을 protoplast에서 확인하였다. 이를 통해 mitochondria 외막 단백질들도 엽록체와 비슷하게 CPR motif를 가짐과 동시에 N-terminal에 positive charged residue 하나를 필요로 하며, 또한 TMD 내에 적어도 하나의 aromatic residue를 필요로 하여 이들이 chloroplast evading 역할을 한다는 것을 규명하였다. 지금까지 어떻게 엽록체와 미토콘드리아의 targeting specificity가 결정되는지에 대한 기작을 규명하였다</p>
<p>○ Protein trafficking 기작의 규명</p>	<p>- PRA11의 역할 규명 및 ECA1의 역할 규명</p>	<p>· 식물(애기장대)에는 19개의 PRA isoform이 존재하는데 이들의 각 단백질의 기능을 규명하기 위해서 pral1의 knock-out과 overexpression line을 구축하여 연구한 결과 PRA11은 golgi에 존재하면서 vacuolar trafficking에 아주 중요한 역할을 한다는 것을 규명함. 특히 vacuole로 이동하는 단백질들이 제대로 이동하지 못함으로 인해서 식물이 dehydration 및 KCl stress에 제대로 적응하지 못하는 표현형을 나타내었으며 vacuole의 pH를 유지하지 못하는 것을 통해서 이 단백질이 protein의 vacuole의 trafficking에 아주 중요한 factor임을 증명함.</p> <p>· ECA1의 역할을 규명하기 위해서 knock out 및 ECA1-GFP fusion protein을 이용하여 transgenic plant를 구축하였다. ECA1 knock-out mutant는 흥미롭게도 ROS의</p>

		<p>production에 defective 한 표현형을 나타내었다. 이를 통해서 ECA1이 Rboh들의 행동을 제어하고 있다는 결과를 확보하였다. 또한 ECA1의 localization을 통해서 이 단백질이 Cell plate의 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 규명하였다.</p>
--	--	--

## 제 2 절 돼지질병 예방을 위한 벼 신품종 개발

(제 1 핵심 1세부과제-전북대학교)

### 1. PEDV COE 항원 단백질 발현 식물 개발

돼지설사병에 대한 항원단백질을 고발현하는 식물체를 개발하여 경구적인 방법을 이용하여 돼지에서 면역성을 확인, 유행성 설사병에 대한 방어능의 확인 및 벼 품종을 개발하고자 하였다. 식물발현 벡터 제작과 벼의 형질전환을 수행하였다. 벼에서 항원유전자를 발현시키기 위하여 각기 특성이 다른 프로모터인; 항시성이고 강력한 프로모터로 알려진 ubiquitin 프로모터, 벼 종자의 발아시 발현이 유도되어 강력한 것으로 알려진 amylase 1A의 프로모터 그리고 식물세포 현탁배양에서 당결핍 유도 조건에서 발현이 강력한 것으로 알려진 amylase 3D 프로모터를 이용하여 식물발현벡터를 제작하였고 벼의 형질전환을 수행하였다.

#### 가. 식물발현벡터 제작

##### (1) 항원유전자와 cholera toxin B subunit (CTB)의 융합유전자를 가진 식물발현벡터 제작

본 실험에서 사용한 COE 유전자는 돼지 유행성 설사병을 일으키는 바이러스 (PEDV)의 spike protein의 neutralizing activity를 가지고 있는 epitopes를 포함하는 유전자의 일부이다. 본 실험에서 이용된 synthetic CTB-synthetic COE 융합유전자 (sCTB-sCOE)는 이전 실험에서 식물에서 항원유전자의 고발현을 위하여 고안되어 제작된 최적화된 코돈으로 치환하여 합성한 것을 이용하였다. 그리고 이 sCTB-sCOE 유전자는 5' 쪽에 translation을 증진시키기 위하여 kosac sequence를 첨가하여 주었고 또한 항원단백질의 발현축적을 위하여 endoplasmic reticulum에 retention 시키기 위하여 SEKDEL sequence를 첨가된 융합유전자를 포함하고 있는 pMYV514를 가지고 실험을 시작하였다.

쌀에서 sCTB-sCOE 융합유전자를 ubiquitin 프로모터 조절 하에서 발현을 시키기 위하여 ubiquitin 프로모터의 조절 하에 있는 sCTB-sCOE 융합유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pMYV514를 HindIII와 EcoRI 제한효소로 자른 절편을 벼의 형질전환을 위한 발현벡터인 pMYN90의 같은 부위에 도입하여 HindIII와 EcoRI 제한효소로 잘라 2kb 절편을 확인하고 BamHI과 KpnI 제한효소로 잘라 0.85 kb 절편을 확인하여 subcloning을 확인하였다. 이 재조합벡터를 pMYV111이라 명명하였다 (그림 1).

쌀에서 sCTB-sCOE 융합유전자를 쌀의 amylase 1A 프로모터 조절 하에서 발현을 시키기 위하여 sCTB-sCOE 융합유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pMYV514를 BamHI와 KpnI 제한효소로 자른 절편을 amylase 1A 프로모터와 3'UTR를 가지고 있는 벼의 형질전환을 위한 발현벡터인 pMYO401의 같은 부위에 도입하여 BamHI과 SacI 제한효소로 잘라 0.85 kb 절편을 확인하여 subcloning을 확인하였다. 이 재조합벡터를 pMYV114이라 명명하였다 (그림 2).

쌀에서 sCTB-sCOE 융합유전자를 쌀의 amylase 3D 프로모터 조절 하에서 발현을 시키기 위하여 sCTB-sCOE 융합유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pMYV111를 BamHI와 EcoRI 제한효소로 자른 절편을 amylase3D 프로모터를 가지고 있는 벼의 형질전환을 위한 발현벡터인 pMYV108의 같은 부위에 도입하여 BamHI과 EcoRI 제한효소로 잘라 1.15 kb 절편을 확인하여 subcloning을 확인하였다. 이 재조합벡터를 pMYV118이라 명명하였다 (그림 3).

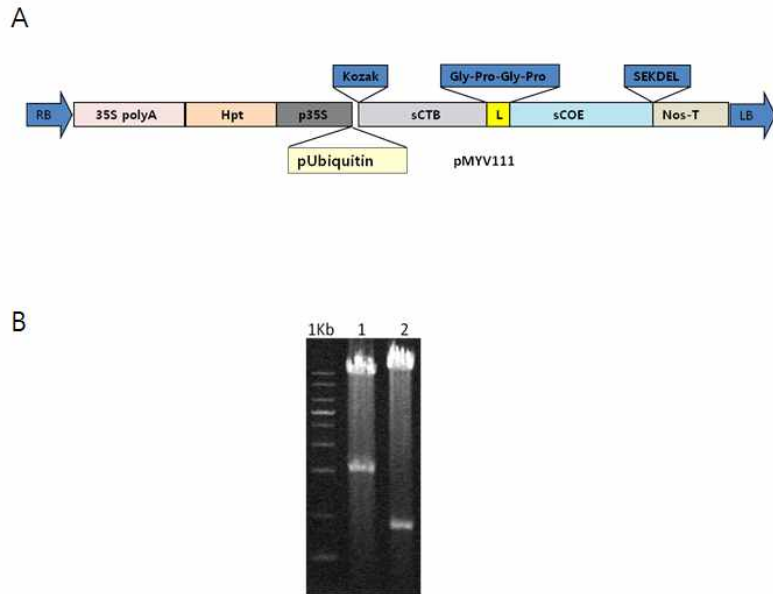


그림 1. Construction of rice expressed-plasmid pMYV111 containing Ubiquitin promoter, sCTB-sCOE gene fusion, 3' untranslated region. A, The diagram of plasmid construction; B, The plasmid pMYV111 was digested with *Hind*III and *Eco*RI to yield 2.0 kb fragment and vector (lane 1) and digested with *Bam*HI and *Kpn*I to yield 0.85 kb fragment and vector (lane 2).



그림 2. Construction of rice expressed-plasmid pMYV114 containing rice amylase 1A promoter, sCTB-sCOE gene fusion, 3' untranslated region. A, The diagram of plasmid construction; B, The plasmid pMYV114 was digested with *Bam*HI and *Sac*I to yield 0.85 kb fragment and vector.

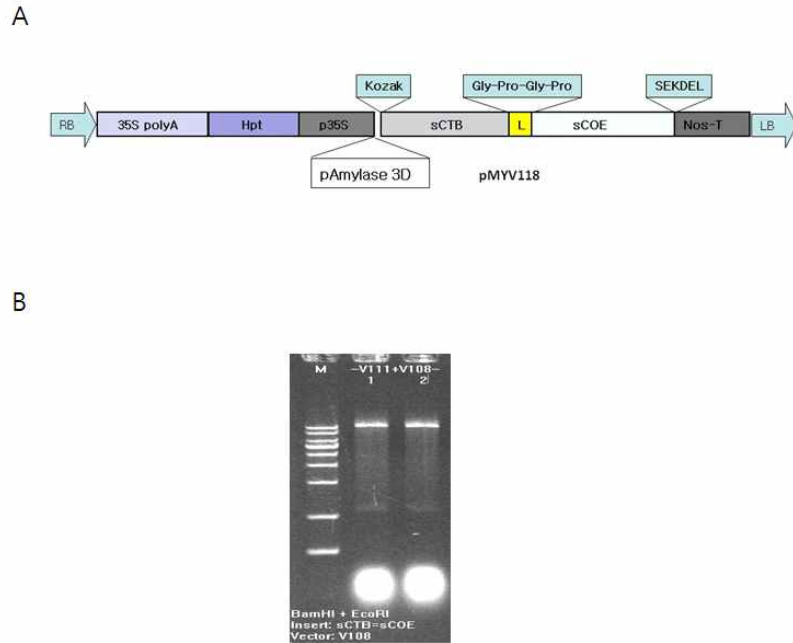


그림 3. Construction of rice expressed-plasmid pMYV118 containing rice amylase 3D promoter, sCTB-sCOE gene fusion, 3' untranslated region. A, The diagram of plasmid construction; B, The plasmid pMYV118 was digested with *Bam*HI and *Eco*RI to yield 1.15 kb fragment and vector.

(2) 항원유전자와 enterotoxigenic *E. coli* enterotoxin B subunit (LTB)의 융합항원유전자를 가진 식물발현벡터 제작

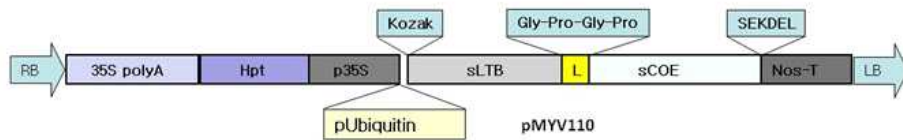
본 실험에서 이용된 synthetic LTB-synthetic COE 융합유전자(sLTB-sCOE)는 이전 실험에서 식물에서 항원단백질의 고발현을 위하여 최적화된 코돈으로 치환하여 합성된 것을 이용하였다. 그리고 이 sCTB-sCOE 유전자는 5' 쪽에 translation을 증진시키기 위하여 kosac sequence를 첨가하여 주었고 또한 항원단백질의 발현축적을 위하여 endoplasmic reticulum에 retention 시키기 위하여 SEKDEL sequence를 첨가된 융합유전자를 포함하고 있는 pMYV210를 가지고 실험을 시작하였다.

쌀에서 sLTB-sCOE 융합항원유전자를 ubiquitin 프로모터 조절 하에서 발현을 시키기 위하여 ubiquitin 프로모터와 3'UTR의 조절 하에 있는 sLTB-sCOE 융합항원유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pMYV210를 HindIII와 EcoRI 제한효소로 자른 절편을 벼의 형질전환을 위한 발현벡터인 pMYN90의 같은 부위에 도입하여 HindIII와 EcoRI 제한효소로 잘라 2.0 kb 절편을 확인하였고 BamHI과 KpnI 제한효소로 잘라 0.85 kb 절편을 확인하여 subcloning을 확인하였다. 이 재조합벡터를 pMYV110이라 명명하였다 (그림 4).

쌀에서 sLTB-sCOE 융합항원유전자를 쌀의 amylase 1A 프로모터 조절 하에서 발현을 시키기 위하여 sLTB-sCOE 융합항원유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pMYV210를 BamHI와 KpnI 제한효소로 자른 절편을 amylase1A 프로모터와 3'UTR를 가지고 있는 벼의 형질전환을 위한 발현벡터인 pMYO401의 같은 부위에 도입하여 HindIII와 EcoRI 제한효소로 잘라 2.0 kb 절편을 확인하였고 BamHI과 SacI 제한효소로 잘라 0.85 kb 절편을 확인하여 subcloning을 확인하였다. 이 재조합벡터를 pMYV109이라 명명하였다 (그림 5).

쌀에서 sLTB-sCOE 융합유전자를 쌀의 amylase 3D 프로모터 조절 하에서 발현을 시키기 위하여 sLTB-sCOE 융합유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pMYV110를 BamHI와 EcoRI 제한효소로 자른 절편을 amylase3D 프로모터를 가지고 있는 벼의 형질전환을 위한 발현벡터인 pMYV108의 같은 부위에 도입하여 HindIII와 EcoRI 제한효소로 잘라 2.0 kb 절편을 확인하였고 BamHI과 KpnI 제한효소로 잘라 0.85 kb 절편을 확인하여 subcloning을 확인하였다. 이 재조합벡터를 pMYV116이라 명명하였다 (그림 6).

A



B

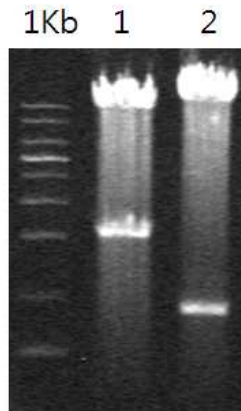
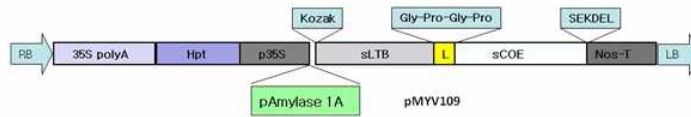


그림 4. Construction of rice expressed-plasmid pMYV110 containing Ubiquitin promoter, sCTB-sCOE gene fusion, 3' untranslated region. A, The diagram of plasmid construction; B, The plasmid pMYV110 was digested with *Hind*III and *Eco*RI to yield 2kb fragment and vector (lane1) and digested with *Bam*HI and *Kpn*I to yield 0.85 kb fragment and vector (lane2).



A



B

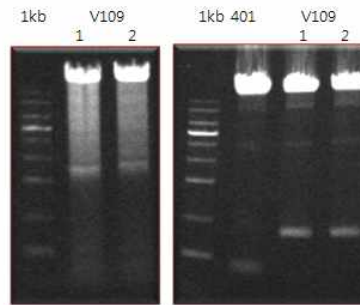
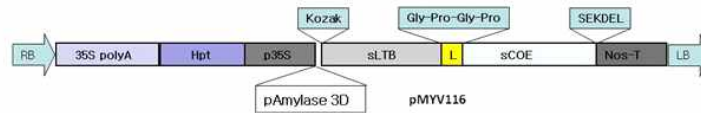


그림 5. Construction of rice expressed-plasmid pMYV109 containing rice amylase 1A promoter, sLTB-sCOE gene fusion, 3' untranslated region. A, The diagram of plasmid construction; The plasmid pMYV109 was digested with *Hind*III and *Eco*RI to yield 2kb fragment and vector (B) and digested with *Bam*HI and *Kpn*I to yield 0.85kb fragment and vector (C).

A



B

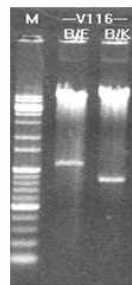


그림 6. Construction of rice expressed-plasmid pMYV116 containing rice amylase 3D promoter, sLTB-sCOE gene fusion, 3' untranslated region. A, The diagram of plasmid construction; B, The plasmid pMYV116 was digested with *Hind*III and *Eco*RI to yield 2kb fragment and vector (lane1) and digested with *Bam*HI and *Kpn*I to yield 0.85kb fragment and vector (lane2).

## 나. 쌀의 형질전환과 재분화

박피하고 표면소독된 쌀(*Oryza sativa* L. cv. Dongin)의 종자를 2,4-dichlorophenoxylic acid (2,4-D) (2mg/l), sucrose (30 g/l), kinetin (0.2 mg/l)가 첨가된 N6 배지에서 배양을 하여 embryogenic callus를 유도한다. 유도된 embryogenic callus를 선발하여 particle bombardment-mediated 형질전환 방법을 이용하여 형질전환하였다.

재조합 벡터(pMYV111, pMYV114, pMYV118, pMYV110, pMYV109, pMYV116)를 가지고 형질전환을 수행한 후에 2,4-dichlorophenoxylic acid (2mg/l), sucrose (30 g/l), kinetin (0.2 mg/l), glucose (10g/l)가 첨가되고 항생제가 첨가되지 않은 N6 배지에 2일간 암상태에서 공동 배양을 하였다. 2일 후에 위의 배지에 형질전환체 선발을 위하여 항생제 hygromycin B (50 mg/l)가 첨가된 N6 선발배지로 옮겨 배양하였다.

N6 선발배지에 옮긴 후에 2-3 후에 형질전환체로 보이는 캘러스가 나타나기 시작을 하였고 형질전환체로 보이는 부분을 잘라 새로운 배지로 옮겨가면서 배양하였다.

재분화를 위해서 형질전환된 것으로 보이는 캘러스를 비타민이 첨가된 N6 salts (3.957 g/l), sucrose (30 g/l), proline (0.5 g/l), glutamine (0.5 g/l), casein enzymatic hydrolysate (0.3 g/l), NAA (0.5 mg/l), BAP (3 mg/l) 그리고 hygromycin B (50 mg/l)가 첨가된 Cambia 배지에 옮겨서 재분화를 유도하였다 (그림 7).

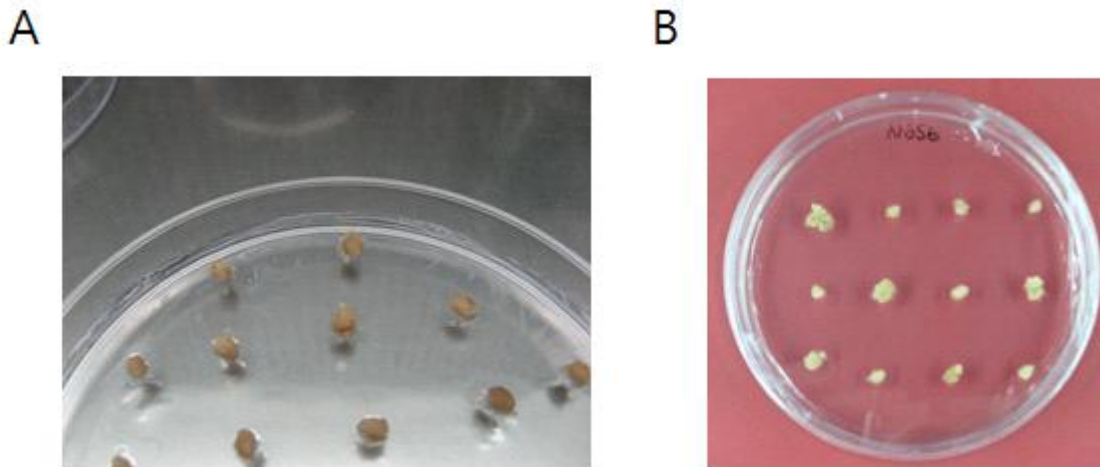


그림 7. Plant transformation using bombardment-mediated transformation method. A, Selection of transgenic callus on N6 selection medium after transformation. B, Propagation of selected transgenic callus on the selection N6 medium.

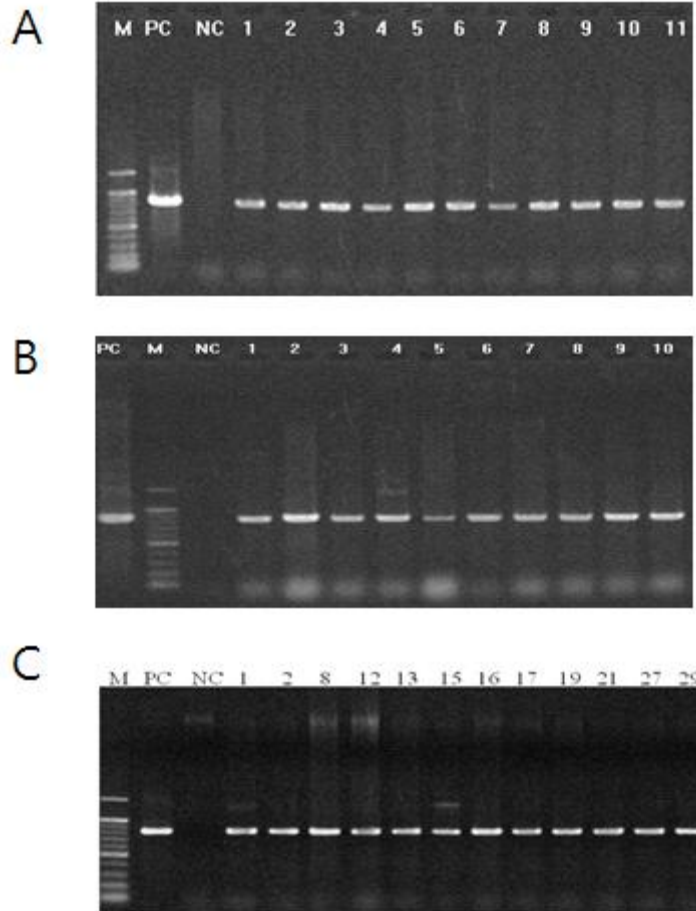
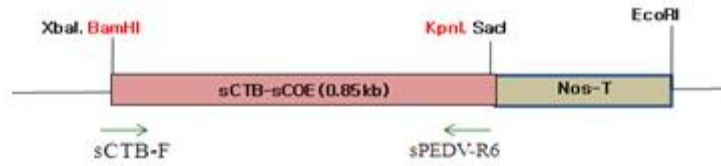


그림 8. Genomic PCR analysis of fusion sCTB-sCOE fusion gene in the putative transgenic rice calli. M: 100 bp DNA ladder; PC: positive control derived from recombinant plasmid DNA; NC: negative control derived from wild-type rice calli; 1-29: putative transgenic rice calli. The PCR products were amplified from rice transformed with plasmid pMYV111 (A), pMYV114 (B) and pMYV118 (C).

#### 다. 벼의 형질전환 및 형질전환체의 분자생물학적 분석

##### (1) 형질전환체에서 genomic DNA 분석

N6 선발배지에서 선발되고 증식된 형질전환된 callus를 genomic DNA PCR를 이용하여 분석을 하기 위하여 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 형질전환 callus로부터 전체 DNA를 추출하였다.

추출된 genomic DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량을 하여 genomic DNA PCR에 이용하였다.

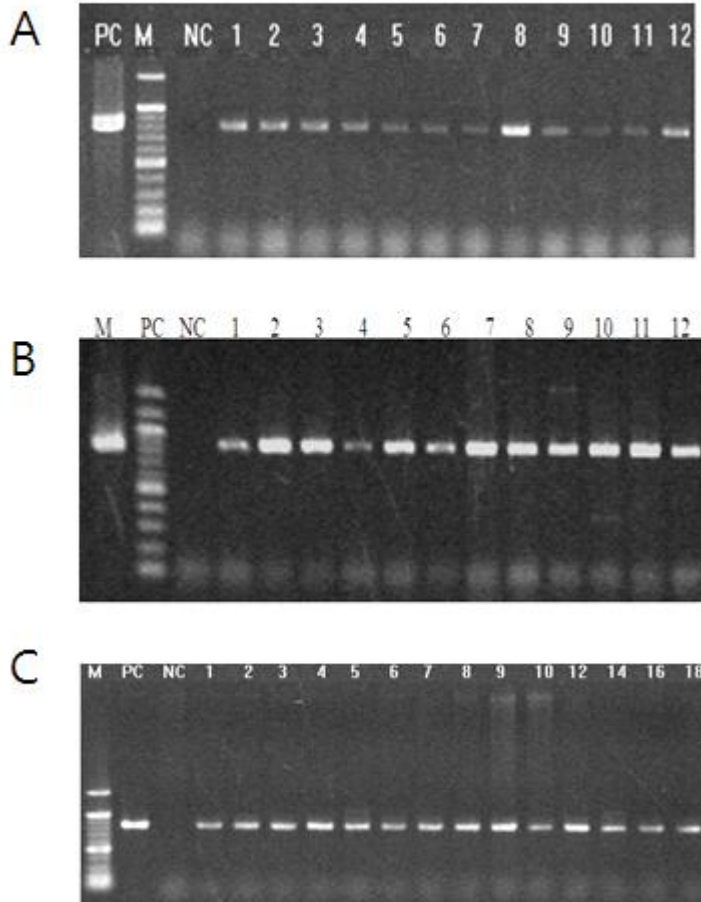
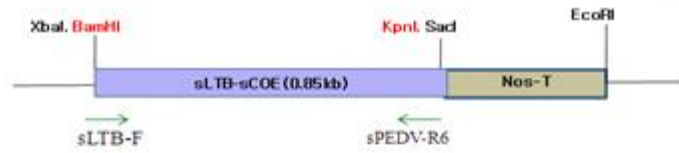


그림 9. Genomic PCR analysis of fusion sLTB-sCOE fusion gene in the putative transgenic rice calli. M: 100 bp DNA ladder; PC: positive control derived from recombinant plasmid DNA; NC: negative control derived from wild-type rice calli; 1-18: putative transgenic rice calli. The PCR products were amplified from rice transformed with plasmid pMYV110 (A), pMYV109 (B) and pMYV116 (C).

sCTB-sCOE와 sLTB-sCOE 융합유전자의 형질전환체로 도입을 확인하기 위하여 각각의 융합유전자에 특이적인 primers set를 이용하여 PCR를 수행한 결과 융합유전자에 해당하는 850bp 크기의 PCR products를 확인 하였다 (그림 8, 9).

PCR 반응은 섭씨 94도에서 10분간 denature를 시행하고 94도 1분간, 55도에서 30초간, 72도에서 30초간의 cycles로 하여 30 cycle를 수행하였다. PCR products는 1% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 분리하여 EtBr로 염색을 하여 분석을 하였다.

(2) sCTB-COE 융합항원유전자의 mRNA 발현 확인

sCTB-sCOE 항원유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 Ubiquitin promoter

(pMYV111)를 가지고 있는 construct의 발현을 확인하기 위하여 이 프로모터는 항시성 promoter이므로 발현을 유도하지 않고 전체 RNA를 추출하여 사용하였다. 전체 RNA (40 ug)은 1.2% formaldehyde-containing agarose gel에서 크기로 분리한 후 hybond N+ membrane에 RNA를 옮겼다. 전체 RNA가 옮겨진 blot은 동위원소  $^{32}\text{P}$ 로 labeled 된 sCTB-sCOE probe를 가지고 섭씨 65도에서 hybridization을 실시하여 sCTB-sCOE 항원유전자가 mRNA로 발현됨을 확인하였고 negative control에서는 발현이 확인되지 않았다. 5번과 10번에서 강력한 발현을 확인하였다 (그림 10A).

sCTB-sCOE 항원유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 Amylase 1A promoter (pMYV114)를 가지고 있는 construct의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍과 GA3 (10uM)의 조건에서 5일간 발현을 유도한 후에 전체 RNA를 추출하여 사용하였다. 전체 RNA (40 ug)은 1.2% formaldehyde-containing agarose gel에서 크기로 분리한 후 hybond N+ membrane에 RNA를 옮겼다. 전체 RNA가 옮겨진 blot은 동위원소  $^{32}\text{P}$ 로 labeled 된 sCTB-sCOE probe를 가지고 섭씨 65도에서 hybridization을 실시하여 sCTB-sCOE 항원유전자가 mRNA로 발현됨을 확인하였고 negative control에서는 발현이 확인되지 않았다. 1번과 3번에서 강력한 발현을 확인하였다 (그림 10B).

sCTB-sCOE 항원유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 Amylase 3D promoter (pMYV118)를 가지고 있는 construct의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍의 조건에서 5일간 발현을 유도한 후에 전체 RNA를 추출하여 사용하였다. 전체 RNA (40 ug)은 1.2% formaldehyde-containing agarose gel에서 크기로 분리한 후 hybond N+ membrane에 RNA를 옮겼다. 전체 RNA가 옮겨진 blot은 동위원소  $^{32}\text{P}$ 로 labeled 된 sCTB-sCOE probe를 가지고 섭씨 65도에서 hybridization을 실시하여 sCTB-sCOE 항원유전자가 mRNA로 발현됨을 확인하였고 negative control에서는 발현이 확인되지 않았다. 21번과 29번에서 강력한 발현을 확인하였다 (그림 10C).

### (3) sLTB-COE 융합항원유전자의 mRNA 발현 확인

sLTB-sCOE 항원유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 Ubiquitin promoter (pMYV110)를 가지고 있는 construct의 발현을 확인하기 위하여 이 프로모터는 항시성 promoter이므로 발현을 유도하지 않고 전체 RNA를 추출하여 사용하였다. 전체 RNA (40 ug)은 1.2% formaldehyde-containing agarose gel에서 크기로 분리한 후 hybond N+ membrane에 RNA를 옮겼다. 전체 RNA가 옮겨진 blot은 동위원소  $^{32}\text{P}$ 로 labeled 된 sLTB-sCOE probe를 가지고 섭씨 65도에서 hybridization을 실시하여 sLTB-sCOE 항원유전자가 mRNA로 발현됨을 확인하였고 negative control에서는 발현이 확인되지 않았다. 3번과 7번에서 강력한 발현을 확인하였다 (그림 11A).

sLTB-sCOE 항원유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 Amylase 1A promoter (pMYV109)를 가지고 있는 construct의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍과 GA<sub>3</sub> (10 uM)의 조건에서 5일간 발현을 유도한 후에 전체 RNA를 추출하여 사용하였다. 전체 RNA (40 ug)은 1.2% formaldehyde-containing agarose gel에서 크기로 분리한 후 hybond N+ membrane에 RNA를 옮겼다. 전체 RNA가 옮겨진 blot은 동위원소  $^{32}\text{P}$ 로 labeled 된 sLTB-sCOE probe를 가

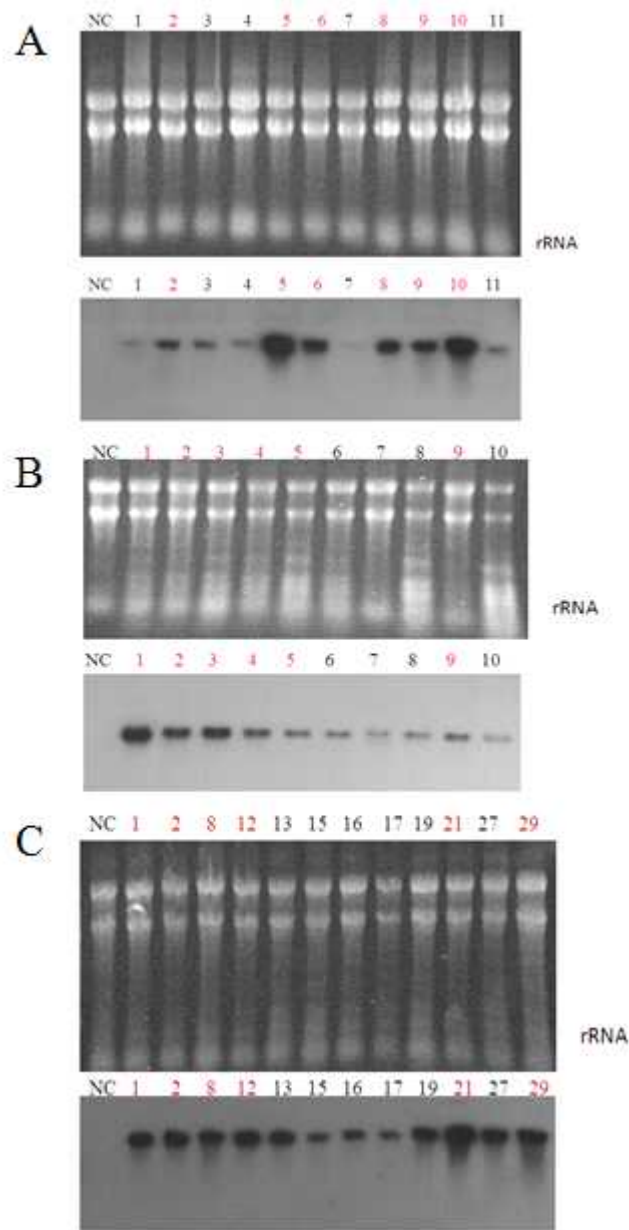


그림 10. Northern blot analysis of transgenic rice calli using  $^{32}\text{P}$ -labeled sCTB-sCOE as probe. Detection of sCTB-sCOE mRNA in transgenic rice calli were transformed with plasmid pMYV111(A), pMYV114(B) and pMYV118(C). NC is total RNA in wild-type rice calli.

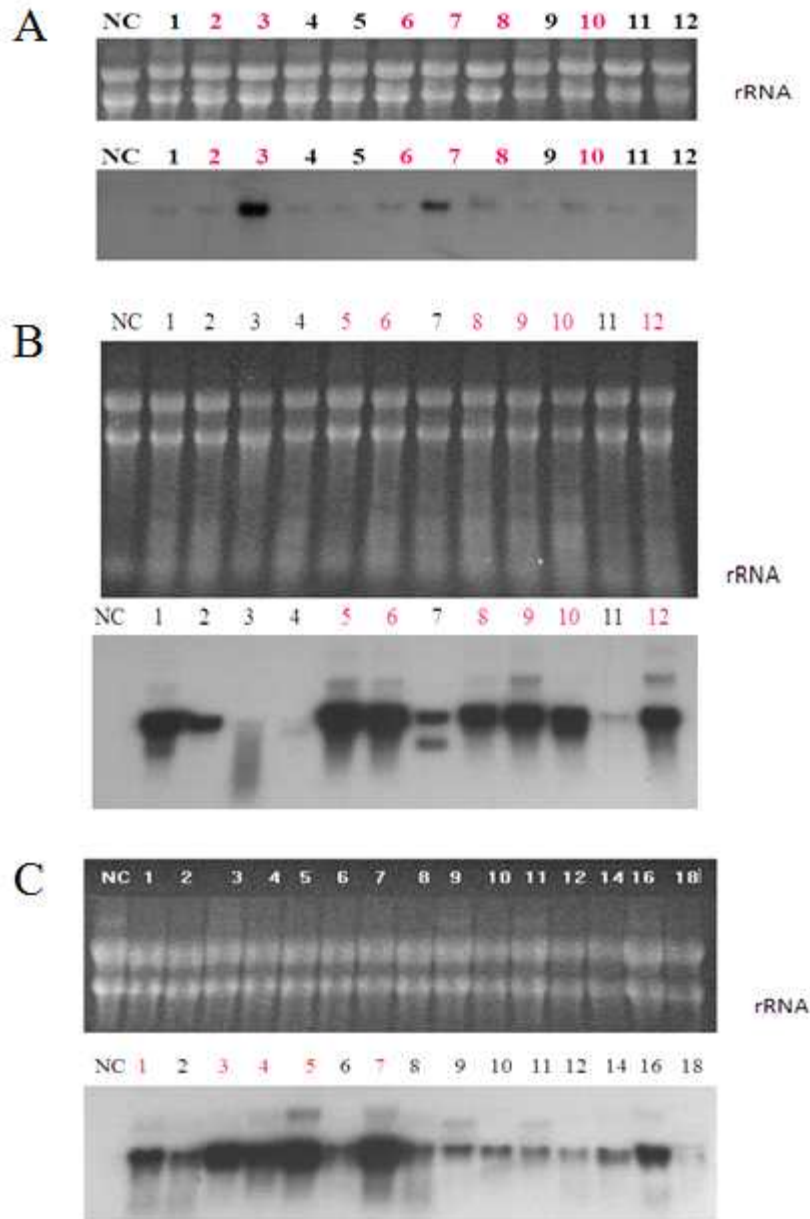


그림 11. Northern blot analysis of transgenic rice calli using  $^{32}\text{P}$ -labeled sLTB-sCOE as probe. Detection of sLTB-COE mRNA in transgenic rice calli were transformed with plasmid pMYV110(A), pMYV109(B) and pMYV116(C). NC is total RNA in wild-type rice calli.

지고 섭씨 65도에서 hybridization을 실시하여 sLTB-sCOE 항원유전자가 mRNA로 발현됨을 확인하였고 negative control에서는 발현이 확인되지 않았다. 5번과 6번에서 강력한 발현을 확인하였다 (그림 11B).

sLTB-sCOE 항원유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 Amylase 3D promoter (pMYV116)를 가지고 있는 construct의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍의 조건에서 5일간 발현을 유도한 후에 전체 RNA를 추출하여 사용하였다. 전체 RNA (40 ug)은 1.2% formaldehyde-containing agarose gel에서 크기로 분리한 후 hybrid N+ membrane에 RNA를 옮겼다. 전체 RNA가 옮겨진 blot은 동위원소  $^{32}\text{P}$ 로 labeled 된 sLTB-sCOE probe를 가지고 섭



씨 65도에서 hybridization을 실시하여 sLTB-sCOE 항원유전자가 mRNA로 발현됨을 확인하였고 negative control에서는 발현이 확인되지 않았다. 5번과 7번에서 강력한 발현을 확인하였다 (그림 11C).

(4) sCTB-COE 융합항원단백질의 발현 확인

sCTB-sCOE 항원유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 Ubiquitin promoter (pMYV111)를 가지고 있는 construct의 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 이 프로모터는 항시성 promoter이므로 발현을 유도하지 않고 전체 단백질을 추출하여 사용하였다. 전체 단백질은 12% SDS-PAGE gel에서 크기로 분리한 후 hybond C membrane에 전기적인 방법을 이용하여 단백질을 옮겼다. 전체 단백질이 옮겨진 blot은 primary 항체로 CT에 특이적인 항체 또는 COE에 특이적인 항체를 사용하였고 2차 항체로는 anti-rabbit IgG antiserum 또는 anti-mouse IgG antiserum을 사용하였다. Western blot 분석 결과, sample을 끓이지 않은 조건에서 CT와 COE 항체를 사용하여 assembled 된 크기에서 항원단백질의 발현을 확인하였다. Samples를 끓인 조건에서는 희미하게 항원단백질의 monomer 형태를 확인하여 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 12).

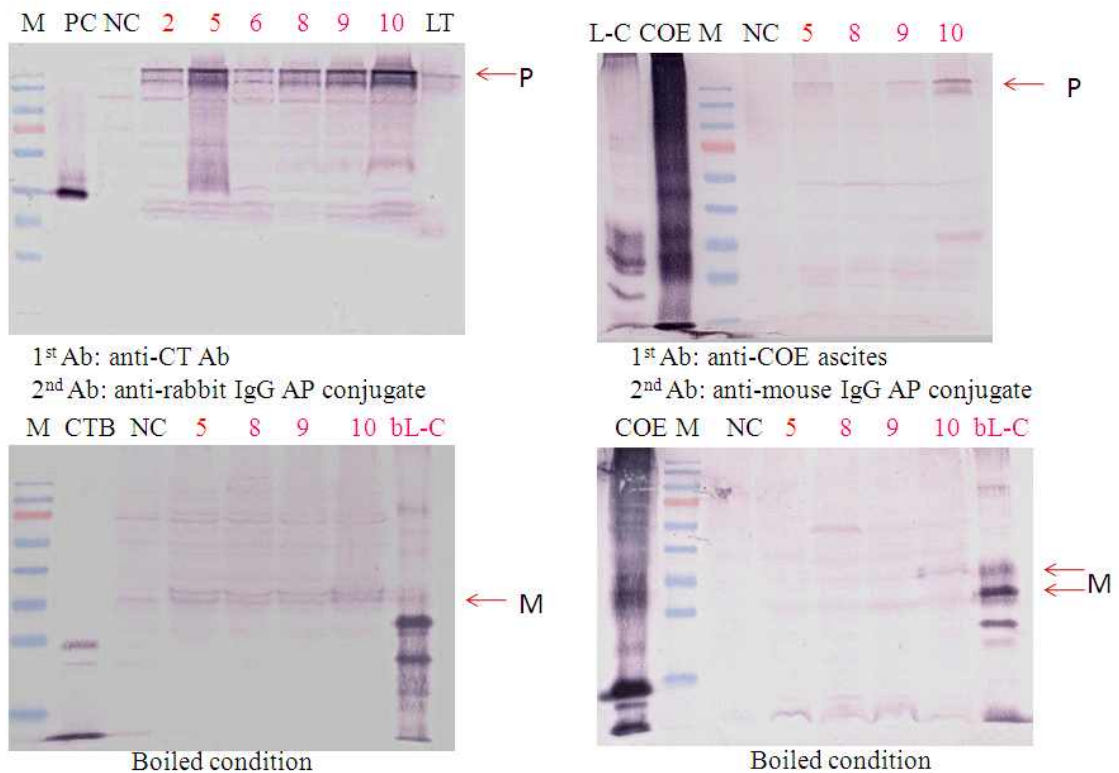


그림 12. Western blot analysis of transgenic rice calli transformed with plasmid pMYV111 using a rabbit anti-CT antiserum and mouse anti-COE ascites. M indicates CTB-COE monomer and P indicates CTB-COE pentamer.

sCTB-sCOE 항원유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 Amylase 1A promoter (pMYV114)를 가지고 있는 construct의 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍과 GA3 첨가 조건에서 항원단백질의 발현을 7일간 유도하여 전체 단백질을 추출하여 사용하였



다. 전체 단백질을 12% SDS-PAGE gel에서 크기로 분리한 후 hybond C membrane에 전기적인 방법을 이용하여 단백질을 옮겼다. 전체 단백질이 옮겨진 blot은 primary 항체로 CT에 특이적인 항체 또는 COE에 특이적인 항체를 사용하였고 2차 항체로는 anti-rabbit IgG antiserum을 사용하였다. Western blot 분석 결과, sample을 끓이지 않은 조건에서 CT 항체를 사용하여 assembled 된 크기와 monomer 크기에서 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 13).

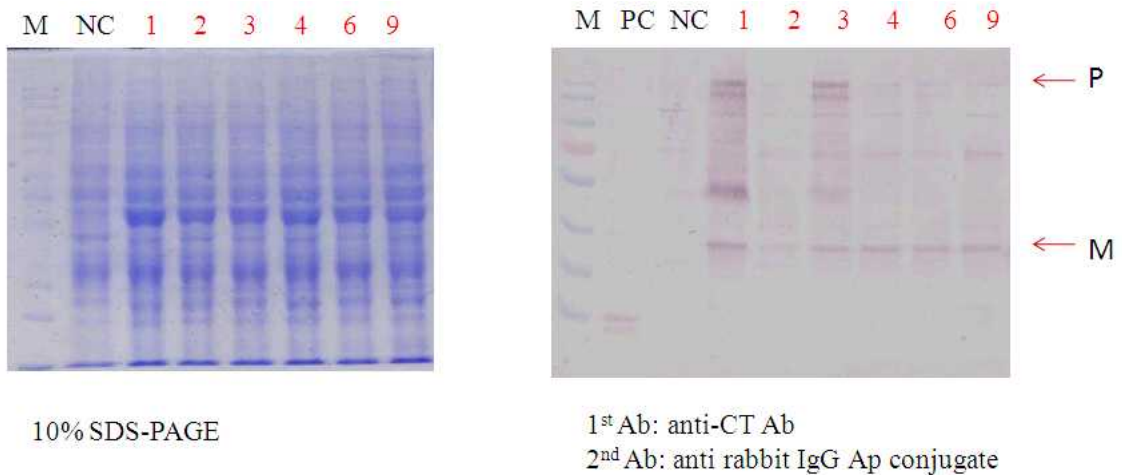


그림 13. Western blot analysis of transgenic rice calli were transformed with plasmid pMYV114 using a rabbit anti-CT antiserum. M indicates CTB-COE monomer and P indicates CTB-COE pentamer.

sCTB-sCOE 항원유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 amylase 3D promoter (pMYV118)를 가지고 있는 construct의 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍 조건에서 항원단백질의 발현을 유도하여 전체 단백질을 추출하여 사용하였다. 전체 단백질은 12% SDS-PAGE gel에서 크기로 분리한 후 hybond C membrane에 전기적인 방법을 이용하여 단백질을 옮겼다. 전체 단백질이 옮겨진 blot은 primary 항체로 CT에 특이적인 항체를 사용하였고 2차 항체로는 anti-rabbit IgG antiserum을 사용하였다. Western blot 분석 결과, sample을 끓이지 않은 조건에서 CT 항체를 사용하여 assembled 된 크기와 monomer 크기에서 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 14).

#### (5) sLTB-COE 융합항원단백질의 발현 확인

sLTB-sCOE 항원유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 Ubiquitin promoter (pMYV110)를 가지고 있는 construct의 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 이 프로모터는 항시성 promoter이므로 발현을 유도하지 않고 전체 단백질을 추출하여 사용하였다. 전체 단백질은 12% SDS-PAGE gel에서 크기로 분리한 후 hybond C membrane에 전기적인 방법을

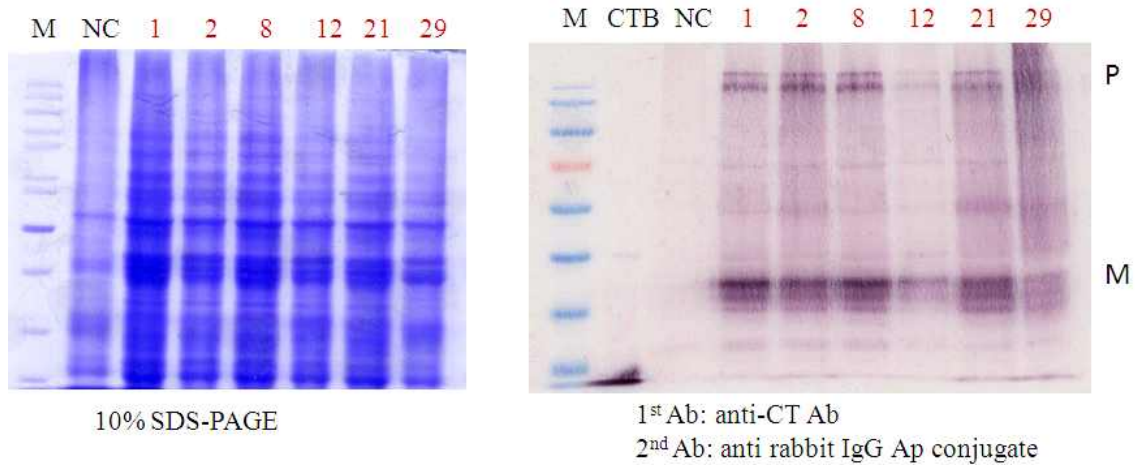


그림 14. Western blot analysis of transgenic rice calli were transformed with plasmid pMYV118 using a rabbit anti-CT antiserum. M indicates CTB-COE monomer and P indicates CTB-COE pentamer.

이용하여 단백질을 옹겼다. 전체 단백질이 옹겨진 blot은 primary 항체로 LTB에 특이적인 항체 또는 COE에 특이적인 항체를 사용하였고 2차 항체로는 anti-rabbit IgG antiserum 또는 anti-mouse IgG antiserum을 사용하였다. Western blot 분석 결과, sample을 끓이지 않은 조건에서 LTB와 COE 항체를 사용하여 assembled 된 크기에서 항원단백질의 발현을 확인하였다. Samples를 끓인 조건에서는 희미하게 항원단백질의 monomer 형태를 확인하여 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 15).

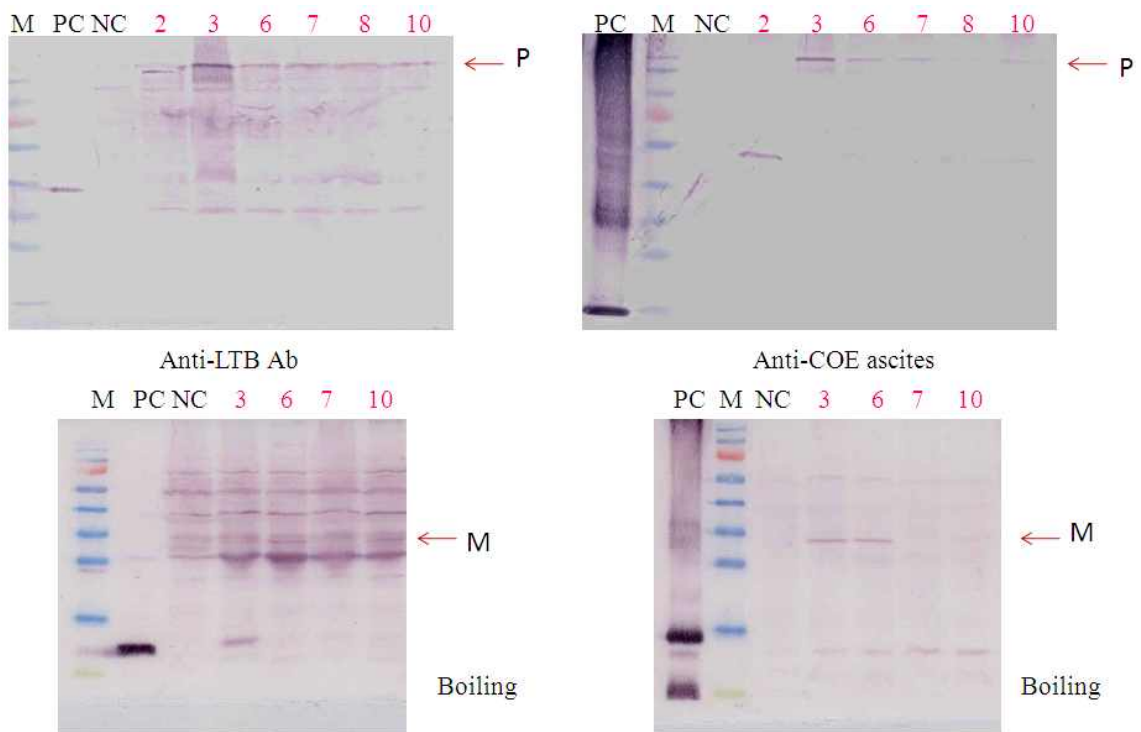


그림 15. Western blot analysis of transgenic rice calli were transformed with plasmid pMYV110 using a rabbit anti-LTB antiserum and mouse anti-COE ascites. M indicates CTB-COE monomer and P indicates CTB-COE pentamer.

sLTB-sCOE 항원유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 Amylase 1A promoter (pMYV109)를 가지고 있는 construct의 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍과 GA<sub>3</sub> 첨가 조건에서 항원단백질의 발현을 7일간 유도하여 전체 단백질을 추출하여 사용하였다. 전체 단백질은 12% SDS-PAGE gel에서 크기로 분리한 후 hybond C membrane에 전기적인 방법을 이용하여 단백질을 옮겼다. 전체 단백질이 옮겨진 blot은 primary 항체로 LTB에 특이적인 항체 또는 COE에 특이적인 항체를 사용하였고 2차 항체로는 anti-rabbit IgG antiserum을 사용하였다. Western blot 분석 결과, sample을 끓이지 않은 조건에서 LTB 항체를 사용하여 assembled 된 크기와 monomer 크기에서 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 16).

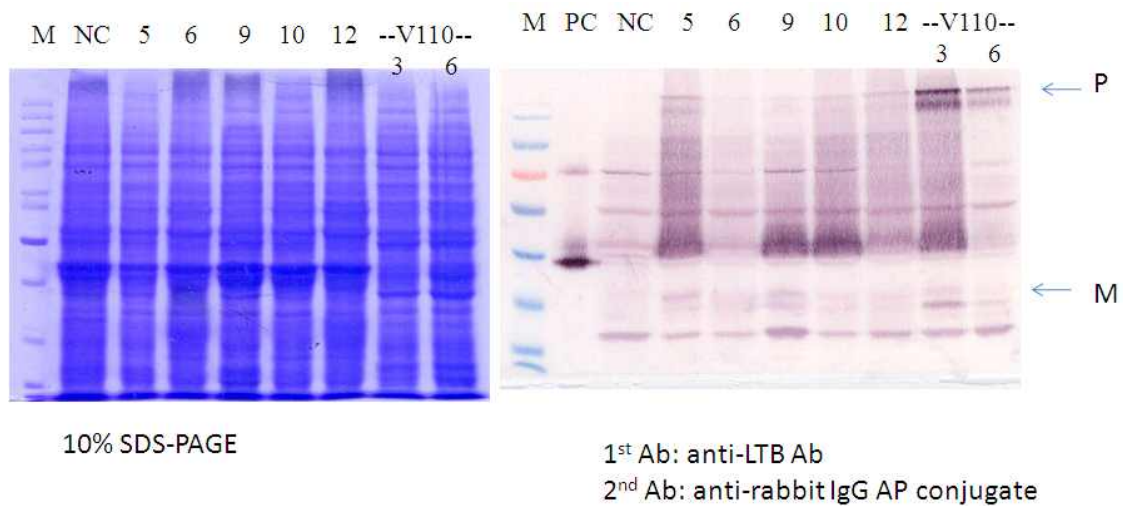


그림 16. Western blot analysis of transgenic rice calli were transformed with plasmid pMYV109 using a rabbit anti-LTB antiserum. M indicates CTB-COE monomer and P indicates CTB-COE pentamer.

sLTB-sCOE 항원유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 amylose 3D promoter (pMYV116)를 가지고 있는 construct의 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 당의 결핍 조건에서 항원단백질의 발현을 유도하여 전체 단백질을 추출하여 사용하였다. 전체 단백질은 12% SDS-PAGE gel에서 크기로 분리한 후 hybond C membrane에 전기적인 방법을 이용하여 단백질을 옮겼다. 전체 단백질이 옮겨진 blot은 primary 항체로 LTB에 특이적인 항체를 사용하였고 2차 항체로는 anti-rabbit IgG antiserum을 사용하였다. Western blot 분석 결과, sample을 끓이지 않은 조건에서 LTB 항체를 사용하여 assembled 된 크기와 monomer 크기에서 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 17).

#### (6) 다른 promoter에 대한 항원단백질 발현의 비교

##### (가) 쌀 세포배양에서 시간에 따른 항원단백질의 발현

형질전환 식물체에서 항원단백질의 발현을 확인하고 가장 항원단백질의 발현이 높은

시기를 알아보기 위하여 시간에 따른 항원단백질의 발현을 항원단백질에 특이적인 항체를 이용하여 western blot 분석을 이용하여 확인하였다.

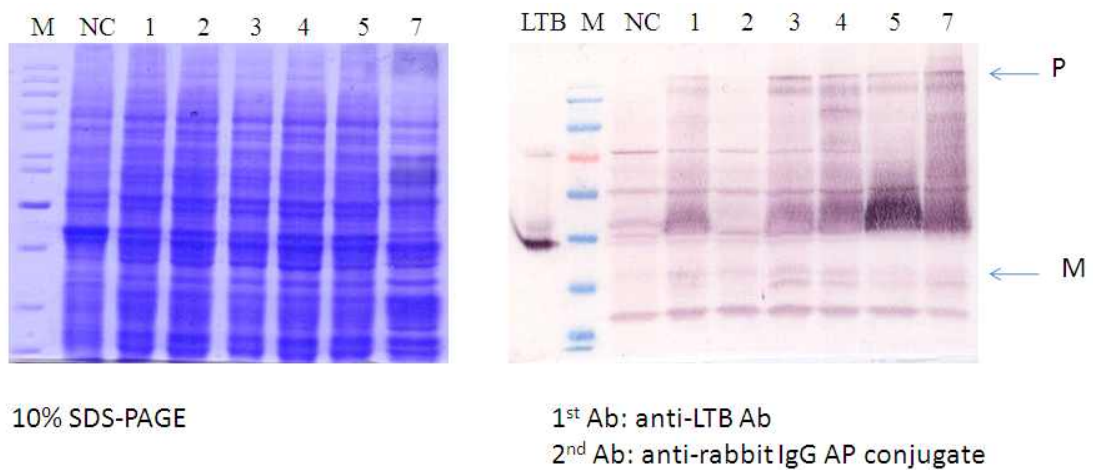


그림 17. Western blot analysis of transgenic rice calli were transformed with plasmid pMYV116 using a rabbit anti-LTB antiserum.

Ubiquitin promoetr의 조절 하에서 있는 CTB-COE 항원단백질을 발현하는 쌀의 세포를 이용한 현탁배양에서는 발현이 낮은 경우(#5)에 시간에 따라 발현된 항원단백질의 증가를 보였으나 고발현인 경우(#10)에는 발현 초기부터 발현이 높게 나왔고 시간에 따라 발현의 증가를 보이지는 않았다 (그림 18).

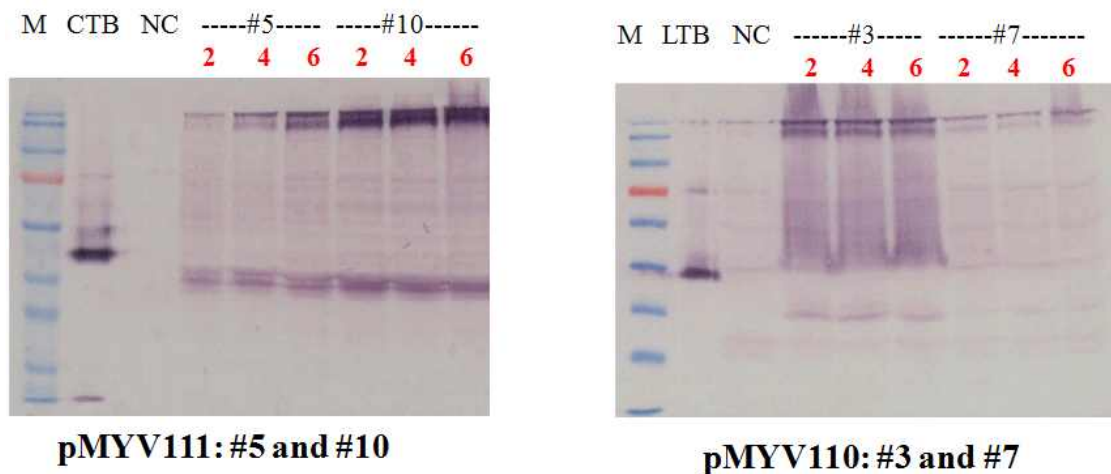


그림 18. Time course western blot analysis of transgenic rice calli transformed with plasmid pMYV111 and pMYV110 after subculture in N6SE liquid medium with 2 day interval using a rabbit anti CT (pMYV111) or LTB (pMYV110) antiserum

Ubiquitin promoetr의 조절 하에서 있는 LTB-COE 항원단백질을 발현하는 쌀의 세포를 이용한 현탁배양에서는 발현이 낮은 경우(#7)와 고발현인 경우(#3)에 시간에 따라 발현된 항원단백질의 증가를 보이지 않았고 고발현인 경우에 발현초기부터 발현이 높게 나왔고 시간에 따라 발현의 증가를 보이지는 않았다 (그림 18).

Amylase 1A promoter의 조절 하에서 있는 CTB-COE 항원단백질을 발현하는 쌀의 세포를 이용한 현탁배양에서는 당의 결핍과 GA<sub>3</sub> 10 uM의 조건에서 발현을 유도한 후 1~1.5일에 높은 항원단백질의 발현을 보이고 2.5 일 부터 감소를 보였다 (그림 19A).

Amylase 1A promoter의 조절 하에서 있는 LTB-COE 항원단백질을 발현하는 쌀의 세포를 이용한 현탁배양에서는 당의 결핍과 GA<sub>3</sub> 10 uM의 조건에서 발현을 유도한 후 전체적으로 비슷한 발현 양상을 보이고 2.5일부터 감소를 보였다 (그림 19B).

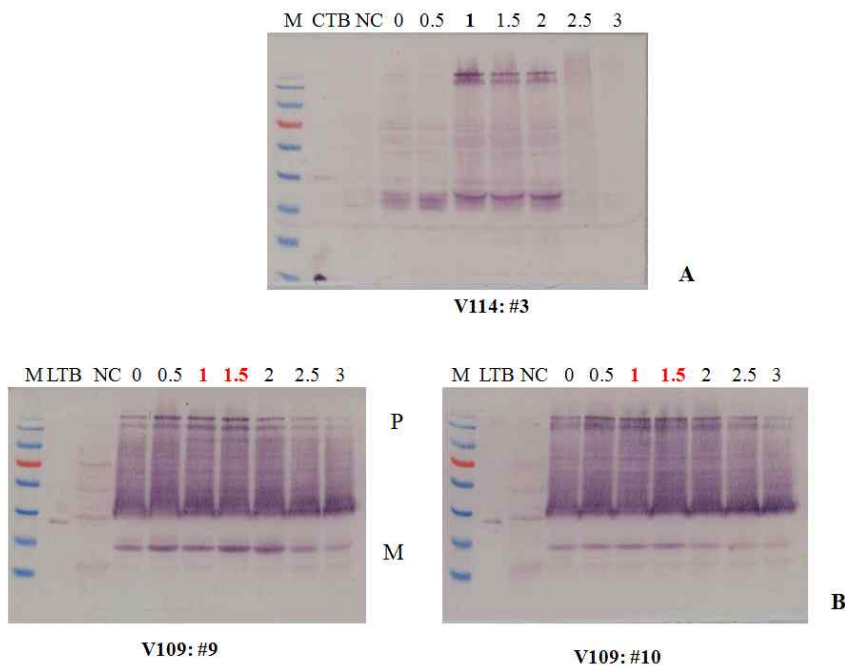


그림 19. Time course western blot analysis of rice calli transformed with pMYV114 (A) and pMYV109 (B) after induction in N6SE liquid medium without sucrose and 10  $\mu$ M GA<sub>3</sub> with 0.5 day interval using a rabbit anti CT (A) or LTB (B) antiserum.

Amylase 3D promoter의 조절하에서 있는 CTB-COE 항원단백질을 발현하는 쌀의 세포를 이용한 현탁배양에서는 당의 결핍의 조건에서 발현을 유도한 후 2~2.5일에 높은 항원단백질의 발현을 보였다 (그림 20A).

Amylase 3D promoter의 조절하에서 있는 LTB-COE 항원단백질을 발현하는 쌀의 세포를 이용한 현탁배양에서는 당의 결핍의 조건에서 발현을 유도한 후 2~2.5일에 고발현을 보였다 (그림 20B).

#### (나) 다른 promoter를 가지고 있는 항원단백질의 발현 양상 비교

본 실험에서 사용한 각각의 다른 promoter에 따른 항원단백질의 발현량을 비교하여 보기 위하여 CTB-COE 항원유전자로 형질전환된 calli를 시간별로 확인한 고발현의 조건에서 발현된



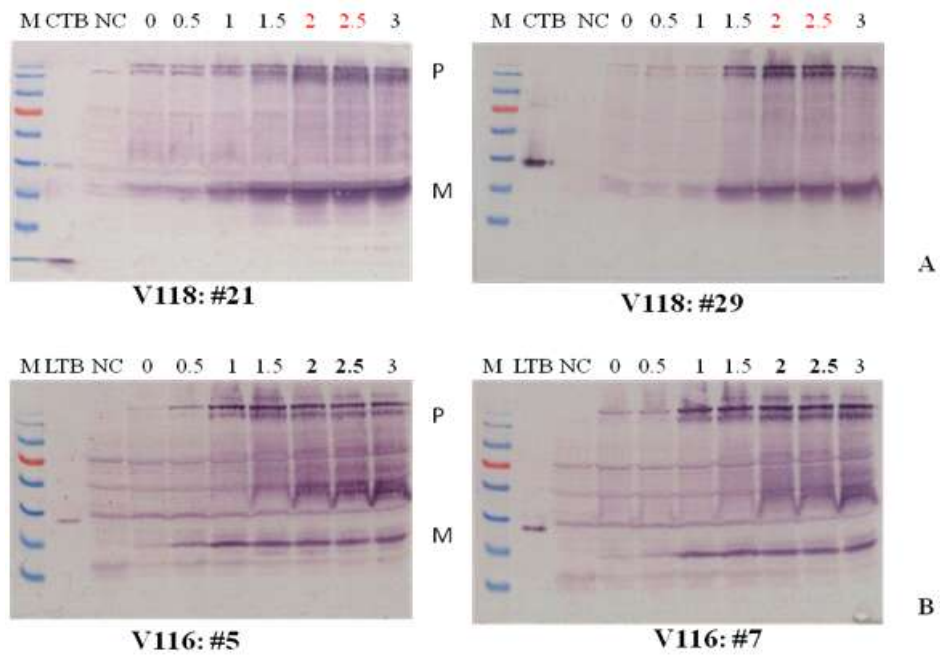
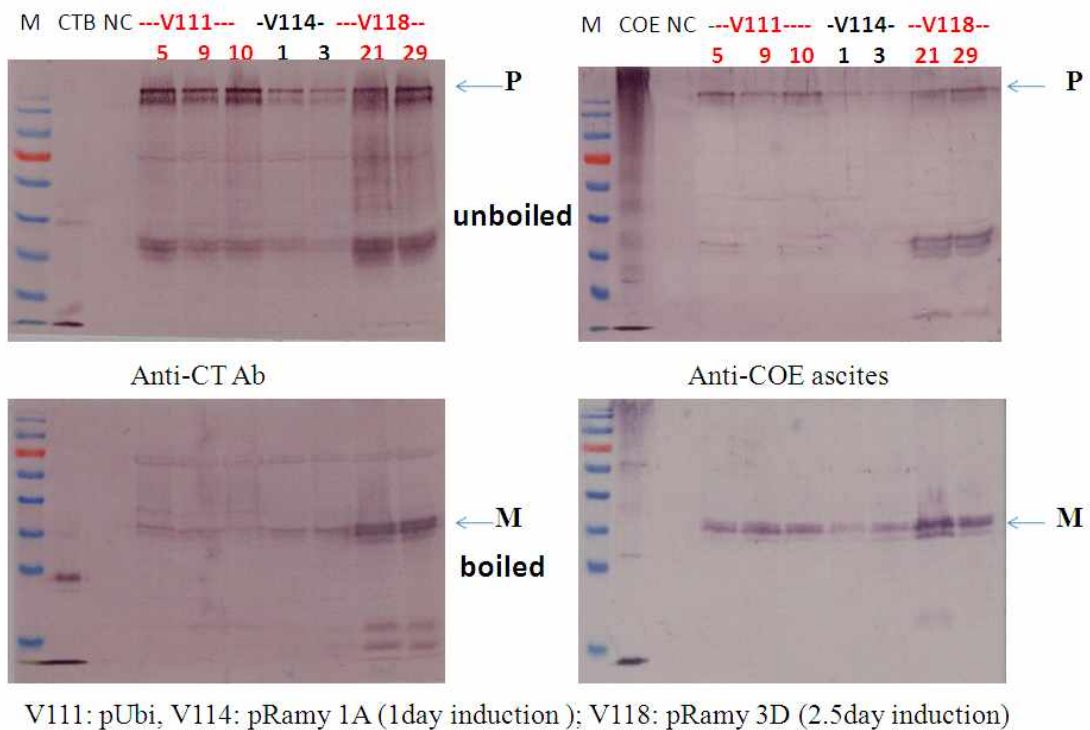


그림 20. Time course western blot analysis of rice calli transformed with pMYV118 (A) and pMYV116 (B) after induction in N6SE liquid medium without sucrose with 0.5 day interval using a rabbit anti CT (A) or LTB (B) antiserum.

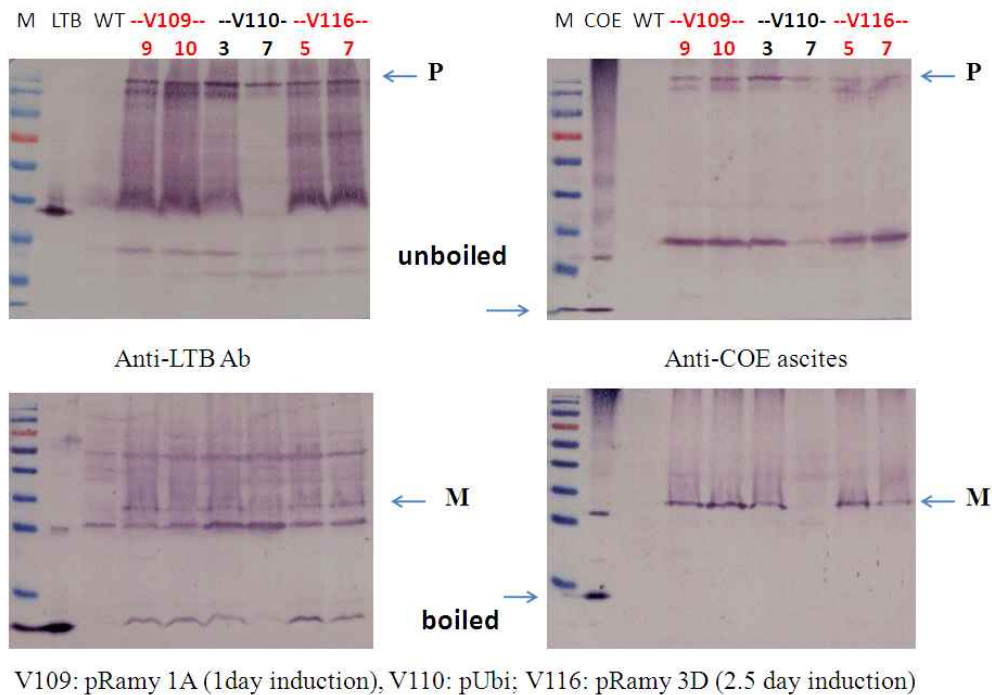


V111: pUbi, V114: pRamy 1A (1day induction); V118: pRamy 3D (2.5day induction)

그림 21. Comparison of the expression of CTB-COE fusion protein under the control of different promoters by using Western blot analysis.

항원단백질의 양을 western blot 분석을 이용하여 비교하여 보았다. CT에 대한 항체를 가지고 비교한 결과 unboiled 조건에서는 Ubiquitin promoter와 Amylase 3D promoter에서 고발현을 보였고 boiled 조건에서는 Amylase 3D promoter에서 monomer가 가장 많이 관찰되었다. COE에 대한 항체를 가지고 한 결과는 CT에 대한 항체를 가지고한 결과와 같은 결과를 보였다 (그림 21).

각각의 다른 promoter에 따른 항원단백질의 발현량을 비교하여 보기 위하여 LTB-COE 항원유전자로 형질전환된 calli를 시간별로 확인한 고발현의 조건에서 발현된 항원단백질의 양을 western blot 분석을 이용하여 비교하여 보았다. LTB에 대한 항체를 가지고 비교한 결과 unboiled 조건에서는 Ubiquitin promoter에서 적게 보이는 하나만 제외하고 모든 promoter에서 비슷한 고발현을 보였고 boiled 조건에서도 비슷한 결과를 관찰하였다. COE에 대한 항체를 가지고 한 결과는 LTB에 대한 항체를 가지고한 결과와 같은 결과를 보였다 (그림 22).



V109: pRamy 1A (1day induction), V110: pUbi; V116: pRamy 3D (2.5 day induction)

그림 22. Comparison of the expression of LTB-COE protein under the control of different promoters by using Western blot analysis.

각각 다른 promoter를 가지고 있는 constructs에서  $G_{M1}$ -ELISA 방법을 이용하여 정량을 수행하여 발현량을 비교하고 또한 발현된 항원단백질이 CTB와 LTB의 수용체로 알려진  $G_{M1}$ -ganglioside에 대한 결합능을 가지고 있는지 확인하였다.

CTB-COE 항원유전자를 발현하는 형질전환체에서는 western blot 분석에서는 ubiquitin과 amylase 3D에서 비슷한 결과를 보였으나  $G_{M1}$ -ELISA 결과는 Amylase 3D에서 고발현을 보였다. 각각 다른 promoter에서 발현된 항원단백질 모두에서 수용체인  $G_{M1}$ -ganglioside에 대해서는 결합능을 보임으로 CTB의 기능을 확인하였다 (그림 23).

LTB-COE 항원유전자를 발현하는 형질전환체에서는 western blot 분석에서는 각각 다른 모든 promoter에서 항원단백질의 발현량이 비슷한 결과를 보였고  $G_{M1}$ -ELISA 결과도 비슷

한 결과를 보였다. 각각 다른 promoter에서 발현된 항원단백질 모두에서 수용체인  $G_{M1}$ -ganglioside에 대해서는 결합능을 보임으로 LTB의 기능을 확인하였다 (그림 24).

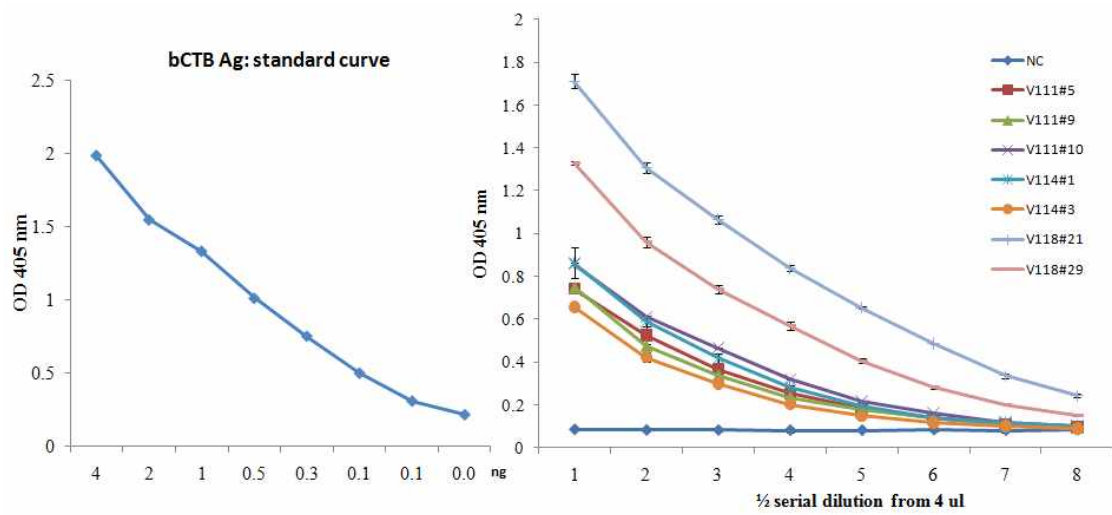


그림 23.  $G_{M1}$ -binding ELISA confirmed pentameric CTB-COE fusion protein bound to the intestinal membrane  $G_{M1}$ -ganglioside receptor and estimated pentameric CTB-COE protein levels in transgenic rice calli that were transformed with plasmids pMYV111, pMYV114 and pMYV118.

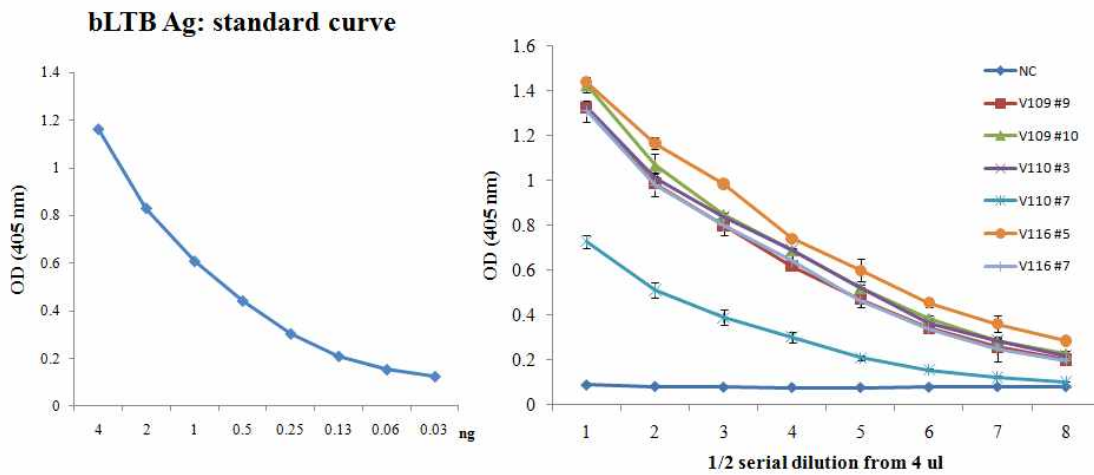


그림 24.  $G_{M1}$ -binding ELISA confirmed pentameric LTB-COE fusion protein bound to the intestinal membrane  $G_{M1}$ -ganglioside receptor and estimated pentameric CTB-COE protein levels in transgenic rice calli that were transformed with plasmids pMYV110, pMYV109 and pMYV116.



다. 다른 promoter를 가지고 있는 항원단백질의 발현량

G<sub>M1</sub>-ELISA의 결과를 토대로 하여 bacterial CTB protein을 이용하여 만든 standard curve를 이용하여 정량을 한 결과 고발현을 보인 Amylase 3D promoter의 조절하의 형질전환체에서 0.18 ug/100 mg of fresh weight의 발현량을 확인하였다 (그림 25).

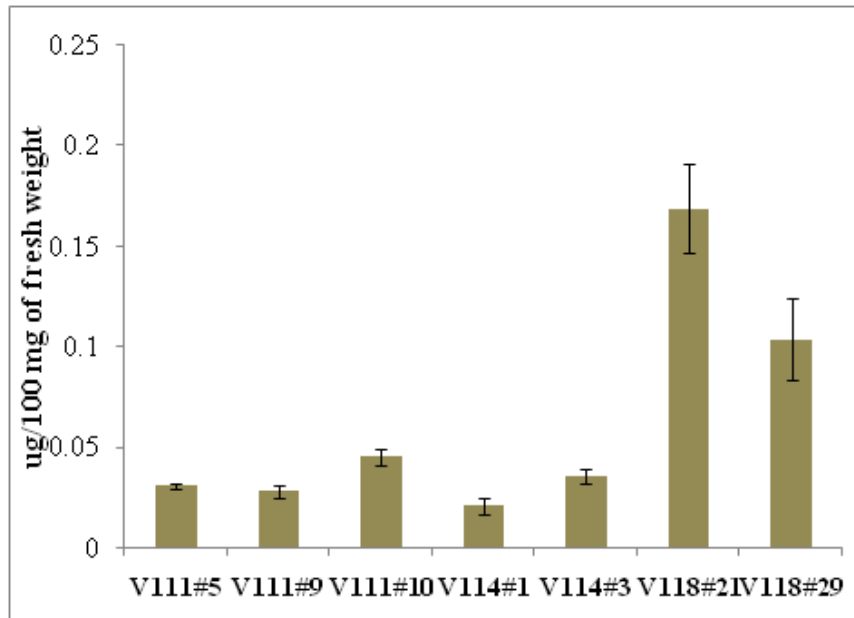


그림 25. The level of CTB-COE expression levels of transgenic rice calli that were transformed with plasmids pMYV111, pMYV114 and pMYV118.

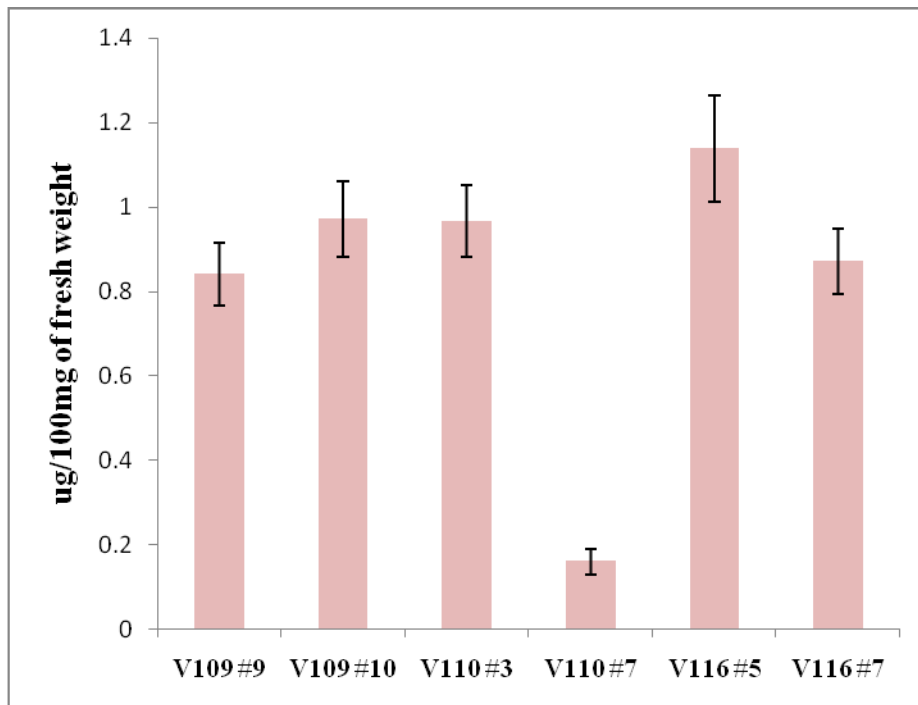


그림 26. The level of CTB-COE expression levels of transgenic rice calli that were transformed with plasmids pMYV109, pMYV110 and pMYV116.

G<sub>M1</sub>-ELISA의 결과를 토대로 하여 bacterial LTB protein을 이용하여 만든 standard curve를 이용하여 정량을 한 결과 고발현을 보인 Amylase 3D promoter의 조절하의 형질전환체에서 1.15 ug/100 mg of fresh weight의 발현량을 확인하였다 (그림 26).

## 2. 형질전환 식물체 재분화 및 homoline 선발

### 가. 형질전환 식물체 재분화

N6 선발배지에 옮긴 후에 2-3 후에 형질전환체로 보이는 캘러스가 나타나기 시작을 하였고 형질전환체로 보이는 부분을 잘라 새로운 배지로 옮겨가면서 배양하였다.

재분화를 위해서 형질전환된 것으로 보이는 캘러스를 비타민이 첨가된 N6 salts (3.957 g/l), sucrose (30 g/l), proline (0.5 g/l), glutamine (0.5 g/l), casein enzymatic hydrolysate (0.3 g/l), NAA (0.5 mg/l), BAP (3 mg/l) 그리고 hygromycin B (50 mg/l)가 첨가된 Cambia 배지에 옮겨서 재분화를 유도하였다.

재분화된 식물체는 온실에서 재배를 하여 종자를 확보하였음 (표 1). 종자를 확보하지 못한 constructs는 계속하여 재분화를 시도하였다.

표 1. 수확한 벼의 종자

Plasmid name	Construct	Promoter	Line	Seed number	Expression level (%TSP)	Note (Exp. rate)
pMYV110	LTB-COE	Ubiquitin	#3	22	0.212%	The highest
			#6	50	0.038%	The 2 <sup>nd</sup>
pMYV109	LTB-COE	Ramy-1A	#3-T1	60	Low	
			#3-T2	50	ND	
			#6	140	0.003%	
pMYV116	LTB-COE	Ramy-3D	#11	3	low	
pMYV111	CTB-COE	Ubiquitin	#4	15	medium	

나. 형질전환 식물체 homoline 선발

(1) 식물 발현 벡터 제작

(가) Agrobacterium-mediated 벼의 형질전환을 위한 식물발현 벡터 제작

형질전환 식물체의 homoline 선발과 농업형질검사를 위해서는 도입된 항원유전자의 copy 수가 적어야 한다는 지적에 의해서 도입된 항원유전자가 안정적이고 copy 수가 적게 존재하는 형질전환 식물체를 확보하기 위하여 Agrobacterium-mediated 형질전환을 수행하였다.

Target 유전자는 앞 실험에서 수행한 연구결과에서 형질전환 식물체에서 항원단백질의 발현에 대한 좋은 결과를 보인 sLTB-sCOE 융합항원유전자를 선택하였고 항시성 프로모터이면서 강력한 발현을 보이는 Ubiquitin 프로모터를 이용하였다.

Ubiquitin promoter, sLTB-sCOE 융합항원유전자, 3' Nos를 포함하고 있는 pMYV110를 HindIII와 EcoRI 제한효소로 자르고, Bar 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pMYP126의 HindIII와 EcoRI site에 subcloning을 하여 HindIII와 EcoRI 제한효소로 처리하여 2 kb 크기의 DNA 절편을 확인하여 형질전환을 확인하였고 pMYV743이라 명명하였다 (그림 27, 28).

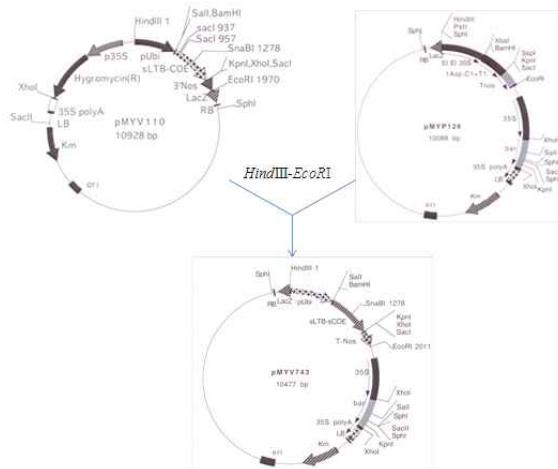


그림 27. Agrobacterium-mediated 형질전환을 위한 식물발현벡터 제작

식물발현벡터 pMYV743은 tri-parental mating transformation 방법을 이용하여 Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404에 형질전환하여 선발배지에서 선발된 Agrobacterium에서 plasmid를 추출하여 HindIII와 EcoRI 제한효소로 처리하여 2.0 kb의 DNA 절편 크기를 확인하여 형질전환을 확인하였음 (그림 28).

(나) M-cell binding peptide Col과 융합된 항원유전자의 식물발현벡터 제작

형질전환 식물체의 경구백신으로 이용할 때 항원단백질의 낮은 발현율에 의한 낮은 면역반응 유도 및 면역관용의 문제가 발생하는데 이를 해결하기 위하여 항원단백질을 adjuvant와 carrier로서 기능을 가지고 있는 cholera toxin B subunit (CTB)와 enterotoxigenic

*E. coli* enterotoxin B subunit (LTB)에 융합시키는 방법이 많이 이용되는데, CTB와 LTB는 면역증진을 위한 기능을 하기 위하여 pentamer로 조립이 되어야 하는데 조립시 융합된 항원단백질의 크기에 대한 제한이 존재한다. 이러한 문제점을 해결하고 또한 면역유도의 효율성이 더 높은 것으로 알려진 M Cell binding peptide, Col,을 이용하여 Col-융합항원단백질을 식물에서 발현시키고자 하였다.

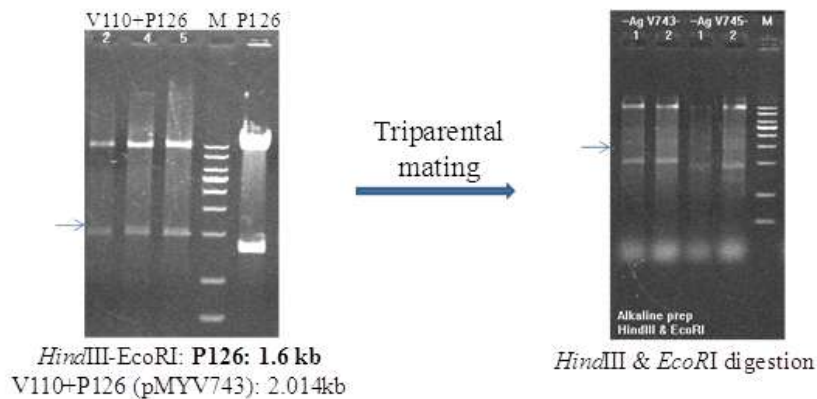


그림 28. pMYV743의 제한효소 mapping과 형질전환된 Agrobacterium 분석

M cell targeting peptide, Col ligand를 항원유전자의 c-terminal에 붙이기 위하여 primer를 다음과 같이 제작하였다. sCOE 유전자와 homology를 가지고 있는 Forward primer 5'-GGA TCC GTT ACT TTG CCA TCC TT-3'와 Col을 포함하는 reverse primer 5'-GGT ACC TGG AAG TGG AGA TCT AGC TGG AAG CTG ATG AAA AGA AAC ATC TGT GAT TCC C-3'를 제작하였다. 각 primers는 subcloning의 편의를 위하여 BamHI과 KpnI 제한효소 부위(밑줄 친)를 포함하고 있고 Col sequences는 이탤릭체로 표기되어있다.

위에서 합성한 primers를 가지고 sCOE 유전자를 포함하고 있는 pMYV93 plasmid를 template로 이용하고 Ex Taq을 이용하여 polymerase chain reaction을 수행하여 470 bp 정도의 DNA 절편을 얻은 후, pGEMT-Easy vector에 cloning을 하였고 T7과 SP6 primer를 이용하여 DNA 염기서열 분석을 수행하여 염기서열을 확인하였고 이 plasmid를 pMYV730이라 명명하였다.

pMYV730을 BamHI과 KpnI 제한효소로 자른 후 얻은 470 bp의 DNA 절편을 Rice amyase 3D promoter, signal peptide, 그리고 3' untranslated region (3'UTR)를 가지고 있는 pMYV640의 같은 제한효소 부위에 subcloning을 하였고, BamHI과 KpnI 제한효소로 잘라 470 bp 정도의 DNA 절편을 확인한 후 pMYV733이라 명명하였다 (그림 29).

## (2) 벼 형질전환과 재분화

### (가) Particle bombardment-mediated transformation 방법을 이용한 벼의 형질전환

표면소독을 실시하고 껍질을 벗겨낸 mature rice seed를 2,4-dichlorophenoxylic acid (2 mg/l), sucrose (30 g/l), kinetin (0.2 mg/l)를 포함하는 N6 callus induction 배지에 7일간 치상하여 얻은 callus를 particle bombardment-mediated 형질전환 방법을 이용하여 pMYV733

plasmid로 형질전환 하였다.

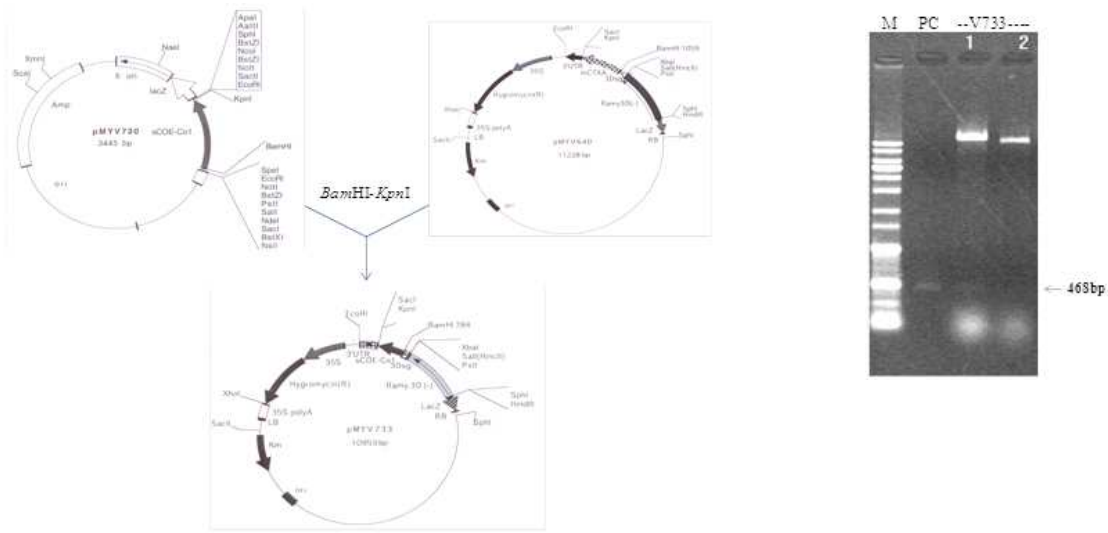


그림 29. sCOE-Co1 융합유전자의 식물발현 벡터 제작

형질전환 한 callus는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2 mg/l), sucrose (30 g/l), kinetin (0.2 mg/l), glucose (10 g/l)를 포함하고 항생제를 포함하지 않은 N6 co-culture 배지에서 2일간 암배양을 하고 항생제 hygromycin (50 mg/l)이 첨가된 N6 selection 배지에서 배양하였고 2-3 주 후에 형질전환 된 callus가 보이기 시작하였다.

(나) Agrobacterium-mediated 벼 형질전환

Sucrose (30 g/l), casamino acids (1 g/l), 2,4-D (2 mg/l), gelrite (2 g/l), pH 5.8를 포함하는 N6 medium에서 2 주간 유도된 callus를 1 주간 새로운 배지에서 배양하고 형질전환하기 전 3일간 새로운 배지에 한 번 더 배양을 하여 형질전환 할 callus를 준비하였고 pMYV743 식물발현벡터를 포함하고 있는 Agrobacterium을 2일간 배양한 배양액의 200 ul를 plate에 spreading하여 2-3일간 배양하였고 AAM 배지로 resuspended한 용액에 200 uM의 최종농도가 되게 acetosyringone를 첨가하여 형질전환에 이용할 Agrobacterium 용액을 준비하였다.

준비된 callus를 Agrobacterium 용액에 10분간 침지하고 멸균된 기름종이에 용액을 제거한 후, sucrose (30 g/l), casamino acids (1 g/l), 2,4-D (2 mg/l), glucose (10 g/l), gelrite (2 g/l), acetosyringone (100 μM), pH 5.2를 포함하는 N6 co-culture medium에서 암상태로 3-5일간 배양하고 cefotaxime이 첨가된 멸균수로 세척하고 멸균된 기름종이로 용액을 제거한 후 phosphinothricin (PPT) (4 mg/l)가 첨가된 선발배지에서 형질전환 callus를 선발하였다.

(다) 형질전환 callus에서 벼의 재분화

선발된 형질전환 callus는 vitamin B5 (3.957g/l), sucrose (30 g/l), proline (0.5 g/l), glutamine (0.5 g/l) casein enzymatic hydrolysate (0.3 g/l), NAA (0.5 mg/l), BAP (3 mg/l),

hygromycin B (50 mg/l) 그리고 N6 salts를 포함하는 Cambia medium에 옮겨서 재분화 하였음. 두 달 후에 식물체가 재분화하기 시작하였고 재분화된 식물체는 green house에 옮겨 재배를 하였다.

형질전환된 callus로부터 재분화된 식물체는 온실로 옮겨 재배하여 종자를 수확하였다. pMYV110 (LTB-COE, Ubiquitin promoter)는 5 개체 식물체, pMYV109 (LTB-COE, RAmy1A promoter)는 3 개체 식물체, pMYV116 (LTB-COE, RAmy 3D promoter), pMYV743 (LTB-COE, Ubiquitin promoter), pMYV111(CTB-COE, Ubiquitin promoter)에서 종자를 수확하고 있음. 계속하여 재분화를 진행하고 있고 재분화된 식물체는 확보되는 대로 온실에 옮겨서 재배를 하였다.

### (3) 형질전환 식물체의 분자생물학적 분석

#### (가) 형질전환체에서 genomic DNA PCR 분석

선발된 형질전환 callus로부터 DNeasy Plant Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. pMYV743 (sLTB-sCOE)은 forward primer (sCOE-F: 5'-GGA TCC GTTACT TTG CCA TCC TT-3')와 reverse primer (sPEDV6R: 5'-GGG GGT ACC TTA AAC ATC TGT GAT TTC-3')을 사용하였고 pMYV733 (sCOE-Co1)은 forward primer sCOE-F와 reverse primer (Co1-KpnI-R: 5'-GGT ACC TGG AAG TGG AGA TCT AGC-3')를 이용하여 PCR를 수행하여 항원유전자의 도입을 확인하였다. sLTB-sCOE의 경우에는 14 개의 putative transgenic callus에서 모두 430 bp (그림 30) DNA 절편을 얻었고 sCOE-Co1 항원유전자의 경우 14개의 putative transgenic callus에서 모두 470 bp (그림 31) DNA 절편을 확인하여 항원유전자의 도입을 확인하였음.

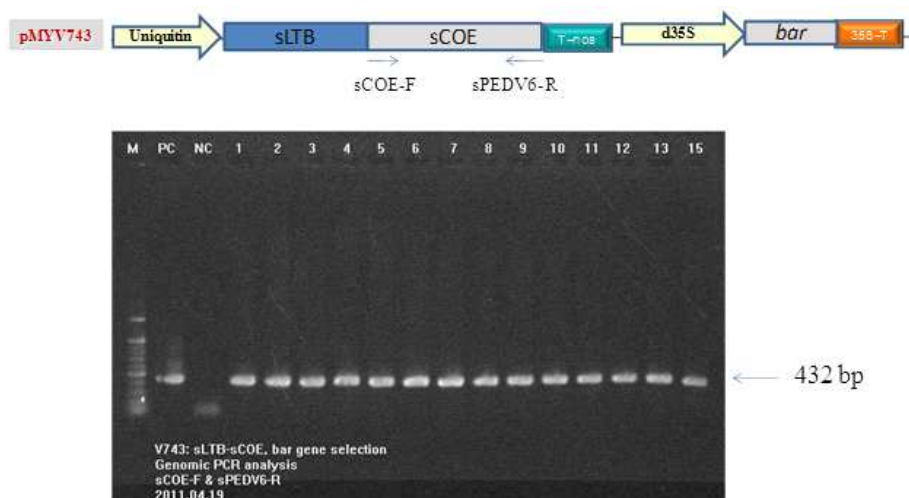


그림 30. pMYV743 형질전환체에서 genomic DNA PCR 분석

#### (나) 형질전환체에서 Northern blot 분석

항원유전자의 도입이 확인된 형질전환체에서 transcripts의 발현을 확인하기 위하여 pMYV743 (sLTB-sCOE)는 항시성 promoter인 Ubiquitin promoter에 의해 조절이 되고 있어 induction 없이 RNA를 분리하여 분석을 하였고 pMYV733 (sCOE-Co1)의 경우에는 항원유전자가 Rice amylase 3D promoter의

조절 하에 있어 sugar starvation 조건 하에서 발현을 유도한 후에 RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 수행하였다.

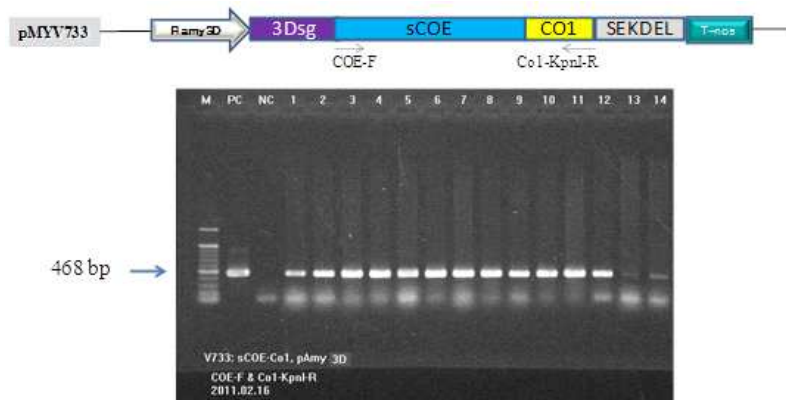


그림 31. pMYV733 형질전환체에서 genomic DNA PCR 분석

sLTB-sCOE 융합항원유전자 형질전환 callus에서는 15 개의 형질전환 callus에서 다양한 발현 양상의 mRNA의 발현이 관찰하였고 #2, #7, #9, #10, #12과 #13에서 강한 signal을 확인하여 mRNA의 고 발현을 확인하였다 (그림 32).

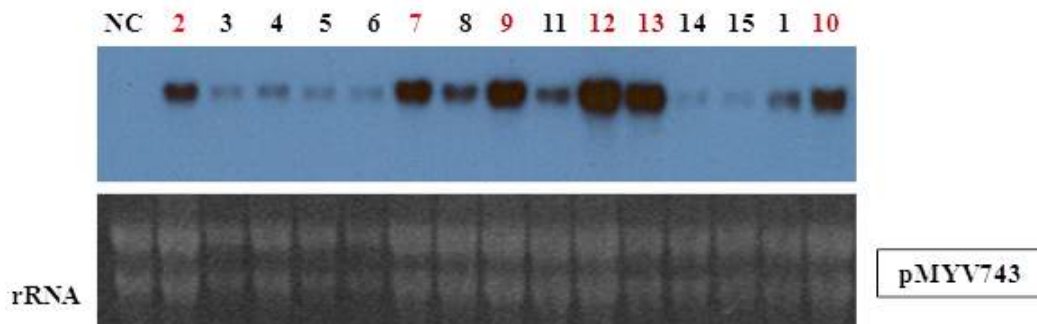


그림 32. pMYV743 형질전환 callus에서 Northern blot 분석

sCOE-Co1 융합항원유전자 형질전환 callus에서는 12 개의 형질전환 callus를 분석하여 3 개의 형질전환 callus와 negative control에서는 band가 관찰되지 않았고 #11과 #13에서 강한 band를 보여 고 발현을 보임을 확인하였다 (그림 33).

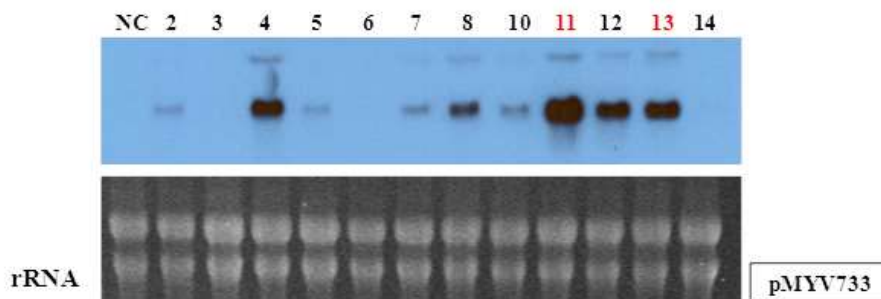


그림 33. pMYV733 형질전환 callus에서 Northern blot 분석



(다) 형질전환체에서 항원단백질의 발현 확인

형질전환 callus에서 transcripts의 발현을 확인하고 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 pMYV733 (sCOE-Co1) 형질전환 callus는 Northern blot 분석에서 고발현을 보인 #11과 #13을 가지고 sugar starvation으로 항원단백질의 발현을 유도하였고 시간별로 단백질을 분리하여 western blot 분석을 한 결과 #11에서 #13과 비교하여 고발현을 보였고 시간별로는 유도한지 2일 부터 비슷한 수준의 단백질 발현량을 보이기 시작하였다 (그림 34A와 B).

Western blot 분석에서 확인된 크기는 positive control로 사용한 bacterial COE에 비해서 Co1 부분을 감안하여도 예상 크기보다 큰 단백질 band가 관찰되었음. 이러한 크기의 증가는 단백질에 존재하는 glycosylation site에 의한 glycosylation에 의한 것으로 보고 deglycosylation enzyme인 PNGase F, Endo F1과 Endo H를 처리한 결과 처리하지 않은 것에 비해서 크기가 감소하는 것으로 보아 크기의 증가는 glycosylation에 의한 것으로 확인하였다 (그림 34D).

sCOE-Co1 융합항원유전자는 signal peptide를 함유하고 있어 rice cell suspension culture를 확립하여 항원단백질의 발현이 배지내로 분비되는지 알아보기 위하여 시간별로 항원단백질의 발현을 확인한 결과 11일과 13일에서 낮은 수준의 축적을 보임을 확인하였음. 항원단백질의 고발현이 확인된 callus로부터 동물실험을 위한 시료를 확보하기로 하였다 (그림 34C).

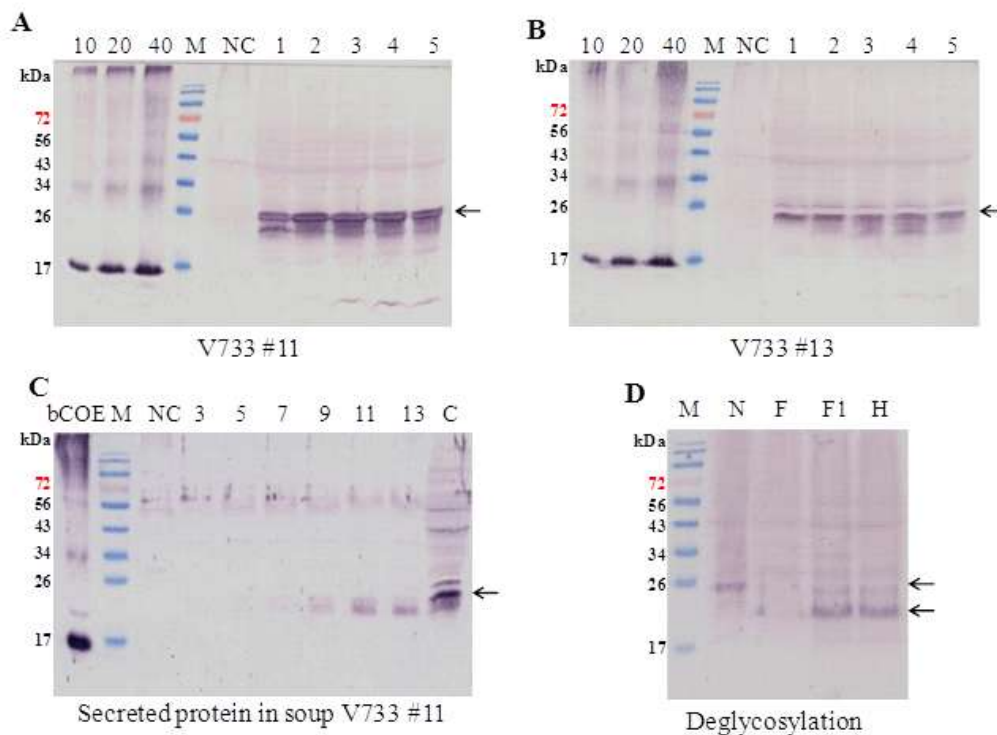


그림 34. pMYV733 형질전환 callus의 항원단백질 발현 분석

Western blot 결과를 scan 하여 bacterial COE 단백질에 의해 만들어진 standard curve에 의해서 계산된 pMYV733 형질전환 callus에서 발현된 COE-Co1 항원단백질의 발현량은 total soluble protein 의 0.08 %의 수준을 보였다 (그림 35).



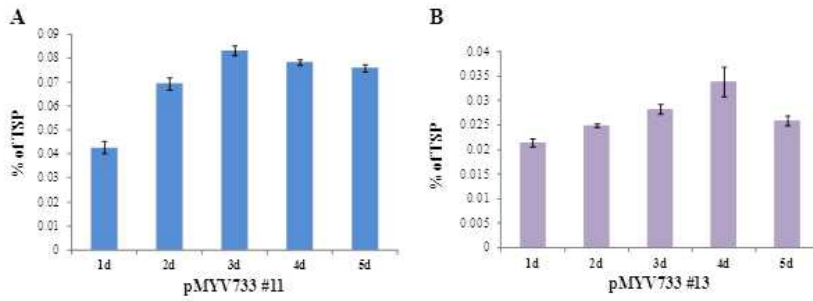


그림 35. pMYV733 형질전환 callus에서 발현된 항원단백질의 정량

형질전환 callus에서 transcripts의 발현을 확인하고 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 pMYV743 (sLTB-sCOE) 형질전환 callus는 Northern blot 분석에서 고발현을 보인 transgenic lines를 가지고 항시성 promoter인 ubiquitin 프로모터는 발현 유도 없이 단백질을 분리하여 anti-LTB 항체와 anti-COE 항체를 가지고 western blot 분석을 한 결과 두 종류의 항체에 특이적으로 결합하는 bands를 확인하였다. 같은 위치에서 두 종류의 항체에 의한 결과를 확인하여 LTB-COE 항원단백질이 하나의 단백질로 발현되었음을 확인하였다 (그림 36).

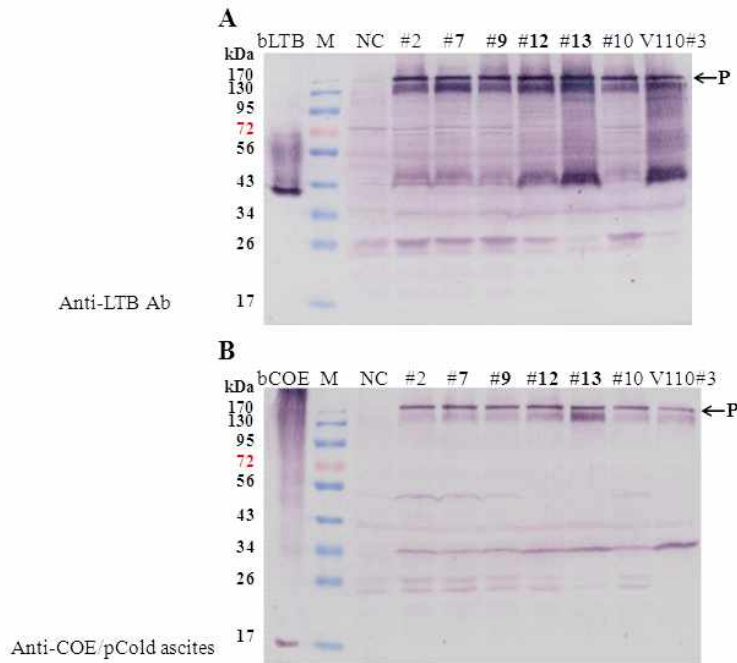


그림 36. pMYV743 형질전환 callus에서 항원단백질의 분석

발현이 확인된 pMYV743 형질전환 callus에서 발현된 LTB-COE 항원단백질의 수용체인  $G_{M1}$ -ganglioside에 대한 결합능력을 확인하기 위하여  $G_{M1}$ -ELISA를 수행하였다. 그림 37A에서와 같이 형질전환 callus에서 발현된 LTB-COE 항원단백질이 negative control에 비해  $G_{M1}$ -ganglioside에 대해서 강력한 결합 능력을 보이고 이를 토대로 하여 발현된 항원단백질의 발현량을 분석한 결과 total soluble protein의 0.08% 정도의 수준을 확인하였다 (그림 37)

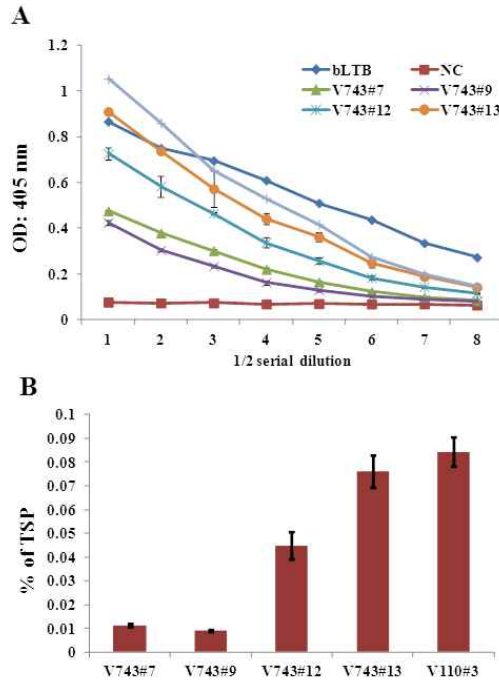


그림 37. pMYV743 형질전환 callus 발현 LTB-COE에 대한 GM1-ELISA 분석

다. 형질전환체에서 도입된 항원유전자의 copy 수 결정

형질전환 식물체에서 도입된 항원유전자의 copy 수를 결정하기 위하여 quantitative real-time PCR 방법을 이용하였다. 벼의 genome에 one copy로 존재하는 endogenous 유전자로서는 sucrose phosphate synthase (SPS) 유전자를 control로 사용하였다.

qRT-PCR에 사용할 primers를 아래와 같이 합성하였다.

Target gene	Primer and probe	Sequence
sCOE	sCOE-F	5'-CAG CAA GTT CTG CGT TTC CA-3'
	sCOE-R	5'-CGA AGA GAT CGA TGG TGC AA-3'
	sCOE-P	6FAM-5'-AGC CTC TTG GCT GGA G-3'
SPS	SPS-F	5'-TTG CGC CTG AAC GGA TAT CT-3'
	SPS-R	5'-CGG TTG ATC TTT TCG GGA TG-3'
	SPS-P	VIC-5'-ACG CAC GGA CGG CT-3'

sCOE와 SPS 유전자를 포함하고 있는 plasmid를 제작하고 standard curve를 만들기 위하여 serial dilution을 하였음. 최종 농도를  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ , 그리고  $10^3$  copies/ul로 조절하여 sCOE와 SPS copy number에 대한 standard curve를 계산하기 위하여 사용되었다. TaqMan RT-PCR는 3 반복으로 시행되었고 20 ul volume으로 2 x TaqMan Genotyping Master Mix (A&B applied Biosystems, CA), primers는 각각 900 nM, probe는 각각 250 nM, 1 ul의 genomic DNA (20 ng) 또는 serial diluted plasmid concentration 이루어졌다. RT-PCR는 7500 Real Time PCR system (A&B applied Biosystem)에서 automatically recommended program에 의해서 이루어졌다.

Transgene sCOE와 endogenous SPS 유전자의 copy 수는 Fast Real-Time PCR products에 대해서 7500 software에 의해서 계산되어지고 Standard curves는 sCOE와 SPS 유전자를 포함하고 있는 미리

알려진 copy 수에 기초하여 계산하였다. Transgene의 량은 endogenes 유전자의 량에 의해서 나누어져서 결정하였다.

sLTB-sCOE 항원유전자로 형질전환체에서 도입된 항원유전자의 수를 확인한 결과 particle bombardment 형질전환에 의한 것이 Agrobacterium에 비해서 약간 copy 수가 많은 것으로 확인되었고 또한 항원유전자의 발현이 높은 것이 도입된 유전자 수가 많은 것으로 관찰되었다 (표 1).

표 1: T0 형질전환체에서 quantitative RT-PCR을 이용한 항원유전자의 copy number

<b>pUbiquitin, sLTB-sCOE-Bombardment</b>	
<b>pMYV 110</b>	<b>Copy number</b>
#3*	3
#6	2
#7	1
#b16	3
<b>pRAmy1A, sLTB-sCOE-Bombardment</b>	
<b>pMYV 109</b>	<b>Copy number</b>
#9	5
#10*	8
<b>pRAmy3D, sLTB-sCOE-Bombardment</b>	
<b>pMYV 116</b>	<b>Copy number</b>
#5*	1
#6	2

<b>pUbiquitin, sLTB-sCOE-Agrobacterium</b>	
<b>pMYV 110</b>	<b>Copy number</b>
#1	2
#2	3
#7	1
#8	1
#9	1
#10	4
#12	2
#13*	4

<b>pUbiquitin, sCTB-sCOE-Bombardment</b>	
<b>pMYV111</b>	<b>Copy number</b>
#5	3
#9	3
#10*	4
<b>pRAmy1A, sCTB-sCOE-Bombardment</b>	
<b>pMYV114</b>	<b>Copy number</b>
#1*	4
#3	1
<b>pRAmy3D, sCTB-sCOE-Bombardment</b>	
<b>pMYV118</b>	<b>Copy number</b>
#21*	4
#29	2

<b>pAmy3D, sCOE-Co1, Bombardment</b>	
<b>pMYV733</b>	<b>Copy number</b>
#4	3
#8	3
#11*	4
#12	3
#13	3

라. 약배양에 의한 sLTB-sCOE 형질전환체통의 식물체 분화와 양성

벼 약배양 방법은 벼의 수술인 약(藥)내에 있는 반수성 세포인 소포자를 배양하여 캘러스를 유기하고, 캘러스부터 식물체를 분화시켜 토양에 이전한 후 이들 분화식물체 집단에서 발견되는 반수체를 콜히친(Colchicine)처리에 의해 염색체수를 배가하거나, 배양과정에서 자연적으로 배가된 식물, 즉 동형접합성의 2배체(Homozygote)를 획득하므로써 유전적으로 고정된 식물체를 가장 단시간에 얻을 수 있는 방법이다.

본 시험서는 신동진벼 LTB-COE 형질전환 개체에서 약배양을 통해 유전적으로 고정된 식물체를 확보함으로써 품종육성에 이르는 시간과 노력을 단축하기 위해 실시하였다.

약배양을 위한 재배한 형질전환 식물체 잎으로 추출한 DNA를 가지고 항원유전자의

존재 여부를 genomic DNA PCR 방법으로 확인한 결과 4 개체를 제외하고는 모든 개체에서 항원유전자를 가지고 있음을 확인하였다 (그림 38).

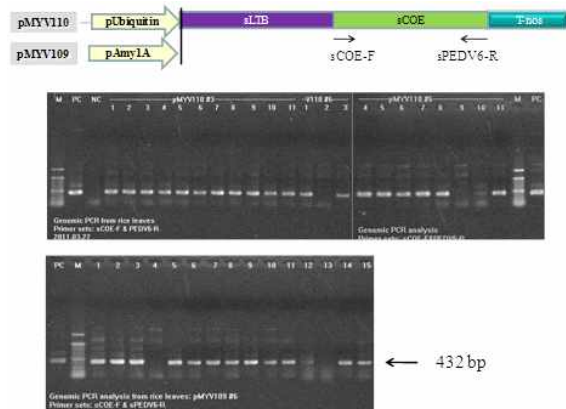


그림 38. T1 형질전환 식물체에서 항원유전자에 대한 genomic DNA PCR 분석

본 시험에서는 신동진벼 LTB-COE 형질전환 개체인 V109 #6, V110 #3, V110 #6를 자식시켜 육성된 T1세대 총 36개체로서 각 개체별로 약배양을 실시하였다. 약배양은 농진청 국립식량과학원에서 근무하는 강 경호 박사에게 의뢰하여 실시하였다. 약배양 방법은 농진청 국립식량과학원에 확립된 약배양방법을 사용하였으며, 사용된 배지는 약으로부터 캘러스 유기를 위해 N6 + 0.2 mg/l 2, 4-D + 1 mg/l NAA 배지를 사용하였으며, 캘러스에서 식물체 분화는 MS+ 1 mg/l NAA + 4 mg/l Kinetin + 80 g/l Sucrose + 3% agar배지를 사용하였다 (표 2).

표 2. 벼 약배양 배지

구분	사용배지	저온전처리	배양조건
캘러스유기	N6 + 0.2mg/l 2,4-D + 1mg/l NAA	12°C, 8일	-
식물체분화	MS+ 1mg/l NAA + 4mg/l Kinetin + 80g/l Sucrose + 3% Agar	-	25 ~ 30°C, 2,500Lux, 16시간조명

약배양 방법은 식물체를 포트에 성장시킨 후 출수 전 지엽과 제1엽의 엽이간장이 4-8 cm에 도달했을 때 이삭을 채취하여 12°C에서 8일간 저온전처리하였으며, 전처리후 육안으로 1핵기 시기의 약을 채취하여 캘러스배지에 치상하였고, 치상후 1~1.5 개월 경에 유기된 캘러스를 식물체 분화배지로 이전시켜 식물체를 유도하였다. 분화된 식물체는 수경재배를 통해 뿌리가 왕성하게 자랄 때 까지 양성시킨 후 토양에 이전하였다.

### (1) 약배양 식물체 분화 결과

신동진벼 LTB-COE 형질전환 개체에 유래된 T1세대 총 36개체에 대해 약배양을 실시한 결과 (표 3), 현재까지 총 491개의 녹색체와 1,287개의 백색체를 얻었으며 녹색식물체의 일부는 토양에 이식하여 성장 중에 있음. 한편 식물체를 생성하지 못하는 캘러스는 계속 식물체 분화배지에 계속 계대배양하면서 식물체를 유도 하였다.

표 3. 2011년 약배양 결과 총괄

T0 형질전환 개체 번호	개체수 (개)	치상약수 (개)	식물체분화*	
			녹색체 (개)	백색체 (개)
V109#6	15	2,200	198	444
V110#3	11	2,000	82	326
V110#6	11	2,100	211	517
계	36	6,300	491	1,287

\* 현재 식물체분화 진행 중이며 분화된 식물체의 일부는 토양에 이식되었음.

표 4. 2011년 약배양을 통한 식물체분화 내역

Entry	계통명(품종-유전자-벡터)	치상 약수	식물체분화	
			녹색체수	백색체수
V109#6-1	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-1	100	119	25
V109#6-2	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-2	100	2	15
V109#6-3	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-3	100	0	49
V109#6-4	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-4	100	4	20
V109#6-5	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-5	100	10	6
V109#6-6	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-6	400	7	2
V109#6-7	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-7	400	21	94
V109#6-8	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-8	100	2	16
V109#6-9	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-9	100	na	na
V109#6-10	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-10	100	na	na
V109#6-11	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-11	100	8	49
V109#6-12	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-12	200	19	73
V109#6-13	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-13	100	6	28
V109#6-14	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-14	100	0	67
V109#6-15	신동진TR(LTB-COE,pMYV109#6)-15	100	0	0
V110#3-1	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-1	400	0	0
V110#3-2	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-2	200	17	19
V110#3-3	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-3	200	3	3
V110#3-4	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-4	200	1	26
V110#3-5	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-5	200	7	7
V110#3-6	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-6	200	0	0
V110#3-7	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-7	100	3	20
V110#3-8	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-8	100	0	1
V110#3-9	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-9	100	30	180
V110#3-10	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-10	100	7	25
V110#3-11	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#3)-11	200	14	45
V110#6-1	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-1	200	21	14
V110#6-2	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-2	100	1	20
V110#6-3	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-3	100	na	na
V110#6-4	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-4	400	72	69
V110#6-5	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-5	200	8	68
V110#6-6	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-6	100	1	15

V110#6-7	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-7	100	na	na
V110#6-8	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-8	200	21	100
V110#6-9	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-9	300	48	115
V110#6-10	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-10	100	3	33
V110#6-11	신동진TR(LTB-COE,pMYV110#6)-11	300	36	83
계		5900	491	1287

(2) 신동진벼 LTB-COE 형질전환개체의 약배양 양성

신동진벼 LTB-COE 형질전환 개체의 약배양 결과 대단히 비정상적인 캘러스 및 식물체 형성 양상을 나타냈다 (그림 39, 40).



그림 39. 신동진벼 LTB-COE 형질전환 개체의 약배양 캘러스 생육 양상

캘러스 생육면에서 볼 때 정상적인 경우 약치상 후 1~1.5개월 후 1~2 mm 정도의 캘러스가 생성된 이후 소위 “부서지기 쉬운 friable callus“로 분화되면서 캘러스 표면에 식물체 분화의 징조가 되는 녹점이 형성되기 시작하는 반면, 형질전환체 약배양의 캘러스의 경우 캘러스 형성도 2개월 정도로 늦고 캘러스의 성장도 그림 38에 나타난 바와 같이 부서지지 않고 ”clump“를 형성하는 캘러스로 발전하였다. 이러한 clump callus에서는 녹점은 많이 형성되나, 캘러스 표면에 많은 가느다란 뿌리만 분화되었으며 정상적인 녹색 식물체로는 분화되지 않는 특성을 나타내었다. 이러한 특성은 캘러스에서 auxin함량이 많거나 식물체 분화력이 떨어지는 캘러스에서 나타나는 현상으로서 형질전환 유전자인 LTB-COE가 세포내에서 특이적으로 발현하여 나타난 결과로 추측되어졌다.

또한 식물체 분화면에서 볼 때 표 3와 그림 39에 나타난 바와 같이 백색체가 녹색체에 비해 2.2~4배 많이 분화되었음을 알 수 있다. 일반적으로 조직배양에서 백색체 출현은 조직배양과정에서 엽록소 형성을 파괴하거나 억제하는 배양 조건, 즉 캘러스 및 식물체 유도 배지 내에 2,4-D 함량이 많거나, 배양실 온도가 높은 경우 출현이 높아지는 것으로 알려져 있으나 본 시험에서와 같이 극단적인 높은 백색체 출현율은 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 시험에서 비정상적으로 높은 백색체 분화율은 형질전환에 사용된 LTB-COE의 유전자와 관련 있을 것으로 추정되어졌다. 한편 백색체 뿐만 아니라 많은 경우 엽록소 결핍 개체, 다발성 식물체분화 등 대단히 비정상적인 식물체 분화가 많이 관찰(그림 39)되었는데 이 역시 본 시험에 사용된 형질전환유전자와 관련 있을 것으로 추정 되었다.



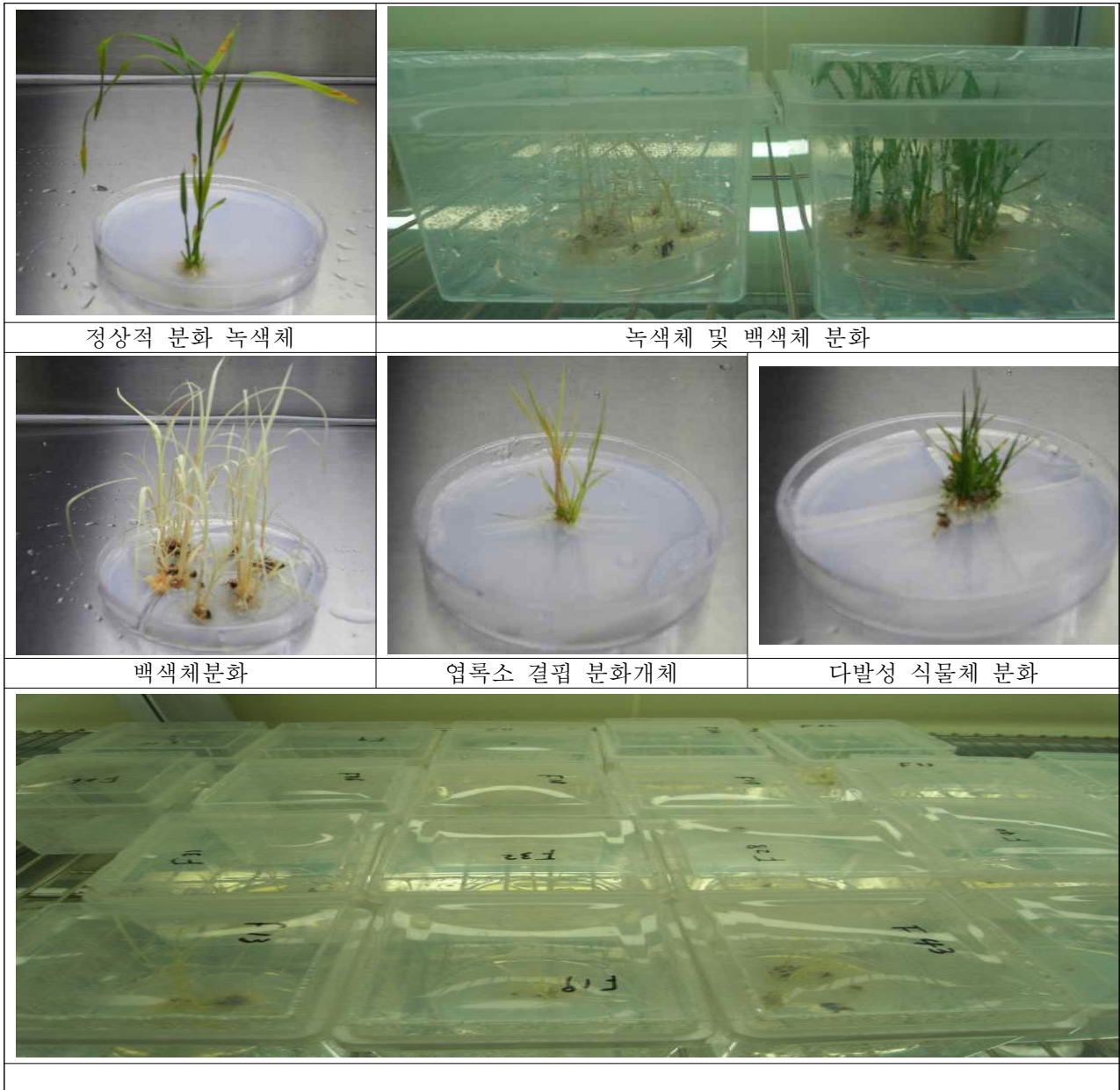


그림 40. 신동진벼 LTB-COE 형질전환 개체의 식물체 분화 양상

(3) 식물체 분화

계속해서 캘러스를 증식을 통해 식물체를 분화시켰고, 분화된 식물체는 수경재배를 통해 토양에 이식하였다. 토양에 이식된 식물체에 대해 반수체와 자연배가 이배체를 구분하고 이배체에 대해 종자를 수확하였다.

(4) 약배양으로부터 얻은 형질전환 벼

도입된 항원유전자에 대한 homozygous lines을 만들기 위하여 LTB-COE 항원유전자로 형질전환된 형질전환 벼(pMYV110 #3와 pMYV109 #6)를 농진청 국립식량과학원 강경호 박사에게 의뢰하여 homozygous line의 씨앗을 확보하였다 (그림 41).



그림 41. 약배양을 이용한 homozygous line 재배 (T1-식물)

표 5과 6는 약배양을 이용하여 얻은 homozygous 형질전환 식물체 pMYV110 (LTB-COE, Ubiquitin promoter)와 pMYV109 (CTB-COE, Amylase 1A promoter) 수확한 종자의 목록과 수량이다.

표 5. LTB-COE 형질전환 식물체의 약배양 식물체 목록 및 수확한 종자 1

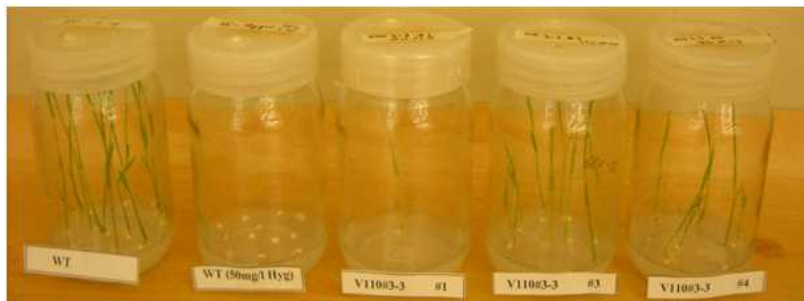
Vectors	Lines	Total seeds	Vectors	Lines	Total seeds	Vectors	Lines	Total seeds
V110#3-3	1	1	V110#3-9	1	4	V110#6-4	1	30
	2	0		2	5		2	15
	3	28		3	8		3	42
	4	21		4	10		4	0
V110#3-4	1	14	V110#3-11	5	15		5	30
	2	24		1	11		6	26
	3	8		2	5		7	20
	4	80		3	13		8	20
	5	12		4	18		9	45
	6	12		5	5		10	68
	7	4		6	7		11	23
V110#3-5	1	27	V110#6-1	1	90		V110#6-8	12
	2	100		2	60	1		110
	3	75		3	40	2		90
	4	30		4	24	3		115
	5	105		5	80	4		120
	6	110		6	20	5		65
	7	50		7	20	6		48
	8	54		8	23	7		58
	9	110		9	19	8		110
	10	38		10	50	9	63	



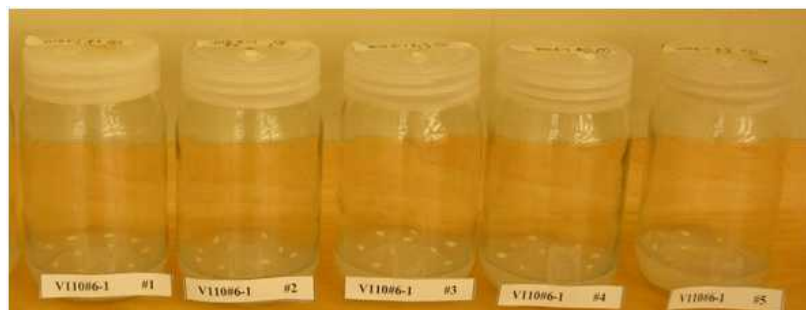
표 6. LTB-COE 형질전환 식물체의 약배양 식물체 목록 및 수확한 종자 2

Vectors	Lines	Total seeds	Vectors	Lines	Total seeds
V109#6-1	1	1		4	14
	2	0		5	40
	5	28		6	32
	8	21		7	38
	15	14		8	30
	21	24		9	30
	37	8		10	20
	40	80		11	55
	42	12		12	85
	43	12		13	40
V109#6-7	1	47		14	45
	2	16		15	70
	3	42			

약배양을 이용하여 수확한 종자를 발아시키기 위하여 Hygromycin (50 mg/l)를 포함하고 있는 MS 배지에 표피를 제거하고 표면 소독한 후에서 발아를 시켰다. 그림 42는 배양병에서 항생제에 저항성을 보이는 pMYV110 #3-3, #6-7는 발아가 잘 되었고 pMYV110 #6-1는 항생제가 포함된 배지에서 발아가 되지 않았다.



V110#3-3: Well-germinated



V110#6-1: not-germinated



V110#6-7: Well-germinated

그림 42. 약배양에서 수확한 형질전환 종자의 선발배지에서 발아

발아된 종자는 2 주 후에 온실에 옮겨 재배하였고 약배양해서 얻은 형질전환 식물체는 형질전환하지 않은 식물체와 비슷한 성장을 보였음 (그림 43)



그림 43. 선발배지에서 발아된 약배양 식물체의 재배

(5) 형질전환 식물체와 약배양을 이용해서 얻은 형질전환체에서 quantitative real-time PCR (RT-PCR)을 이용한 항원유전자의 copy number 결정

Agrobacterium-mediated 방법으로 형질전환해서 얻은 형질전환 식물체와 약배양을 이용하여 얻은 형질전환 식물체에서 도입된 항원유전자의 copy number를 확인하기 위하여 quantitative real-time PCR (RT-PCR)를 수행하였다. 형질전환 식물체 잎의 시료를 채취하여 액체질소를 첨가하면서 mortar와 pestle를 이용하여 고르게 갈았다. 고르게 간 후 genomic DNA는 ZR genomic DNA kit (Zymo research, USA)를 이용하여 추출하였다. Genomic DNA의 농도는 spectrophotometry를 이용하여 정량하였다.

RT-PCR를 수행하기 위한 primers와 probes는 Genotech (Daejeon, South Korea)에 주문하여 합성하였고 표 7과 같이 합성하였다.

표 7. RT-PCR에 이용된 primers 및 probes 목록

Target gene	Primer and probe	Sequence
sCOE	sCOE-F	5'CAG CAA GTT CTG CGT TTC CA-3'
	sCOE-R	5'-CGA AGA GAT CGA TGG TGC AA-3'
	sCOE-P	6FAM-5'-AGC CTC TTG GCT GGA G-3'
SPS	SPS-F	5'-TTG CGC CTG AAC GGA TAT CT-3'
	SPS-R	5'-CGG TTG ATC TTT TCG GGA TG-3'
	SPS-P	VIC-5'-ACG CAC GGA CGG CT-3'

Primers와 probes는 target 항원유전자에 특이적인 amplification을 위한 것과 정량하는데 비교군으로 사용할 수 있는, 벼의 genome에서 한 copy로 존재하는 endogenous 유전자 [sucrose phosphate synthase (SPS)]에 특이적인 amplification을 위한 것으로 디자인하였다. sCOE와 SPS 유전자를 포함하고 있는 plasmid를 standard curve를 만들기 위하여 순차적으로 희석하였다. 최종적인 농도는  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  copies/ul가 sCOE와 SPS 유전자 copy number를 결정하는데 이용하였다. Taqman RT-PCR는 세 번 반복으로 수행하였고 반응은 2x Taqman Genotyping Master Mix (A&B applied Biosystems, USA), 각각 900 nM의 primers, 250 nM probe를 포함하고 마지막으로 물을 이용하여 20 ul를 만든 후에 1 ul의 genomic DNA (20 ng) 또는 순차적으로 희석한 plasmid를 첨가하였다.

RT-PCR은 7500 Real Time PCR system (A&B Applied Biosystems)를 이용하여 RT-PCR를 위한 manufactures automatic recommended program에 따라서 수행하였다. 형질 전환 벼의 genome에서 transgene sCOE와 endogenous SPS의 copy number는 7500 and 7500 Fast Real-Time products를 위한 7500 software (A&B Applied Biosystems)를 이용하여 계산하였다.

Standard curves는 transgene sCOE의 이미 알고 있는 plasmid number와 endogenous SPS 유전자의 number에 위해서 계산하였다. Transgene의 량은 endogenous 유전자의 량으로 나누어서 transgene copy number를 결정하였다.

형질전환 식물체와 약배양에서 얻은 식물체에서의 항원유전자의 copy number는 표 8 와 9에 보여주고 있다.

형질전환 식물체에서 분석한 결과 pMYV110#7 (LTB-COE, Ubiquitin promoter) 과 pMYV743#7 (LTB-COE, Ubiquitin promoter, Agrobacterium-mediated transformation)에서 copy number가 1에 가까운 것으로 확인하였고 pMYV743#10에서 1.57인 것으로 copy number 가 2에 가까운 것으로 판단하였다.

표 8. Copy number in transgenic rice leaves and rice calli using quantitative RT-PCR

Constructs	Copy number	STDV
V743#7	1.23	0.00
V743#10	1.57	0.12
V110#7	0.89	0.184

Copy number in transgenic rice leaves T0 generation

Constructs	Copy number	STDV
V743#1	1.57	0.002
V743#2	2.85	0.092
V743#8	0.94	0.009
V743#9	1.18	0.086
V743#12	1.84	0.023
V743#13	3.9	0.249
V109#9	4.68	0.149
V109#10	7.74	0.103

Copy number in transgenic rice calli

표 9. Copy number in transgenic rice leaves from anthur culture using quantitative RT-PCR

Constructs	Copy number	STDV
V110 #3-3-1	2.18	0.07
V110#3-3-3	1.62	0.09
V110 #3-3-4	1.56	0.08
V110 #3-11-1	1.616	0.072
V110#3-11-2	1.697	0.097
V110#3-11-4	1.739	0.031
V110#3-11-5	1.642	0.006
V110#3-11-6	2.364	0.291
V110#3-11-7	1.623	0.072

Constructs	Copy number	STDV
V110#6-4-1	1.560	0.013
V110#6-4-3	1.533	0.049
V110#6-4-4	1.626	0.012
V110#6-4-5	1.740	0.020
V110#6-4-6	1.679	0.137
V110#6-4-7	1.867	0.071
V110#6-4-8	2.032	0.043
V110#6-4-10	1.484	0.307
V110#6-4-11	1.573	0.066
V110#6-4-12	1.555	0.092

Constructs	Copy number	STDV
V109#6-7-1	1.74	0.06
V109#6-7-2	2.00	0.09
V109 #6-7-3	1.94	0.13
V109#6-7-4	1.98	0.12
V109#6-7-5	2.04	0.15
V109#6-7-6	1.72	0.15
V109#6-7-7	1.74	0.06
V109#6-7-8	1.87	0.14
V109#6-7-9	1.79	0.08
V109#6-7-10	2.38	0.44
V109#6-7-11	1.90	0.05
V109#6-7-12	1.75	0.10
V109#6-7-13	1.95	0.18
V109#6-7-14	1.80	0.05
V109#6-7-15	1.86	0.03

V110 (pUbi, sLTB-sCOE), bombardment  
V109 (pRamy1A, sLTB-sCOE), bombardment

형질전환 캘러스에서 분석결과 pMYV743 #8과 #9에서 copy number가 1에 가까운 것으로 보아 copy number를 1로 판단하였고 나머지 캘러스에는 두 개 이상의 transgene이 존재하는 것으로 보였다.

약배양을 이용하여 얻은 homozygous 형질전환체에서 분석 결과는 copy number 2개인 것으로 확인하였다.

(6) 형질전환 식물체와 약배양을 이용해서 얻은 형질전환체에서 항원유전자의 copy number 결정을 위한 Southern blot analysis

Agrobacterium-mediated 방법으로 형질전환해서 얻은 형질전환 식물체와 약배양을 이



용하여 얻은 형질전환체에서 도입된 항원유전자의 copy number를 확인하기 위하여 RT-PCR과 병행하여 Southern blot analysis를 수행하였다.

위의 방법에 의해서 순수분리한 genomic DNA (3 ug)을 EcoRI으로 37°C에서 밤새 처리한 후 0.8% TAE agarose gel에서 digested genomic DNA를 전기영동을 수행하여 크기별로 분리하였다. 0.2N HCl를 10분간 처리하여 depurination를 수행하고 0.4N NaOH로 30분간 처리한 후 Hybond N+ membrane에(Amersham-Pharmacia Biotech, UK) 20x SSC를 이용하여 transfer하여 blotter를 만들었다.

Blot는 sLTB-COE 유전자를 random-primed (Promega, USA) kit를 이용하여 <sup>32</sup>P로 labeled 시킨 후에 Hybridization Incubator (Finemould Precision Ind., South Korea)에서 65°C에서 밤새 hybridization을 수행하였다.

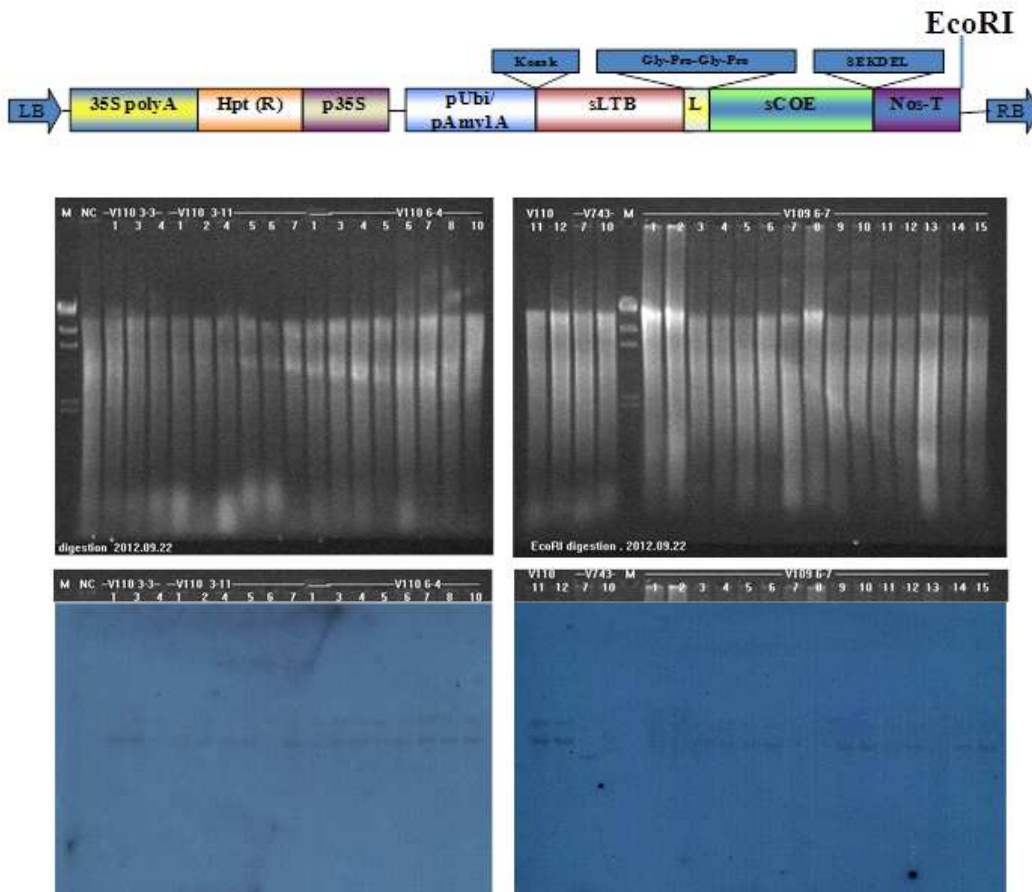


그림 44. 항원유전자 copy number 확인을 위한 Southern blot analysis.

Hybridization이 끝난 후에 2x SSC와 0.1% SDS로 두 번 washing하고 2x SSC와 1% SDS로 두 번 washing한 후에 membrane을 X-ray film (Kodak, USA)에 expose하여 X-ray film development kit를 이용하여 development와 fixation을 수행하였다.

약배양을 이용하여 얻은 homozygous 형질전환체(pMYV110#3-3, #3-11, #6-4, V109 #6-7)에서 얻은 결과는 2 개의 bands가 보이는 것으로 보아 copy number가 두 개인 것으로 보이고 이 결과는 RT-PCR과 일치하는 것으로 보였다.

Agrobacterium-mediated transformation 방법에 의해서 얻은 형질전환체(pMYV743

#10)에서 얻은 결과는 2 개의 bands가 보이는 반면 #7에서는 하나의 band를 보여 copy number가 하나인 것으로 보이고 이 결과는 RT-PCR과 일치하는 것으로 보였다 (그림 44).

(7) 형질전환체에서 항원유전자의 inserting 부위의 확인을 위한 flanking sequencing

항원유전자의 copy number가 하나로 결정된 pMYV110 #7과 pMYV743 #7로 형질전환된 식물체를 항원유전자의 도입 부위를 확인하기 위하여 GreenGene BioTech Inc에 Flanking sequence 분석을 의뢰하여 수행하였다 (그림 45).

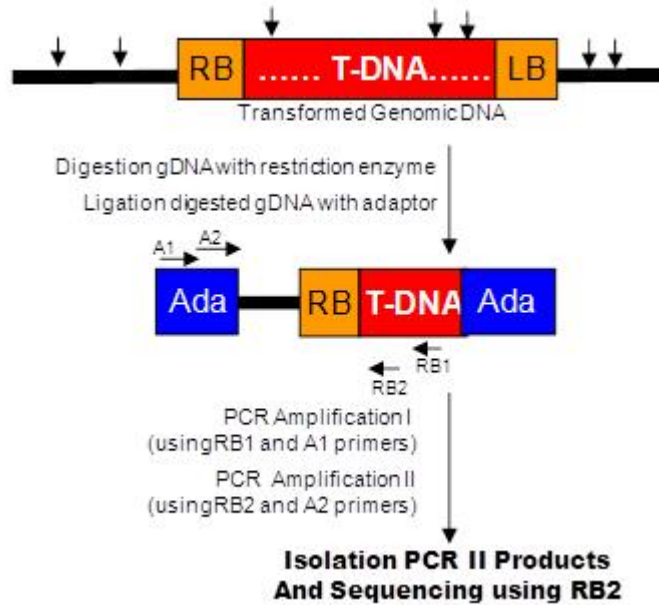


그림 45. Flanking T-DNA Sequencing method consists of three main steps: (i) Digestion of the genomic DNA, (ii) Ligation of an adaptor, (iii) PCR amplification between two primers specific for the T-DNA and the adaptor, respectively

Flanking T DNA sequencing 결과 pMYV110#7에서는 벼의 chromosome 상에서 위치를 찾지 못하였지만 pMYV743 #7에서 chromosome 08에서 insertion 되었음을 확인하였다.

표 10. Analysis of Flanking T-DNA sequences

Query Name	A/NA	Read length (bp)	T-DNA end	Insert from	Insert to	Adaptor start	Insert length (bp)	Chromosome
V110_7_H3_LB	Vector	548	161	162	548	-1	387	
V110_7_H2_RB	Vector	718	56	57	689	690	633	
V743_7_H3-LB	A	301	149	150	301	-1	152	chr08
V743_7_H3-RB	A	389	14	23	389	-1	367	chr08

(8) 형질전환 식물체에서 종자 수확

현재 수확하여 확보하고 있는 형질전환 벼 T1, T2 (표 11)과 약배양에서 확보한 homozygous 형질전환 식물체 (표 12)에서 수확한 벼 종자를 확보하였다.

표 11. Rice seeds from transgenic rice T1 and T2 generation

Plasmid name	Construct	Transformation method	T1 (seeds)	T2 (seeds)		Copy number
pMYV110	pUbi, sLTB-sCOE	Bombardment				
#3			7		Anther culture	3
#6			26		Anther culture	2
#7			186			1
#b15			1490			
#3-2				529		
#3-6				1529		
#6-1				1034		
#6-2				929		
#6-4				980		
pMYV743	pUbi, sLTB-sCOE	Agrobacterium				
#7			163	Green house		1
#10			353	Green house		2
pMYV109	p1A, sLTB-sCOE					
#3			100			
#6			110		Anther culture	
#9			6	150 g	High expression	5
pMYV116	p3D, sLTB-sCOE	Bombardment				
#11			4			
pMYV111	pUbi, sCTB-sCOE	Bombardment				
#b2			11			
pMYV114	p1A, sCTB-sCOE	Bombardment				
#1			292			4
#4			5			
pMYV733	p3D, sCOE-Co1	Bombardment				
#11			130			4
#13			270			3
pMYV725	p3D, S1D	Bombardment				
#4			38			
#16			112			

☒ 12. Rice seeds from anther culture of transgenic rice

(T1 germination - anther culture to get homozygous seed- T3 seeds)

Plasmid name	Construct	Transformation method	T3 (seeds)	Copy number
pMYV110	pUbi, sLTB-sCOE	Bombardment		
#3-3				
1			32	2
3			96	2
4			339	2
#3-11				
1			66	2
2			99	2
4			67	2
5			142	2
6			117	2
7			300	2
#6-4				
1			688	2
3			871	2
4			240	2
5			363	2
6			663	2
7			168	2
8			394	2
9			252	2
10			448	2
11			175	2
12			250	2
pMYV109	p1A, sLTB-sCOE	Bombardment		
#6-7				
1			409	2
2			510	2
3			359	2
4			426	2
5			792	2
6			540	2
7			464	2
8			412	2
9			597	2
10			296	2
11			565	2
12			212	2
13			430	2
14			356	2
15			503	2



(9) 수확한 mature 종자에서 LTB-COE 항원단백질의 발현

(가) 항원단백질 분석

수확한 형질전환 벼의 종자에서 항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 western blot 분석을 수행하였다. 벼 amylase 1A promoter의 조절 하에 있는 LTB-COE로 형질전환 된 벼의 종자에서 항원단백질의 발현을 유도하기 위하여 수확한 벼의 표피를 제거하고 젖은 3MM paper 위에 2와 4일간 발아를 유도하였다.

발현을 유도한 pMYV109 #9와 pMYV743 #7, #10의 종자로부터 total soluble proteins 을 extraction buffer (1:2 w/v) (200 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, 400 mM sucrose, 10 mM EDTA, 14 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0.05% Tween-20)를 가지고 추출하였고 단백질의 농도는 Bradford protein assay 방법(Bio-Rad, Inc, USA)으로 정량을 하였다.

추출한 단백질을 non-induced 조건에서 10% SDS-PAGE 전기영동을 이용하여 단백질을 분리하였고 Hybond C membrane (Promega)에 transfer하였다. Rabbit anti-LTB antiserum 를 1차 항체로 이용하여 형질전환 종자에서 발현된 LTB-COE 항원융합단백질을 확인하였다.

Western blot 결과 rice amylase 1A promoter에 의해서 발현된 LTB-COE 항원융합단백질은 pentameric 형태와 assembly된 여러 가지 형태로 detection 되었고(그림 46A) 또한 약 배양에서 얻은 벼와 형질전환해서 얻은 T1 세대에서도 LTB-COE 항원단백질의 발현을 확인 하였다 (그림 46B).

(나) 식물에서 발현된 항원단백질에 대한  $G_{M1}$ -ganglioside binding assay.

수확한 형질전환 벼의 종자에서 항원단백질의 발현을 확인한 후에 발현된 항원단백질의 수용체인  $G_{M1}$ -ganglioside에 대한 binding 활성과 발현 수준을 확인하기 위하여  $G_{M1}$ -ELISA 를 수행하였다. 생물학적 활성을 가진 LTB에 대한 수용체인 monosialoganglioside  $G_{M1}$ 를 ELISA plates에 coating 한 후에 식물체에서 발현된 LTB-COE 항원단백질에 대한 결합능력을 rabbit anti-LTB primary antibody를 이용하여 확인한 결과 식물에서 발현된 LTB-COE 항원단백질의 수용체에 대한 결합 능력을 확인하였고 (그림 47A) 이 결과를 토대로하여 발현된 항원단백질의 발현량을 분석한 결과 rice amylase 1A promoter의 조절하에 있는 항원단백질이 4 일간 발아 시킨 것에서 가장 높게 나왔고 발현율은 TSP의 0.011%이었다 (그림 47B).

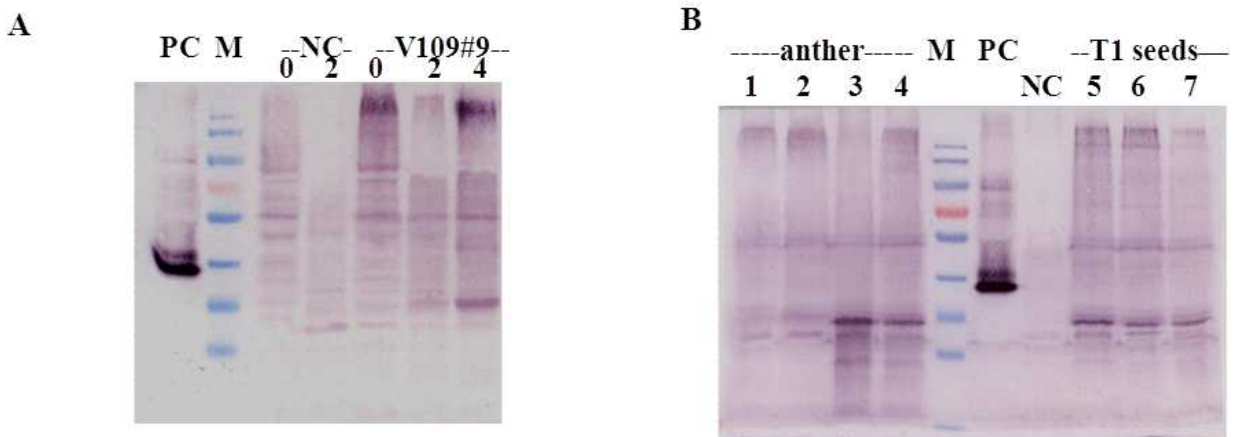


그림 46. Western blot analysis of transgenic rice seeds containing heterologous LTB-COE

fusion protein using a rabbit anti-LTB antiserum. PC, bacterial protein; NC, wild type. (A), Protein extract from germinating rice seeds pMYV109 #9 under the control of rice amylase 1A promoter; 0, protein extract from rice seeds; 2, protein extract from germinated rice for 2 days; 4, protein extract from germinated rice for 4 days. (B), Protein extract from transgenic rice seeds containing LTB-COE under the control of Ubiquitin promoter. Protein extract from anther rice seeds 1, V110 #3 3-4; 2, V110#3 3-11 7; 3, V110 #6 4-1; 4, V110 #6 4-8 and from T1 rice seeds: 5, V110 #7; 6, V743 #7; 7, V743#10.

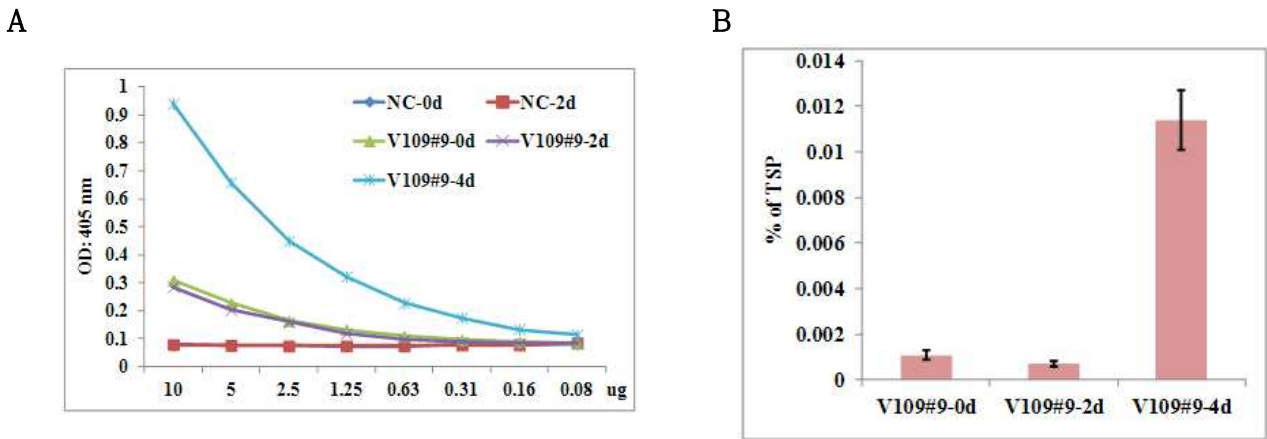


그림 47. G<sub>M1</sub>-ELISA confirmed the assembled LTB-COE fusion protein bound to the intestinal membrane G<sub>M1</sub>-ganglioside receptor and estimated pentameric LTB-COE protein levels in germinating rice seeds .A, Binding of assembled LTB-COE to G<sub>M1</sub>-ganglioside receptor; B, Expression level of LTB-COE in rice seeds and germinating rice seeds; 0, protein extract from rice seeds; 2, protein extract from germinated rice for 2 days; 4, protein extract from germinated rice for 4 days.

### 3. 형질전환체를 이용한 실험동물을 이용한 동물실험

#### 가. LTB-COE, CTB-COE와 COE-Co1를 포함한 벼 단백질 추출을 이용한 동물실험

##### (1). 동물실험을 위한 실험재료 준비

항원단백질의 고발현을 보이는 형질전환 callus를 이용하여 rice cell suspension culture를 확립을 하였고 적절한 조건에서 항원유전자의 발현을 유도한 후 형질전환 callus를 vacuum pump를 이용하여 배지를 제거하고 blender를 사용하여 잘 간 뒤에 PBS buffer를 이용하여 단백질을 추출하고 원심분리를 하여 debris를 제거하였다. 단백질 용액에 ammonium sulfate를 첨가하여 단백질을 침전시키고 침전물을 PBS buffer를 이용하여 투석을 하여 ammonium sulfate를 제거하여 농축된 단백질 용액을 얻은 후, SDS-PAGE와 western blot 분석 그리고 G<sub>M1</sub>-ELISA를 수행하여 농축된 형질전환 callus의 단백질을 분석한 후에 동물 실험에 이용하였다.

동물실험에는 LTB-COE, CTB-COE 그리고 COE-Co1 융합항원단백질을 이용하였고 LTB-COE는 40% ammonium sulfate를 이용하고 (그림 48), CTB-COE는 60%의 ammonium sulfate (그림 49), 그리고 COE-Co1는 40% ammonium sulfate를 이용하여 (그림 50) 단백질

추출물을 침전, 농축하여 동물실험에 이용하였다.

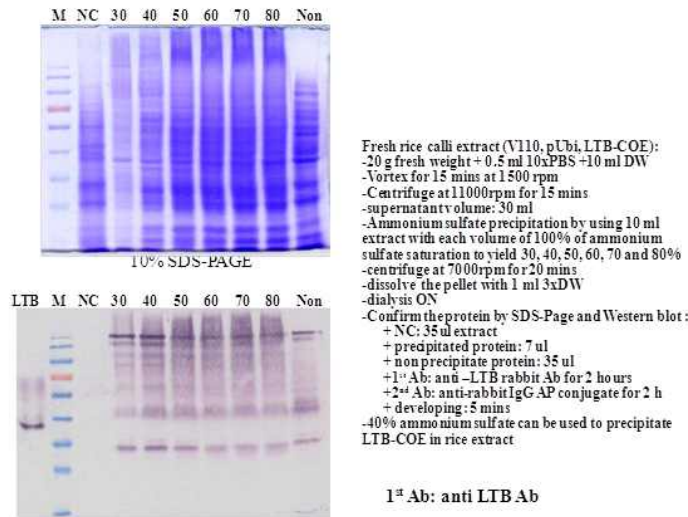


그림 48. LTB-COE 항원단백질의 농축 및 western blot 분석

(2). 농축된 항원단백질을 이용한 동물실험

동물실험을 위하여 BALB/c 쥐를 Dong Yang Oriental company에서 구입하여 그룹당 5 마리씩 사용하여 실험군은 여섯 그룹으로 그룹 1은 형질전환 되지 않은 wild type 형질전환 체를, 그룹 2는 LTB-COE (Ubiquitin promoter, pMYV110), 그룹 3은 LTB-COE (RAmy 3D promoter, pMYV116), 그룹 4는 CTB-COE (Ubiquitin promoter, pMYV111), 그룹 5는 CTB-COE (RAmy 3D promoter, pMYV118), 그룹 6은 COE-Co1으로 그림 51과 같이 나누고 일주일 간격으로 10 주간 경구적인 방법으로 면역 반응을 유도하였다.

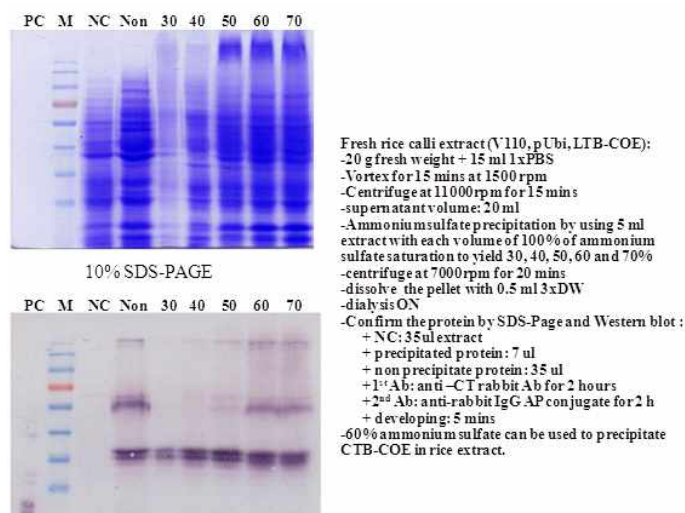


그림 49. CTB-COE 항원단백질의 농축 및 western blot 분석

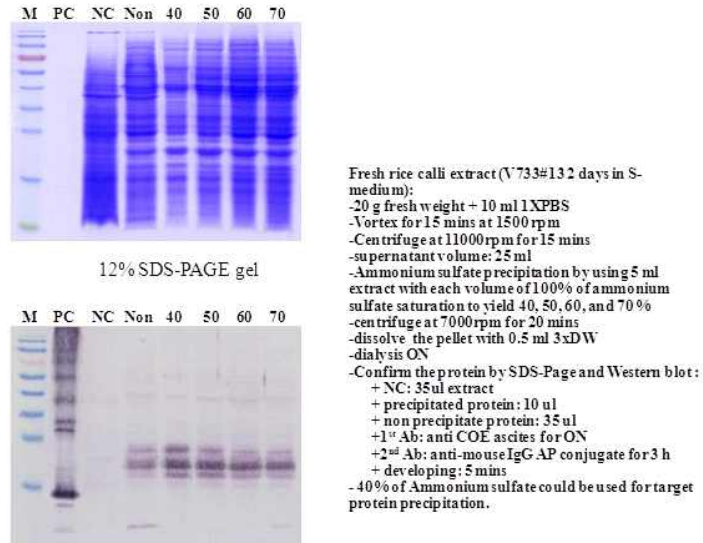


그림 50. COE-Co1 항원단백질의 농축 및 western blot 분석

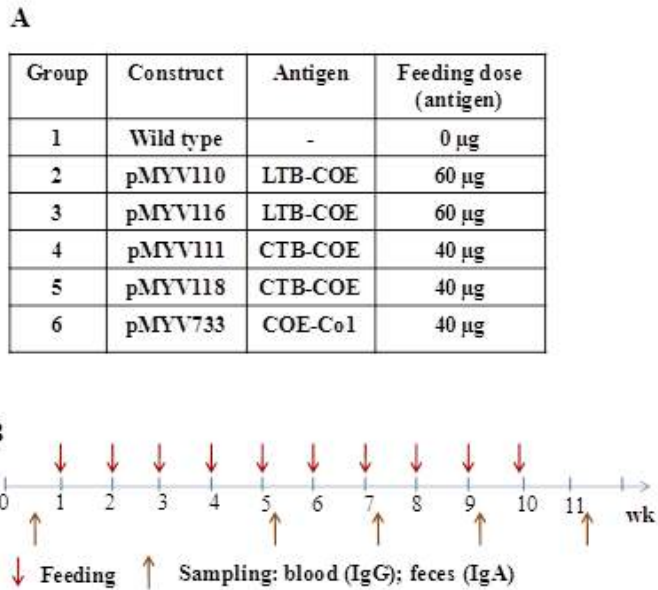


그림 51. 동물실험 그룹과 투여 방법

경구적인 방법으로 농축된 단백질 추출물을 투여하고 4, 6, 8, 10 주 먹인 후 10일이 지난 후에 혈액과 분변의 시료를 수집하였고 혈액은 실온에서 응고 시키고 1시간 동안 얼음에 방치한 후에 원심분리하여 시료를 채취하였고 분변은 0.01% sodium azide가 첨가된 PBS buffer를 200 mg당 1 ml로 추출하여 시료를 채취하였다.

### (3). 동물실험에서 IgG와 IgA 항체 분석

항원단백질에 대한 특이적인 IgG 항체와 IgA 항체는 ELISA plates에 항원단백질 (0.8 ug/ml)를 bicarbonate buffer (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6)로 coating한 후에 혈액에서 추출한 serum 또는 분변 추출물을 결합시킨 후에 IgG 또는 IgA에 특이적인 항체를 이용하여 분석을 하였다.

그룹 2와 3에서는 bacterial LTB에 특이적인 강한 IgG 항체를 유도하였고 그룹 4와 5에서도 bacterial CTB에 대해서 항체를 유도하였지만 LTB 용합단백질을 먹인 그룹에 비해서는 약한 면역반응을 보였는데 투여량이 (CTB-COE, 40 ug) LTB-COE (60 ug)에 비해 양이 적었기 때문으로 보였다 (그림 52). 투여 빈도에 따른 항체 유도는 투여횟수가 증가함에 따라 항체 반응이 증가하는 것으로 관찰되었다.

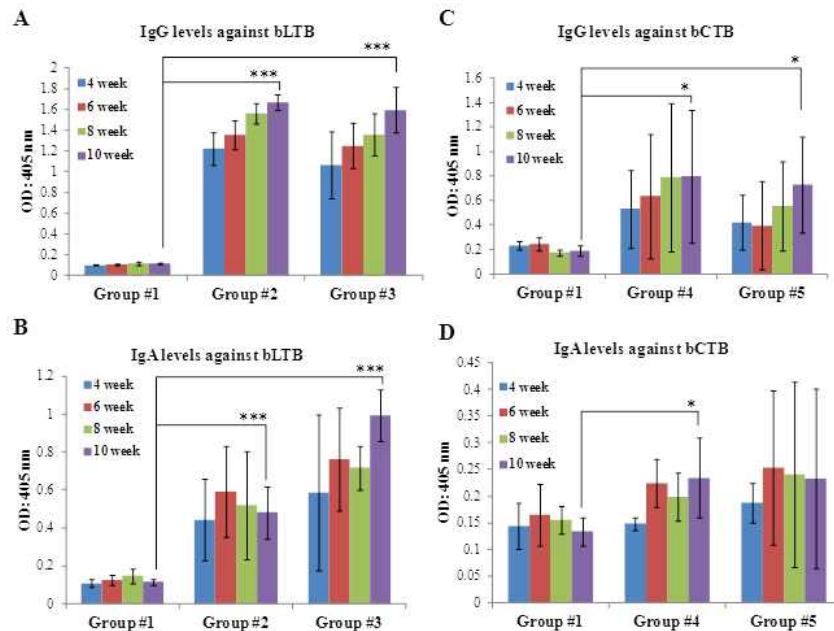


그림 52. 동물실험에서 ligands CTB와 LTB에 대한 항체 분석.

그룹 2와 3에서는 bacterial LTB에 특이적인 강한 IgA 항체를 유도하였고 그룹 4와 5에서도 bacterial CTB에 대해서 IgA 항체를 유도하지 못한 것으로 보아 이것 또한 투여량이 (CTB-COE, 40 ug) LTB-COE (60 ug)에 비해 양이 적었기 때문으로 보였다 (그림 52).

돼지유행성 설사병에 대한 항원단백질인 COE에 대한 IgG와 IgA 항체의 면역반응 유도에 대한 분석결과 IgG 항체의 경우 그룹 2, 3, 4, 와 5에서 대조군에 비해서 약간의 증가는 보였으나 그룹간에 유의성은 보이지 않았고 COE-Co1 그룹 중에 4 마리 중 2 마리가 항원단백질에 대한 항체가 높게 관찰되었다. 점막면역계에서 중요한 기능을 하는 것으로 알려진 IgA 항체에 대한 결과는 그룹 2, 3, 4에서는 대조군에 비해서 약간 높게 항체를 유도하였으나 그룹간에 유의성을 보이지 않았고 그룹 4, 5에서도 유의성은 없지만 대조군에 비해 많은 항체를 유도한 것으로 관찰 되었다 (그림 53).

(4). 형질전환 식물체를 이용한 실험동물에서 ELISPOT 분석

형질전환 식물체에서 생산한 항원단백질에 대한 동물실험에서 전신면역반응 유도를 확인하기 위하여 항원단백질에 대한 높은 면역반응을 보인 실험동물의 spleen에서 얻은 lymphocytes에서 항원단백질에 특이적인 IgG와 IgA 항체를 발현하는 세포의 수를 확인하였다.

CTB-COE와 COE-Co1 항원단백질을 먹인 그룹 5와 6에서 항원단백질 COE에 대해서 항원 특이적인 IgG 항체와 IgA 항체를 생산하는 세포 수가 대조군에 비해 증가한 것을 확인



하여 전신면역반응이 일어났음을 확인할 수 있었다 (그림 54A).

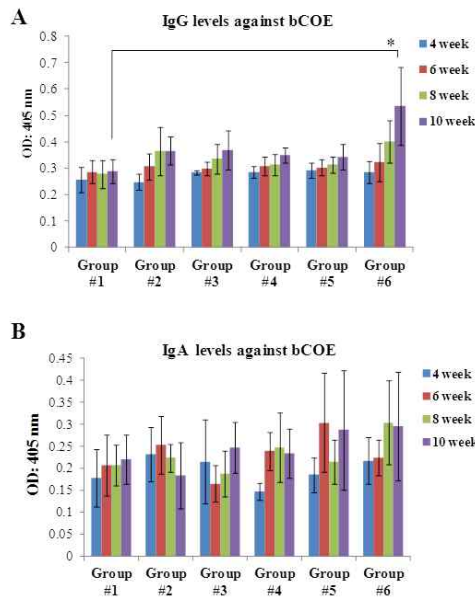


그림 53. 동물실험에서 항원단백질 COE 항원단백질에 대한 항체 분석.

형질전환 식물체에서 생산한 항원단백질에 대한 동물실험에서 점막면역계에서의 유입 및 항원 특이적인 면역반응이 유도되는 inductive site인 Peyer's patch에서 lymphocytes를 분리하여 COE에 특이적인 IgA 항체를 분비하는 세포의 변화를 ELISPOT를 이용하여 확인하였다.

COE-Co1 항원단백질을 먹인 그룹 6에서 분리한 Peyer's patch에서 분리한 lymphocyte에서 다른 그룹과 비교하여 항원 특이적인 IgA 항체를 생산하는 세포가 많이 있음을 관찰되어 COE-Co1 항원단백질에 의해서 점막면역계에서 항원단백질의 유입과 항원 특이적인 면역반응의 유도를 확인하였다 (그림 54B).

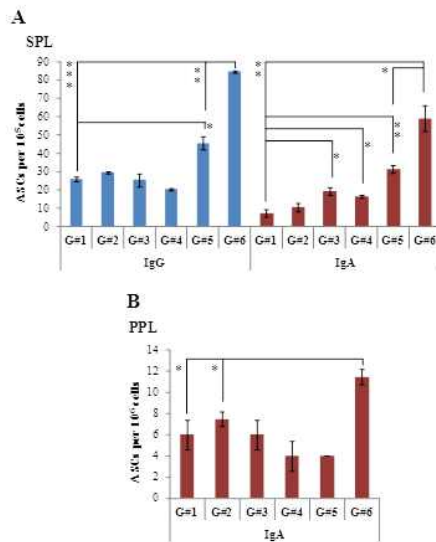


그림 54. 실험동물에서 항원단백질에 대한 ELISPOT 분석

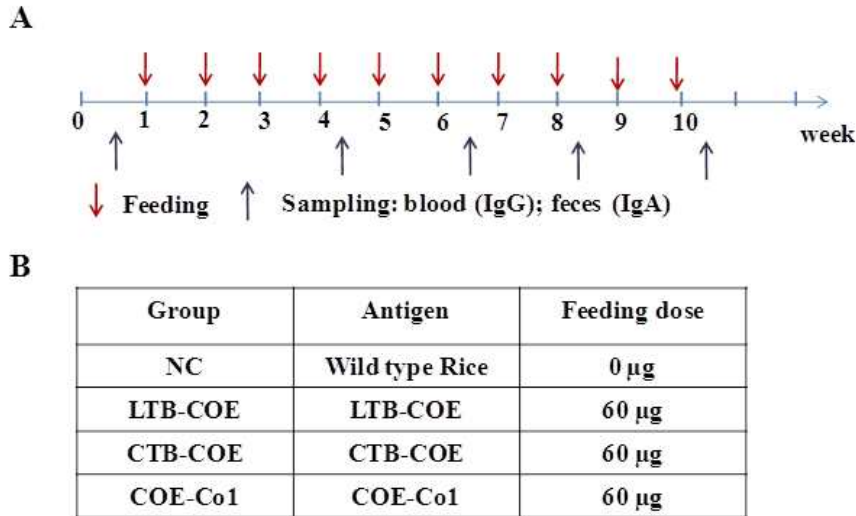


그림 55. Mouse feeding strategy with concentrated rice-based proteins. (A) Mouse feeding strategy. (B) Mouse groups and feeding dose. Rice calli expressing COE-Co1, LTB-COE and CTB-COE fusion proteins were extracted and precipitated by ammonium sulfate for mouse feeding. Each mouse in the experimental group (n=5) was gavaged with 2 ml of PBS buffer containing the 60 $\mu\text{g}$  of antigen with 1 week intervals.

나. LTB-COE, CTB-COE와 COE-Co1를 포함한 벼 단백질 추출을 이용한 동물실험 재수행

전 실험에서 항원단백질의 발현량이 낮은 이유로 LTB-COE, CTB-COE와 COE-Co1 항원단백질에 대해서 식물에서 추출한 protein extract의 농축액을 이용하여 수행한 동물실험에서 COE-Co1 항원단백질을 먹인 실험동물에서 면역반응의 유도를 확인하였다. 전 동물실험 결과를 다시 확인하고 항원단백질의 feeding 량을 증가 시켜 동물실험을 다시 수행하였다.

Ubiquitin promoter (항시성) 조절하에 있는 형질전환 callus pMYV110 #3 (LTB-COE), pMYV111 #10 (CTB-COE)는 N6 배지에서 배양하여 수확하였고 rice amylase 3D promoter 조절 하에 있는 pMYV733 #11 (COE-Co1)는 당고갈 조건에서 항원단백질의 발현을 유도한 후 수확하였다.

수확한 캘러스는 blender를 이용하여 고르게 부순 다음 PBS buffer를 이용하여 단백질을 추출하고 적당한 농도의 ammonium sulfate를 첨가하여 단백질을 침전시켜 농축한 후에 투석을 실시하여 ammonium sulfate를 제거하고 농축하여 동물실험에 이용하였다.

Dong Yang Oriental Company에서 구입한 BALB/c mice를 5 마리씩 4 그룹으로 분리하여 각각 대조군, LTB-COE, CTB-COE COE-Co1 그룹으로 나누어 그림 55의 계획대로 동물실험을 수행하였음 (그림 55).

LTB-COE, CTB-COE 항원단백질을 먹인 쥐에서 채취한 혈액과 분변에서 LTB와 CTB에 대한 IgG와 IgA 항체가 확인되어 LTB와 CTB에 대한 면역반응이 잘 일어난 것을 확인하였고 CTB에 비해서 LTB에 대한 면역반응이 잘 유도 된 것으로 보인다 (그림 56).

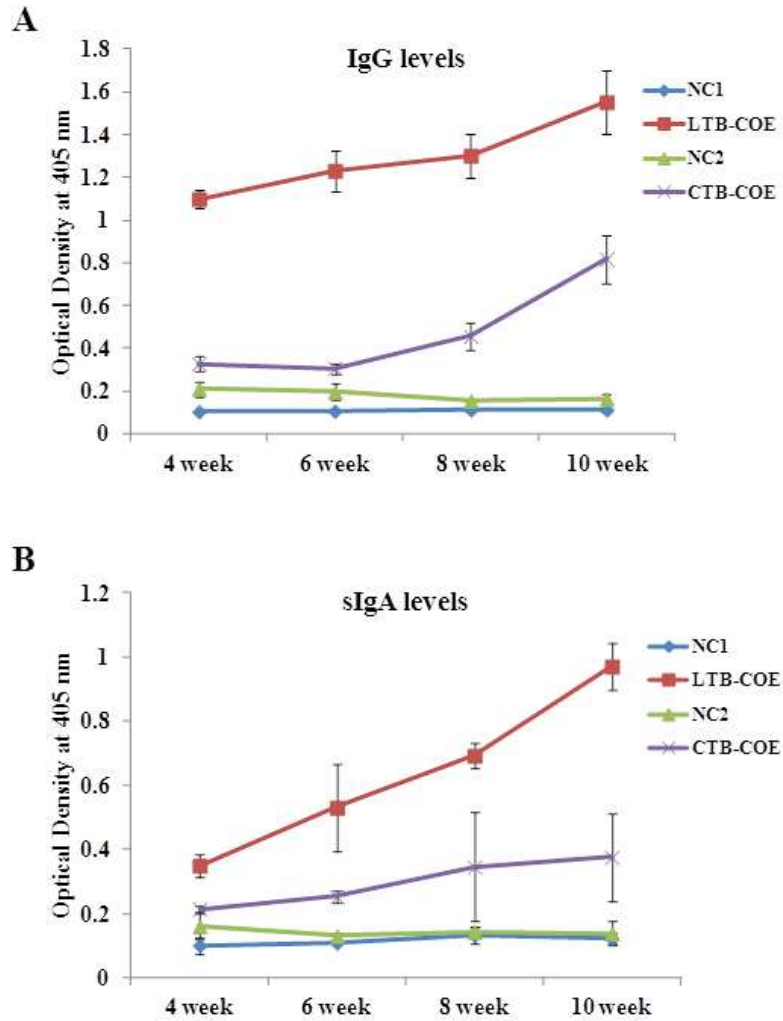


그림 56. Detection of LTB or CTB-specific antibody in immunized mice with concentrated rice protein extracts containing LTB-COE and CTB-COE, determined by ELISA. Serum IgG (A) and sIgA (B) antibody levels against bacterial LTB or CTB, respectively. NC1, NC2: mice sera or fecal extracts from NC group were used to detect LTB Ag or CTB Ag, respectively

항원단백질 COE에 대한 면역반응 유도를 ELISA를 이용하여 IgA 항체를 분석한 결과 COE-Co1, CTB-COE와 LTB-COE를 먹인 실험군에서 서로 간에는 비슷한 항체의 유도를 보였으나 대조군에 비해서 조금 높은 항체를 보였음 (그림 57B).

항원단백질 COE에 대한 면역반응 유도를 ELISA를 이용하여 분석한 결과 3차년도와 같이 COE-Co1 항원단백질을 먹인 실험군에서 CTB-COE와 LTB-COE를 먹인 실험군보다 IgG 항체가 높게 나왔고 CTB-와 LTB-COE에서 대조군에 비해서 조금 높은 항체를 보였음 (그림 57A).



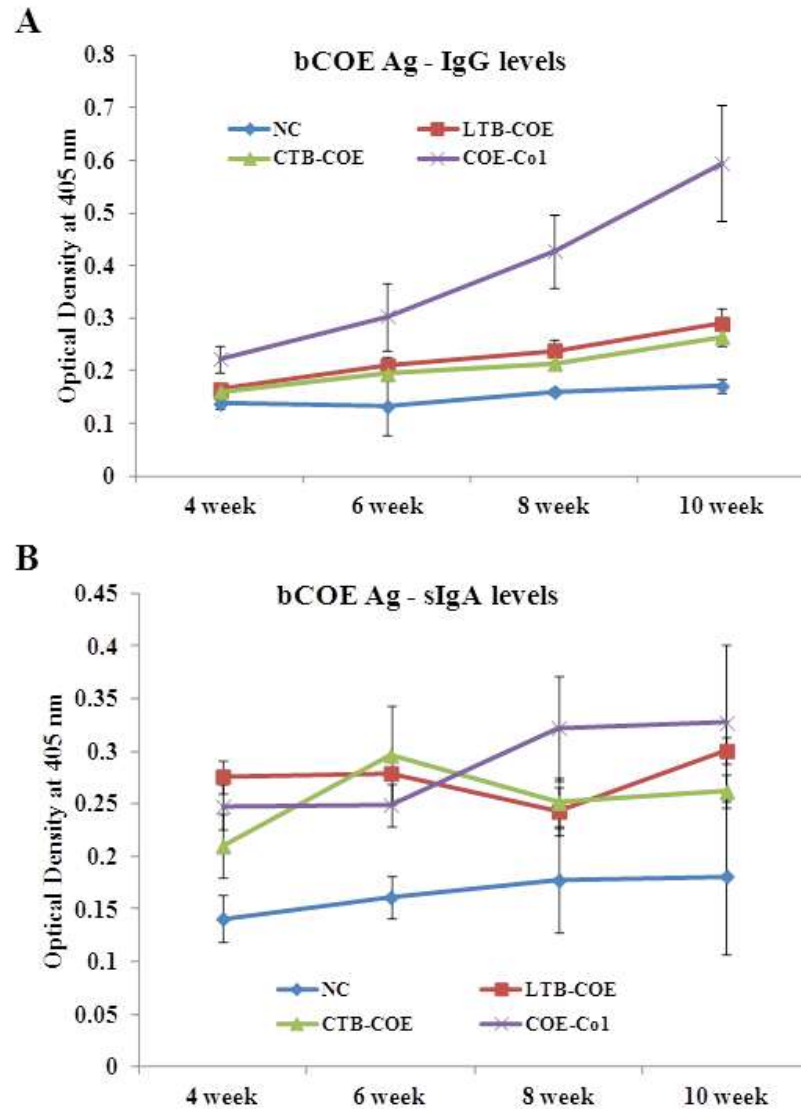


그림 57. Detection of COE-specific antibody in immunized mice with concentrated rice extracts containing LTB-COE and CTB-COE, determined by ELISA. Serum IgG (A) and sIgA (B) antibody levels against bacterial COE.

#### 다. LTB-COE를 발현하는 벼의 종자에 대한 동물 실험

항원단백질의 발현을 확인하고 정량을 한 벼의 종자를 가지고 항원단백질의 발현을 유도한 후에 BALB/c mice (Dong Yang Oriental Company, South Korea)에 경구적인 방법을 이용하여 동물실험을 수행하였다.

동물실험은 5 마리씩 2 그룹으로 하여 한 그룹은 대조군으로 형질전환 되지 않은 종자를 먹이고 다른 한 그룹은 LTB-COE 항원단백질을 발현하는 종자를 4일간 항원단백질의 발현을 유도를 한 후에 발아된 종자 1 g을 (~20 ug of LTB-COE 항원단백질) 먹이를 주기 전에 8 시간 굶기고 일주일 간격으로 10 주간 먹였음 (그림 58).

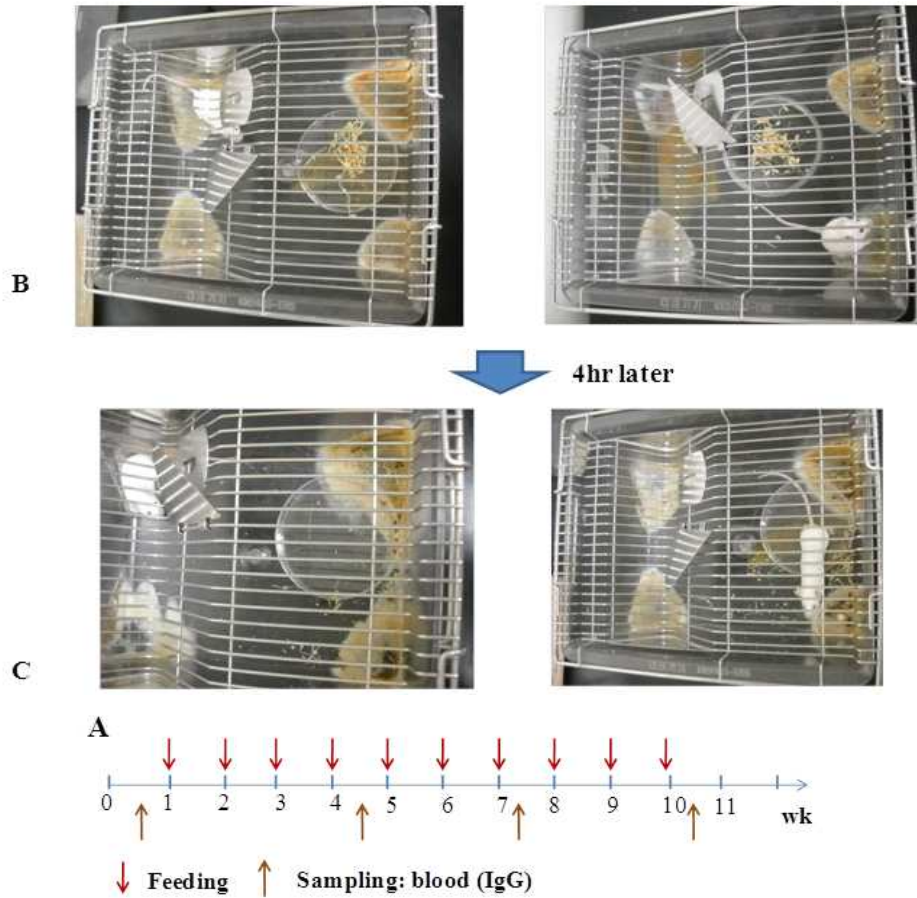


그림 58. Mouse feeding strategy with germinating rice seeds containing LTB-COE and germinating wild type rice. (A) Mouse feeding strategy. Immunized mice were fed with germinating rice seeds (A), mice ate all rice seeds after 4 hours (B).

4, 7, 10 주 먹이고 10일 후에 혈액과 변을 채취하였고 혈액은 실온에서 한 시간, 얼음에서 한 시간 보관한 후에 원심분리하여 혈청을 얻어 보관하였고 분변은 1 ml의 0.01% sodium azide를 포함하고 있는 PBS 버퍼로 extract하여 원심분리하여 보관하였다.

혈청을 가지고 COE 또는 LTB 단백질에 대한 IgG 항체에 대한 ELISA를 수행한 결과 항원단백질인 COE에 대해서는 4, 7, 10 주에서 detection 되지 않아 면역반응이 효율적으로 일어나지 않았음을 확인하였으나 LTB에 대해서는 4 주부터 10 주까지 혈청에서 면역반응을 확인하였고 10 주 차에 가장 강한 면역반응을 유도하였다 (그림 59).

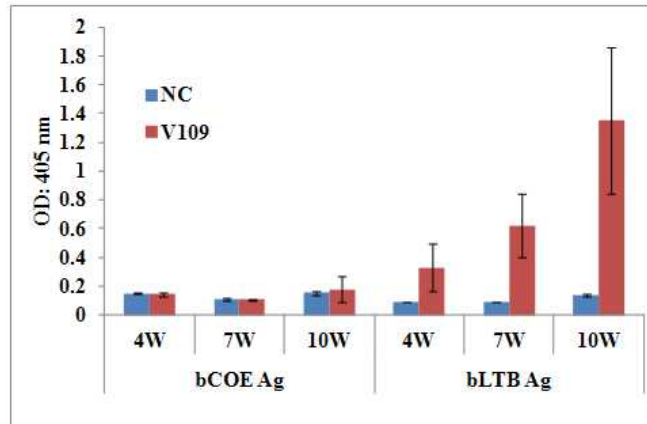


그림 59. Detection of LTB or COE-specific antibody in immunized mice with germinating rice seeds containing LTB-COE and germinating wild type seeds, determined by ELISA.

#### 4. S1D, S1CD 항원유전자의 식물발현벡터 제작

형질전환 식물체에서 발현한 COE (S1C) 항원단백질을 이용하여 수행한 동물실험결과 면역반응의 유도가 낮았다. 이를 보완하기 위하여 다른 epitope로 알려진 S1D 부분을 이용하여 시너지 효과를 얻고자 S1D와 S1CD 융합항원유전자를 식물체에서 발현시키고자 하였다.

##### 가. 항원 유전자 S1D 발현을 위한 식물발현 벡터 제작

###### (1) Transient 발현을 위한 S1D 항원유전자의 식물발현벡터 제작

PEDV의 spike protein을 가지고 있는 pMYV98를 template로 이용하고 primers (5' -GGA TCC GAC GTT TCT TTT ATG AC -3' and reverse primer 5' -GGT ACC AAT ACT CAT ACT AAA G-3' )를 가지고 PCR를 수행하여 S1D 유전자를 증폭하였고 BamHI과 KpnI 제한효소를 primer에 첨가하였다. S1D 유전자는 Ex Taq (Takara Bio, japan)를 이용하여 증폭하였고 PCR products는 pGEMT-Easy vector (promega)에 cloning 한 후에 primers T7과 SP6를 사용하여 염기서열을 확인한 후에 pMYV712라 명명하였다.

S1D 유전자를 포함하고 있는 pMYV712를 BamHI과 KpnI 제한효소로 자른 후에 duplicated 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter (pd35S), CTB signal peptide, ER retention signal (SEKDEL)과 Nos-T를 가지고 있는 식물발현벡터의, pMYV497, 같은 제한효소 부위에 subcloning하여 pMYV717를 제작하였다 (그림 60). pMYV717는 BamHI과 KpnI으로 잘라 subcloning을 확인하였다.

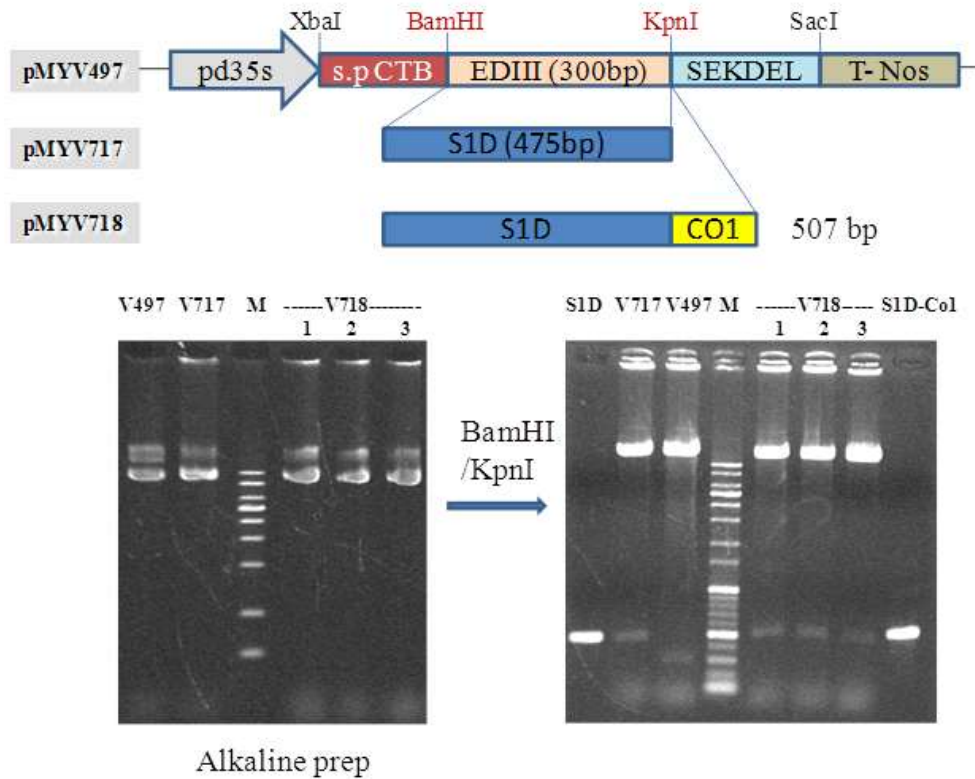


그림 60. Construction of binary vectors for transient expression of the S1D and S1D-Co1 fusion genes. The plasmid pMYV717 and pMYV718 were digested with *Bam*HI and *Kpn*I to yield 475 bp and 507 bp fragment, respectively, and vector. These plasmids were transformed into *Agrobacterium* strain LBA4404 for transient expression in *N. benthamiana*.

(2) S1D-Co1 항원유전자의 transient 발현을 위한 식물발현벡터 제작

PEDV의 spike protein 유전자를 포함하고 있는 plasmid pMYV98를 template로 하고 primers (forward primer 5' -GGA TCC GAC GTT TCT TTT ATG AC-3', reverse primer 5'-GGT ACC TGG AAG TGG AGA TCT AGC TGG AAG CTG ATG AAA AGA AAT ACT CAT ACT AAA G-3')를 이용하여 Co1 ligand와 결합한 S1D 항원유전자를 PCR 방법을 수행하여 증폭하였음. 각각 primers는 원활한 cloning을 위하여 BamHI과 KpnI 제한효소 부위(밑줄)을 포함하고 있고 reverse primer는 Co1 ligand 염기서열(*italic*)을 포함하고 있다.

PCR products인 S1D-Co1 항원유전자는 pGEMT-Easy vector에 cloning을 하였고 primer T7과 SP6를 이용하여 염기서열 분석을 수행하여 확인한 후에 pMYV713 이라 명명하였다.

S1D-Co1 항원유전자를 가지고 있는 pMYV713을 BamHI과 KpnI으로 자른 후에 duplicated 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter (pd35S), CTB signal peptide, ER retention signal (SEKDEL)과 Nos-T를 가지고 있는 식물발현벡터의, pMYV497, 같은 제한효소 부위에 subcloning하여 pMYV718를 제작하였다 (그림 60). pMYV718는 BamHI과 KpnI으로 잘라 subcloning을 확인하였다.

(3) CTB-S1D 항원유전자의 transient 발현을 위한 식물발현벡터 제작

CTB-S1D 융합 항원유전자를 제작하기 위하여 S1D 항원유전자를 포함하고 있는 plasmid pMYV712를 BamHI과 KpnI으로 자른 후에 CTB를 포함하고 있는 pMYV498를 같은 제한효소로 자른 부위에 치환하여 pMYV719 식물발현벡터를 제작하였다. 이 항원유전자는 pd35S promoter 조절하에 있고 CTB가 S1D 유전자의 아미노기에 융합되어 있고, ER retention signal (SEKDEL)과 T-Nos를 포함하고 있다 (그림 61).

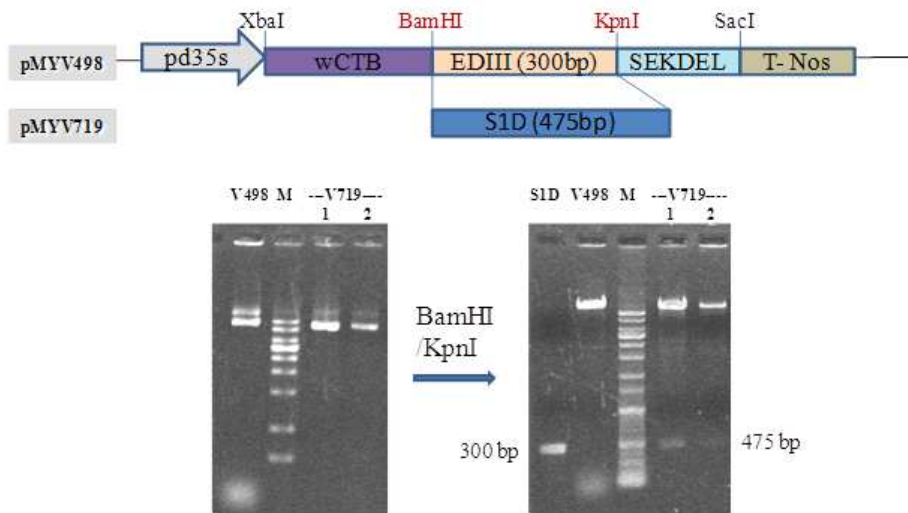


그림 61. Construction of binary vector (pMYV719) for transient expression of the CTB-S1D fusion gene, promoter, sCOE-Co1 fusion gene, 3' -UTR. The plasmid pMYV719 was digested with *Bam*HI and *Kpn*I to yield 475 bp and vector. This plasmid was transformed into *Agrobacterium* strain LBA4404 for transient expression in *N.benthamiana*.

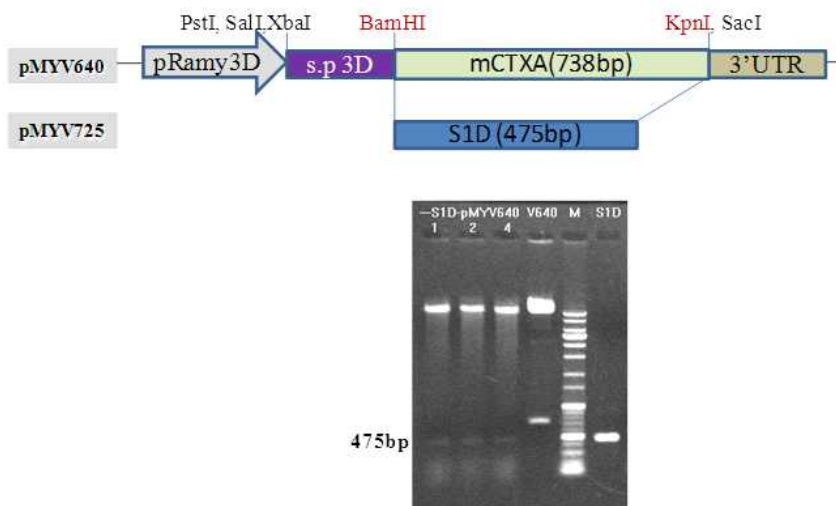


그림 62. Construction of pMYV725 containing rice amylase 3D promoter, S1D gene, 3' -UTR. The plasmid pMYV725 was digested with *Bam*HI and *Kpn*I to yield 475 bp fragment and vector. This plasmid was transformed into rice calli by the particle bombardment method.



식물발현벡터 pMYV717, 718과 719를 transient expression을 시키기 위하여 Agrobacterium strain LBA4404에 triparental mating 형질전환 방법을 이용하여 형질전환 시켰다.

(4) 벼에서 S1D 항원유전자의 발현을 위한 식물발현벡터 제작

S1D 항원유전자를 벼에서 발현시키기 위하여 S1D 유전자를 포함하고 있는 plasmid pMYV712를 BamHI과 KpnI으로 자른 후에 rice amylase 3D promoter system을 가지고 있는 pMYV640를 같은 제한효소로 자른 부위에 치환하여 pMYV725 식물발현벡터를 제작하였다. 이 식물발현벡터는 BamHI과 KpnI에 의해서 형질전환을 확인하였다 (그림 62).

(5) 벼에서 S1D-Co1 항원유전자의 발현을 위한 식물발현벡터 제작

S1D-Co1 항원유전자를 벼에서 발현시키기 위하여 S1D-Co1 항원유전자를 포함하고 있는 plasmid pMYV766를 BamHI과 KpnI으로 자른 후에 rice amylase 3D promoter system을 가지고 있는 pMYV703를 같은 제한효소로 자른 부위에 치환하여 pMYV767 식물발현벡터를 제작하였다. 이 S1D-Co1 항원유전자는 항원단백질의 발현을 높이기 위하여 BiP signal peptide에 융합되어 있다. 이 식물발현벡터는 BamHI-SacI과 XbaI-SacI에 의해서 형질전환을 확인하였다 (그림 63).

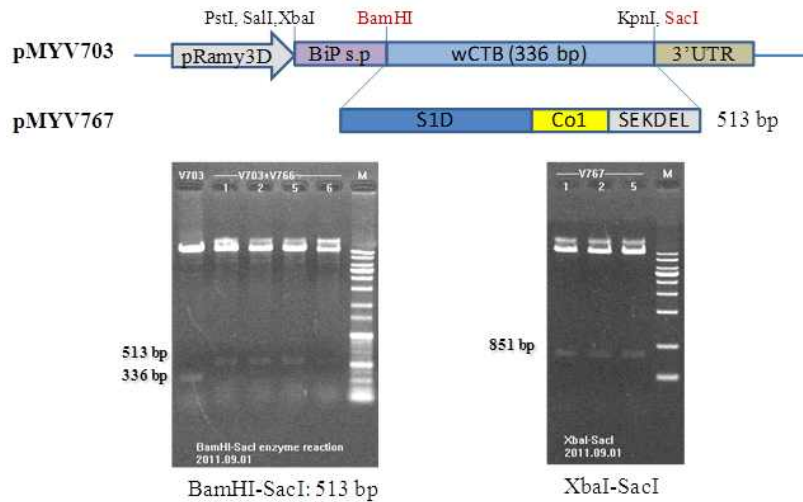


그림 63. Construction of pMYV767 containing rice amylase 3D promoter, S1D-Co1 fusion gene, 3' -UTR and BiP signal peptide. The plasmid pMYV767 was digested with *Bam*HI-*Sac*I and *Xba*I-*Sac*I to yield 513 bp and 851 bp fragment, respectively, and vector. This plasmid was transformed into rice calli by the particle bombardment method.

(6) 벼에서 S1D-LL37 항원유전자의 발현을 위한 식물발현벡터 제작

제 2-1 세부과제에서 adjuvant 효과를 가지고 있는 것으로 밝혀진 LL-37과 융합된 S1D-LL37 항원유전자를 벼에서 발현시키기 위하여 S1D-LL37 항원유전자를 포함하고 있는 pMYV793을 BamHI과 SacI으로 자른 후 rice amylase 3D promoter와 BiP signal peptide를 포함하고 있는 식물발현벡터 pMYV703의 같은 부위에 치환을 하여 pMYV797를 제작하였다. 이 식물발현벡터는 BamHI-SacI에 의해서 형질전환을 확인하였다 (그림 64)

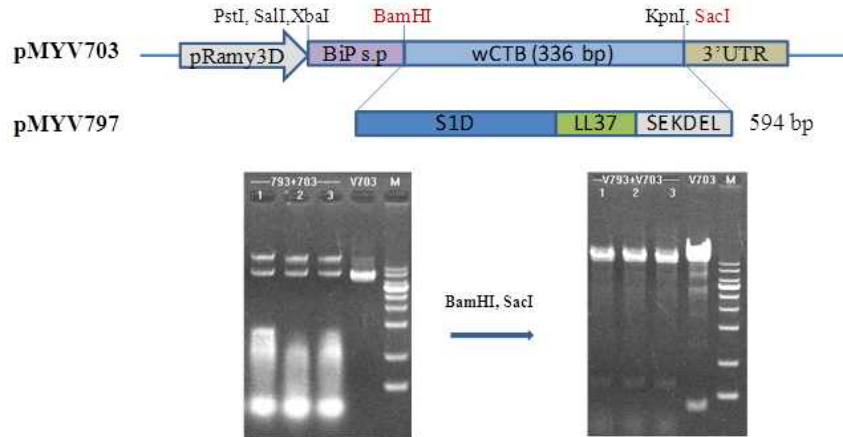


그림 64. Construction of pMYV797 containing rice amylaseD promoter, S1D-LL37 fusion gene, 3' -UTR and BiP signal peptide. The plasmid pMYV797 was digested with *Bam*HI-*Sac*I 594p fragment and vector. This plasmid was transformed into rice calli by the particle bombardment method.

(7) *N. benthamiana*에서 S1CD 항원유전자의 transient 발현을 위한 식물발현벡터 제작

COE 유전자와 S1D 유전자를 포함하고 있는 S1CD 항원유전자를 함유하고 있는 plasmid pMYV8018를 *Xba*I과 *Sac*I으로 자른 후 항원단백질의 고발현을 얻기 위한 방법인 viral vector를 이용한 agroinfiltration에 의한 발현 체계를 이용하기 위하여 Arizona State University의 H. Mason 박사로부터 얻은 pBYR2fp plasmid의 같은 부위에 subcloning하였고 pMYV8019라 명명하였음. 이 식물발현벡터는 *Xba*I-*Sac*I으로 잘라 형질전환을 확인하였다 (그림 65).

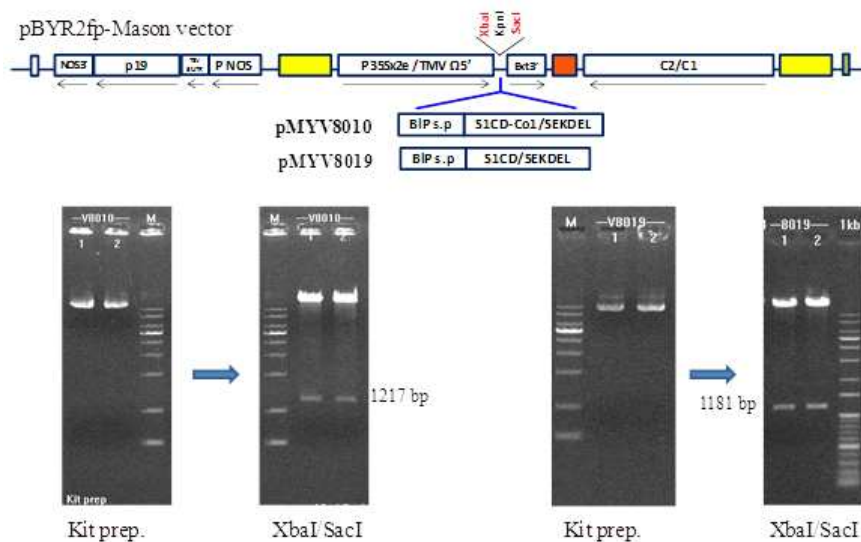


그림 65. Construction of transient expression vectors (pMYV8010; pMYV8019). Plasmids pMYV8010 and pMYV8019 were digested *Xba*I and *Sac*I to yield 1217 bp and 1181 bp, respectively and vector. These plasmids were transformed into *Agrobacterium* strain LBA4404 for transient expression in *N. benthamiana*.

(8) *N. benthamiana*에서 S1CD-Co1 항원유전자의 transient 발현을 위한 식물발현벡터 제작

BiP signal peptide와 ER retention signal과 융합하고 있는 S1CD 유전자를 포함하고 있는 pMYV8004로부터 XbaI과 SacI으로 자른후 transient expression에 이용되는 pMBYR2fp의 같은 제한효소 부위에 subcloning하여 pMYV8019라 명명하고 XbaI-SacI으로 잘라 형질전환을 확인하였다 (그림 65).

pMYV8019와 pMYV8010은 triparental mating 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 형질전환하였다.

#### 나. S1D 항원유전자의 발현 분석

(1) *N. benthamiana*에서 S1D, S1D-Co1 항원유전자의 transient 발현 확인

S1D, S1D-Co1 항원유전자를 포함하고 있는 pMYV717과 pMYV718로 형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 *N. benthamiana* 식물의 잎에 syringe agroinfiltration 방법을 이용하여 발현을 시켰다 (그림 66). Agroinfiltration 시 silencing suppressor인 P19 유전자를 가지고 있는 pMYV508를 이용하여 항원단백질의 발현의 증가를 확인하였다.

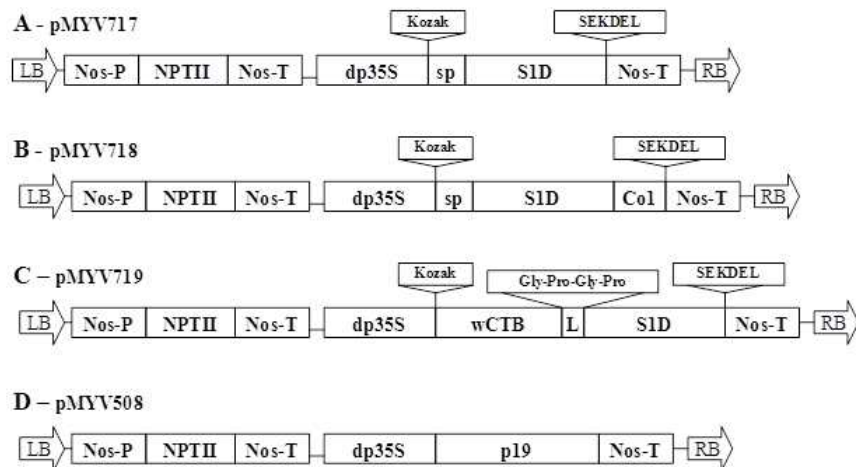


그림 66. T-DNA constructs used in agroinfiltration. Binary vectors for transient expression of the S1D gene (A), S1D-Co1 fusion gene (B), CTB-S1D fusion gene (C) and the p19 protein (D). The LB, left border of T-DNA; RB, right border of T-DNA; S1D, S1D epitope; wCTB, wild type CTB; Col, M cell targeting ligand; dp35S, duplicated CaMV 35S promoter; Nos-T, terminator of Nopaline synthase, Nos-P, promoter of synthase; sp, CTB signal peptide; Kozak, Kozak consensus sequence; SEKDEL, ER retentional signal; NPT II, gene for the neomycin phosphotransferase II providing kanamycin resistant; p19, silencing suppressor gene for the p19 protein of tomato bushy stunt virus.

Agroinfiltration을 수행한 후에 2, 4, 6와 8일째에 잎을 수확하였고 단백질을 추출한 후에 western blot 분석을 수행하여 항원단백질의 발현을 확인하였다.

Western blot 분석 결과 S1D, S1D-Co1 항원단백질의 발현을 확인하였고 P19과 같이 agroinfiltration한 sample에서 높은 발현을 보였음 (그림 67A, B). 항원단백질의 발현은 agroinfiltration 후 4일째에 고발현을 보였다.



Western blot 분석 결과 확인된 band는 예상 크기보다 크게 확인되었고 S1D 항원유전자는 7개의 N-glycosylation 부위를 가지고 있다. N-glycosylation 여부를 확인하기 위하여 PNGase F 처리한 결과 S1D와 S1D-Co1 항원단백질의 크기가 줄어들고 박테리아에서 순수분리한 크기와 같은 것으로 보아 N-glycosylation 된 것을 확인하였음 (그림 67C).

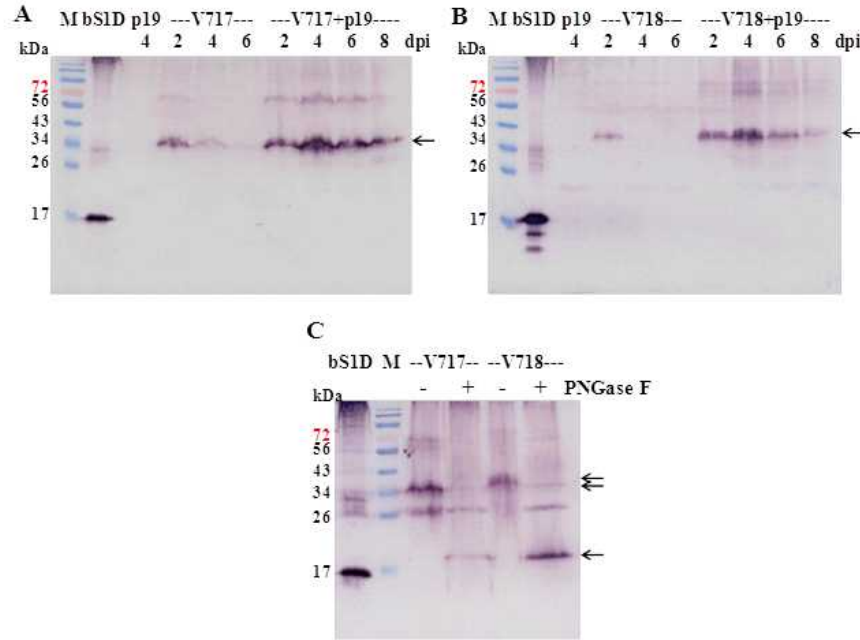


그림 67. Western-blot analyses of transiently expressed S1D protein and S1D-Co1 fusion protein in agroinfiltrated *N.benthamiana* leaves. Transient expression of plasmid pMYV717 containing the S1D gene (A), plasmid pMYV718 containing S1D-Co1 fusion gene (B) co-infiltrated with (+p19) or without plasmid pMYV508 (p19). Infiltrated leaf discs were sampled at 2, 4, 6 and 8 days post-infiltration (dpi). Analysis of N-glycosylation of S1D and S1D-Co1 with PNGase F (+) (C). Protein extracts (30  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using mouse anti-S1D antibody as primary antibody to detect S1D and S1D-Co1 antigen. M represents the prestained SDS-PAGE standards; bS1D, S1D antigen expressed in *E. coli*; p19-4, 4 dpi leaf discs infiltrated with plasmid pMYV508 was used as a negative control.

(2) *N. benthamiana*에서 transiently 발현된 S1D, S1D-Co1 항원단백질의 정량

*N. benthamiana*에서 transient expression에 의해서 발현된 S1D, S1D-Co1 항원단백질의 정량을 하기 위하여 western blot 결과를 scan하여 densitometry 방법 (Alpha Ease FC TM software 3.3.3., AlphaInotech)을 이용하여 수행하였다.

20, 40 와 80 ug의 bacterial 항원단백질을 standard curve를 그리기 위해 사용하여 항원단백질을 정량하였다.

P19이 존재하지 않은 조건에서는 2 dpi에서 고발현을 보였고 (S1D, S1D-Co1 발현 수준이 0.04와 0.01% of TSP) P19이 존재하는 조건에서는 S1D와 S1D-Co1 항원단백질의 발현이 4 dpi에 0.15와 0.09% of TSP를 보였다 (그림 68).

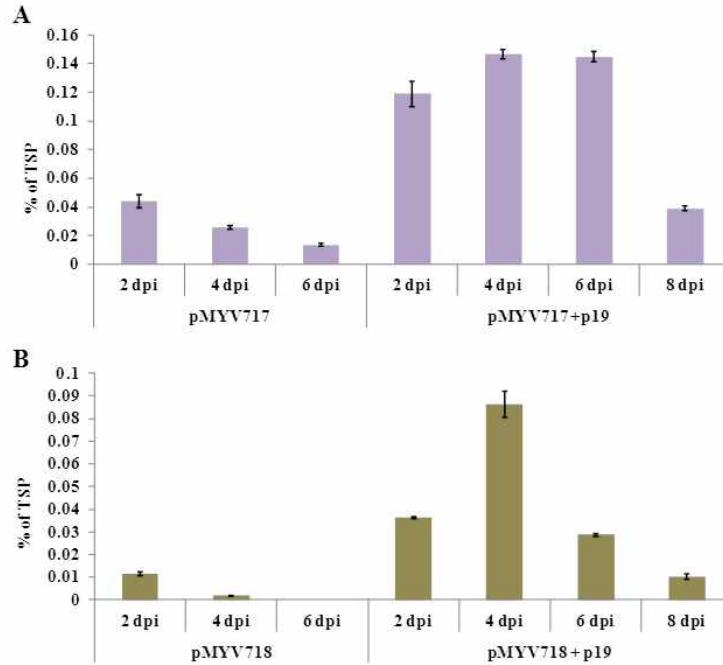


그림 68. The expression level of S1D and S1D-Col fusion protein estimated using quantitative densitometry. The expression levels of S1D protein (A) and S1D-Col fusion protein (B) in infiltrated *N.benthamiana* leaf discs at 2,4,6 and 8 dpi together with p19 or without p19. The expression levels were represented as % of TSP.

### (3) *N. benthamiana*에서 CTB-S1D 항원유전자의 발현

Agroinfiltration 한 후 수확한 잎에서 단백질을 추출하고 boiled와 unboiled 조건에서 CTB-S1D 항원단백질의 발현을 anti-CT와 anti-S1D 항체를 primary 항체로 이용하여 western blot를 수행하였다.

Unboiled 조건에서, 식물에서 발현된 CTB-S1D 융합항원단백질이 pentamer 정도 크기의 170 kDa이 넘는 크기에서 anti-CT와 anti-S1D 항체에 의해서 같은 위치에서 확인되어 확인된 band의 단백질이 CTB와 S1D 단백질을 포함하는 것으로 보아 CTB-S1D 항원단백질이 발현되었음을 확인하였다 (그림 69 A, B). 대조군으로 사용한 bacterial CTB는 assembled form인 45 kDa의 크기에서 확인되었음. 박테리아에서 발현시켜 분리된 S1D 단백질도 17 kDa에서 확인하였다.

추출한 단백질을 5분간 가열한 후에 수행한 western blot 분석 결과, unboiled 조건에서 assembled form으로 확인되었던 항원단백질이 분리가 되어 anti-CT와 anti-S1D 항체에 의해서 약 51 kDa 크기의 band에서 관찰되었음 (그림 69 C, D). Bacterial CTB는 12 kDa 크기에서 확인하였다.

CTB-S1D monomer의 크기는 계산상으로 30 kDa 정도인데 약 51 kDa에서 확인된 것은 CTB 단백질에 두 개, S1D 단백질에 7개의 N-glycosylation가 존재하는 것이기 때문으로 보였다.

P19과 같이 발현을 시켰을 때에 CTB-S1D 항원단백질의 발현량이 증가하였다.

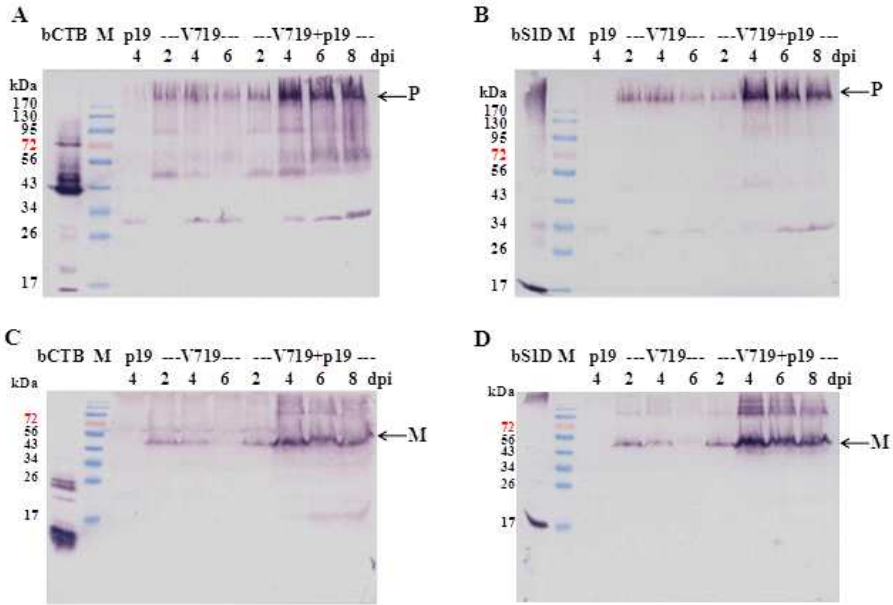


그림 69. Transient expression of the CTB-S1D fusion protein in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves. *N. benthamiana* leaf discs were co-infiltrated with plasmid pMYV719 with p19 or without p19 and sampled at 2, 4, 6 and 8 dpi respectively. Protein extracts (40  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE and analyzed after boiled (C, D) or unboiled conditions (A, B) using anti-CT (A, C) or anti-S1D antibody (B, D) as the primary antibody. M represents the prestained SDS-PAGE standards; bS1D, S1D antigen expressed in *E. coli*; p19-4, 4 dpi leaf discs infiltrated with plasmid pMYV508 was used as a negative control.

(4) *N. benthamiana*에서 발현된 CTB-S1D 항원단백질의  $G_{M1}$  결합능력

*N. benthamiana*에서 Agroinfiltration에 의해서 발현된 CTB-S1D 항원단백질의 CTB의 수용체인  $G_{M1}$ 에 대한 결합 능력을 확인하기 위하여 anti-CT와 anti-S1D 항체를 이용하여  $G_{M1}$ -ELISA를 수행하였다.

Anti-CT와 anti-S1D 항체를 이용한  $G_{M1}$ -ELISA 결과 P19와 같이 발현 시킨 것에서 receptor에 대한 높은 결합능력을 보였다 (그림 70A, B).

$G_{M1}$ -ELISA 결과를 토대로 발현된 항원단백질을 정량한 결과 P19이 없을 때에는 전체 수용성 단백질 중에 0.003과 0.07%를 차지하였고 P19과 같이 발현 시켰을 때에는 전체 수용성 단백질중 0.09%에서 0.49%를 차지하였다 (그림 70C).

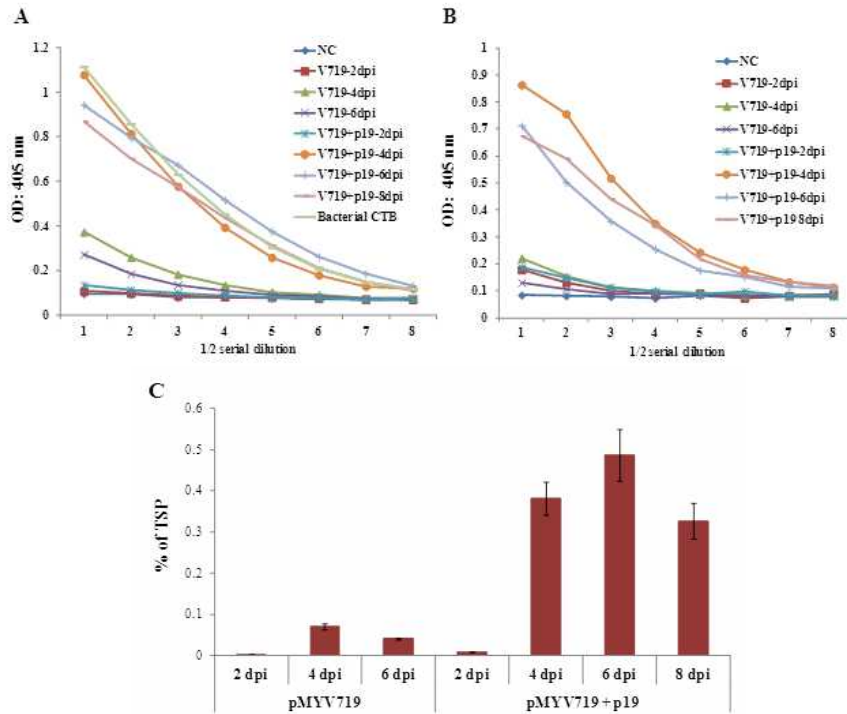


그림 70. G<sub>MI</sub>-ELISA and expression level of CTB-S1D fusion protein produced in infiltrated *N. benthamiana* leaves. The biological activity of CTB-S1D fusion protein with the intestinal membrane G<sub>MI</sub>-ganglioside receptor or was confirmed using anti-CT antibody(A) and anti-S1D antibody (B). The expression level of the CTB-S1D fusion protein were estimated using quantitative densitometry and represented as % of TSP (C) .

#### 다. 벼 형질전환 및 분자생물학적 분석

##### (1) 벼 형질전환

pMYV725, pMYV767과 pMYV797의 항원유전자를 벼에 형질전환 하기 위하여 성숙한 벼(*Oryza sativa* L. cv. Dongin)의 종자의 표피를 제거하고 표피 소독을 한 후에 2,4-dichlorophenoxylic acid (2mg/l), sucrose (30 g/l), kinetin (0.2 mg/l)를 포함하는 N6 callus induction 배지에서 7 일간 벼 종자의 캘러스를 유도하고 이 캘러스를 이용하여 particle bombardment-mediated 방법을 이용하여 형질전환을 수행하였다.

Bombardment를 수행하고 2,4-dichlorophenoxylic acid (2mg/l), sucrose (30 g/l), kinetin (0.2 mg/l), glucose (10g/l)를 포함하고 선발마커를 포함하지 않은 N6 co-culture 배지에서 암상태로 2일간 culture하고 선발마커 hygromycin B (50 mg/l)가 첨가된 N6 selection 배지로 옮겨 계대하면서 배양하였다. 2-3 주 후에 putative transgenic 캘러스가 나타나기 시작하였다.

캘러스를 얻은 후 벼로 재분화 시키기 위하여 N6 salts with Vitamin B5 (3.957g/l), sucrose (30 g/l), proline (0.5 g/l), glutamine (0.5 g/l) casein enzymatic hydrolysate (0.3 g/l), NAA (0.5 mg/l) and BAP (3 mg/l) and hygromycin B (50 mg/l)를 포함하고 있는 Cambia 배지에서 수행하였음. 2 개월 후부터 plantlets가 나타나기 시작하였다.

(2) 형질전환 식물체의 genomic DNA PCR

벼를 형질변환 시킨 후에 얻어진 캘러스로부터 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA) 를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 벼의 캘러스에 도입된 SID, SID-Co1과 SID-LL37 항원유전자는 표 13에 있는 primer를 이용하여 genomic DNA PCR를 수행하여 항원유전자의 도입을 확인하였다.

표 13. 항원유전자에 특이적인 primer 목록

Gene	Primer sets
S1D	S1D-BamHI-F: 5'-ggatcc GAC GTT TCT TTT ATG AC-3' S1D-KpnI-R: 5'-gggtacc AAT ACT CAT ACT AAA G-3'
S1D-Co1	S1D-BamHI-F: 5'-ggatcc GAC GTT TCT TTT ATG AC-3' Co1-KpnI-R: 5'-gggtacc TGG AAG TGG AGA TCT AGC-3'
S1D-LL37	S1D-BamHI-F: 5'-ggatcc GAC GTT TCT TTT ATG AC-3' LL-37 R: 5'-gagctc TCA GGA CTC TGT CCT GGG-3'

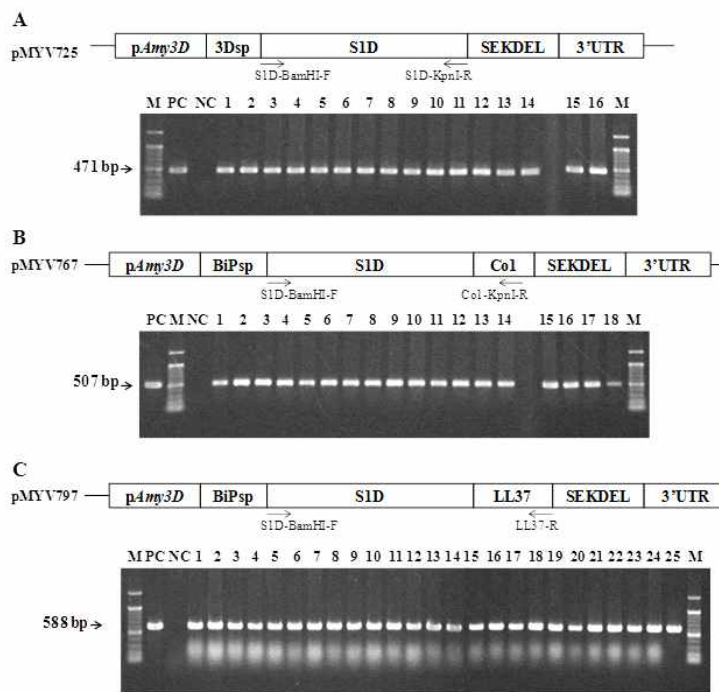


그림 71. Genomic DNA PCR analysis of the putative transgenic rice calli. M: 100 bp DNA ladder; PC: positive control derived from recombinant plasmid DNA; NC: negative control derived from wild-type rice calli; 1~25: putative transgenic rice calli. The PCR products were amplified from rice transformed with plasmid pMYV725 (A), pMYV767 (B) and pMYV797 (C).

Genomic DNA PCR는 94°C에서 5분간 genomic DNA를 denaturing하고, 94°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 30회 반복 실시하고 마지막으로 72°C에서 5분 반응 하였음. PCR products는 1% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

S1D, S1D-Co1과 S1D-LL-37 항원유전자로 형질전환을 수행하여 선발된 모든 캘러스의 genomic DNA로부터 PCR를 수행한 결과 471 bp (그림 71 A), 501 bp (그림 71B) 와 588 bp (그림 71C)를 확인하였다.

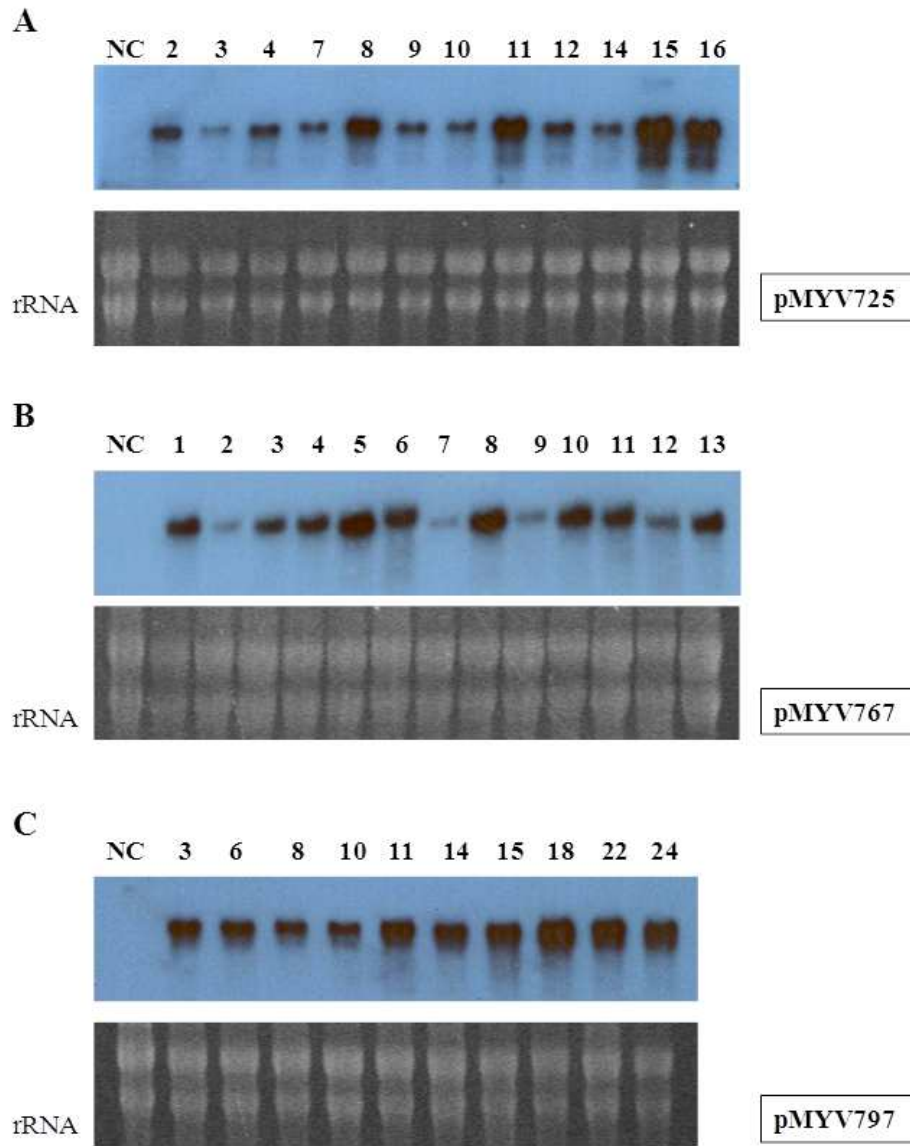


그림 72. Northern blot of transgenic rice calli. pMYV725(A), pMYV767 (B) or pMYV797 (C) were hybridized with <sup>32</sup>P-labeled S1D, S1D-Co1 or S1D-LL37 as the probes. The transgenic lines shown strong mRNA band were selected for the next experiments.

### (3) 형질전환 식물체의 항원유전자의 발현

선발된 캘러스에서 항원유전자의 도입을 확인한 후에 항원유전자의 발현을 확인하기 위하여 당고갈 조건에서 5일간 rice amylase 3D promoter를 활성화하여 항원유전자의 mRNA를 Northern blot 분석을 이용하여 확인하였다.

S1D, S1D-Co1과 S1D-LL-37 형질전환 캘러스를 동위원소로 표지한 각각에 대해서 S1D, S1D-Co1과 S1D-LL-37 유전자를 probe로 사용하여 Northern blot 분석을 한 결과 모든



캘러스에서 항원유전자의 transcripts를 확인하였다 (그림 72).

(4) 형질전환 식물체의 항원단백질의 발현

항원유전자의 mRNA로의 발현을 확인하고 당고갈 조건에서 항원단백질의 발현을 유도한 후에 immunoblot 분석을 수행하여 항원단백질의 발현을 확인하였다. Anti-S1D 항체를 primary 항체로 사용하였다.

S1D (pMYV725) 항원유전자로 형질전환된 캘러스 중에 Northern blot 분석 결과 mRNA의 발현이 강한 캘러스를 선발하여 수행한 western blot 분석 결과는 #2, 4, 8, 11, 15, 16에서 비슷한 수준의 band의 강도를 보여주었고 control에 비해서 크기가 큰 위치에서 확인하였다 (그림 73).

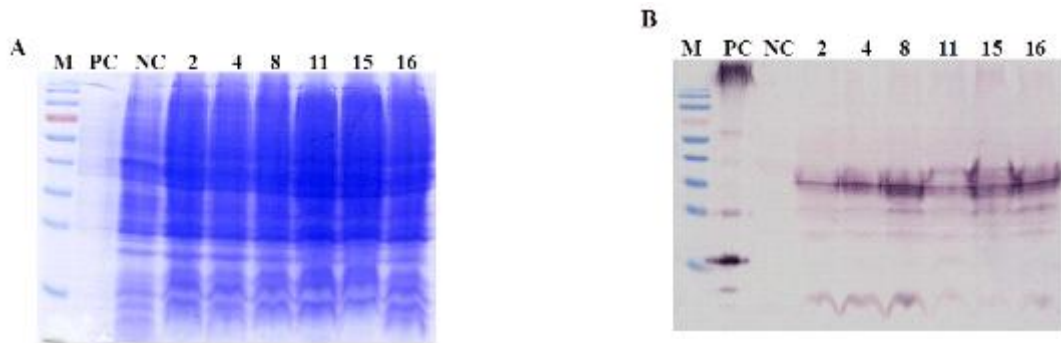


그림 73. Western-blot analysis of heterologous S1D protein in transgenic rice calli. Protein extracts were separated by SDS-PAGE (A) and analyzed by Western blotting (B) using mouse anti-S1D antibody as primary antibody to detect S1D antigen. M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, S1D antigen expressed in *E. coli*; 2~16 transgenic rice calli.

S1D-Co1 (pMYV767) 항원유전자로 형질전환된 캘러스 중에 Northern blot 분석 결과 mRNA의 발현이 강한 캘러스를 선발하여 수행한 western blot 분석 결과는 #1, 5, 6, 8, 10, 13에서 비슷한 수준의 band의 강도를 보여주었고 control에 비해서 크기가 큰 위치에서 확인하였다 (그림 74).

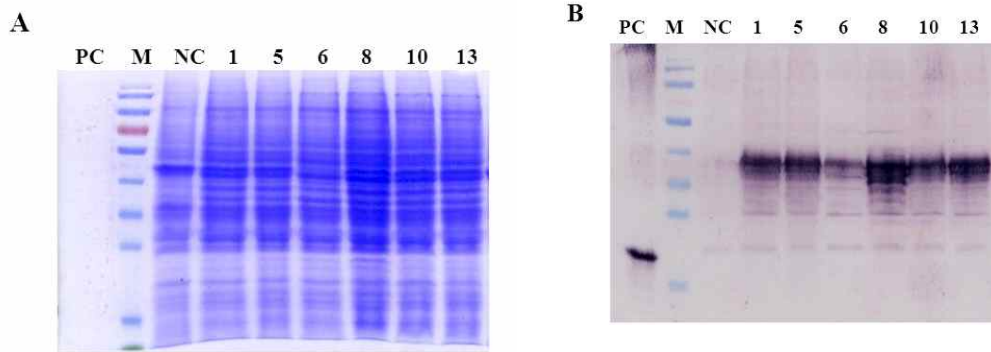


그림 74. Western-blot analysis of heterologous SID-Co1 fusion protein in transgenic rice calli. Protein extracts were separated by SDS-PAGE (A) and analyzed by Western blotting (B) using mouse anti-SID antibody as primary antibody to detect SID antigen. M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, SID antigen expressed in *E. coli*; 1~13: transgenic rice calli.

SID-LL37 (pMYV797) 항원유전자로 형질전환된 캘러스 중에 Northern blot 분석 결과 mRNA의 발현이 강한 캘러스를 선발하여 수행한 western blot 분석 결과는 #1, 5, 6, 8, 10, 13에서 비슷한 수준의 band의 강도를 보여주었고 control에 비해서 크기가 큰 위치에서 확인하였다 (그림 75).

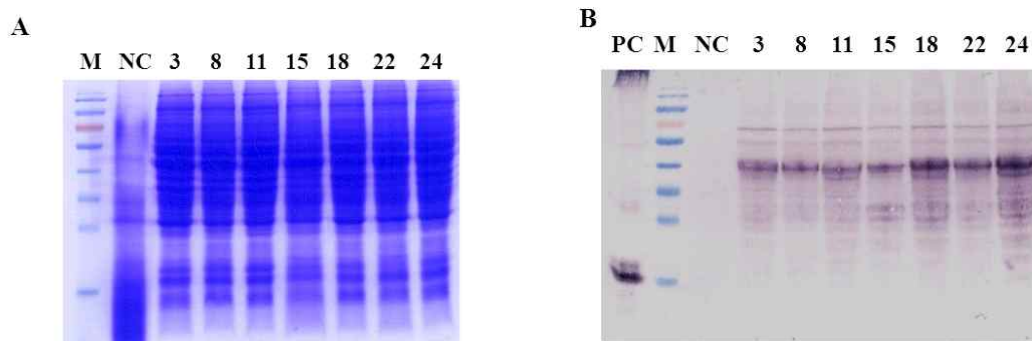


그림 75. Western-blot analysis of heterologous SID-LL37 fusion protein in transgenic rice calli. Protein extracts were separated by SDS-PAGE (A) and analyzed by Western blotting (B) using mouse anti-SID antibody as primary antibody to detect SID antigen. M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, SID antigen expressed in *E. coli*; 3~24: transgenic rice calli.

SID 항원단백질은 7개의 N-glycosylation 부위가 존재하여 단백질의 크기가 큰 위치에서 확인된 것으로 보임. N-glycosylation을 확인하기 위하여 SID와 SID-Co1 항원단백질을 deglycosylation enzyme (PNGase, Endo F1와 Endo H)를 이용하여 확인한 결과 효소 처리 후에 항원단백질이 박테리아에서 분리한 단백질과 유사한 위치에서 확인된 것으로 보아 N-glycosylation 된 것으로 확인하였다 (그림 76)



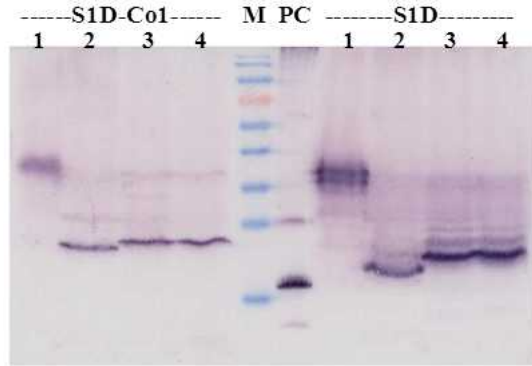


그림 76. Analysis of N-glycosylation of S1D and S1D-Co1 with deglycosylation enzymes. M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, S1D antigen expressed in *E.coli*; 1: untreated; 2: PNGase F; 3: Endo F1; 4: Endo H.

(5) 식물세포 현탁배양에서 시간에 따른 항원단백질의 발현

항원단백질의 고발현을 보이는 형질전환 벼의 캘러스를 선발하여 식물세포 현탁 배양을 구축하고 항원단백질의 발현을 유도한 후 시간에 따른 발현 정도를 확인하였다.

S1D (pMYV725) 항원단백질을 발현하는 lines 중에 고발현을 보이는 pMYV725 #15과 #16를 가지고 세포현탁배양을 구축하고 항원단백질의 발현을 유도한 후에 시간별로 발현을 확인한 결과 유도 후 4 일째에 항원단백질의 고발현을 확인하였다 (그림 77).

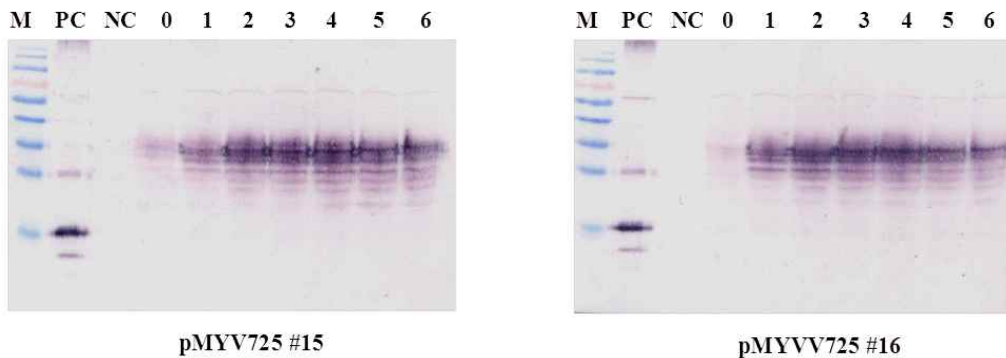


그림 77. Time-course Western-blot analysis of heterologous S1D protein in transgenic rice calli lines #15 and #16. M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, S1D antigen expressed in *E.coli*; 0~6: days after induction.

S1D-Co1 (pMYV767) 항원단백질을 발현하는 lines 중에 고발현을 보이는 pMYV767 #5과 #8를 가지고 세포현탁배양을 구축하고 항원단백질의 발현을 유도한 후에 시간별로 발현을 확인한 결과 유도 후 7과 9 일째에 항원단백질의 고발현을 확인하였다 (그림 78).

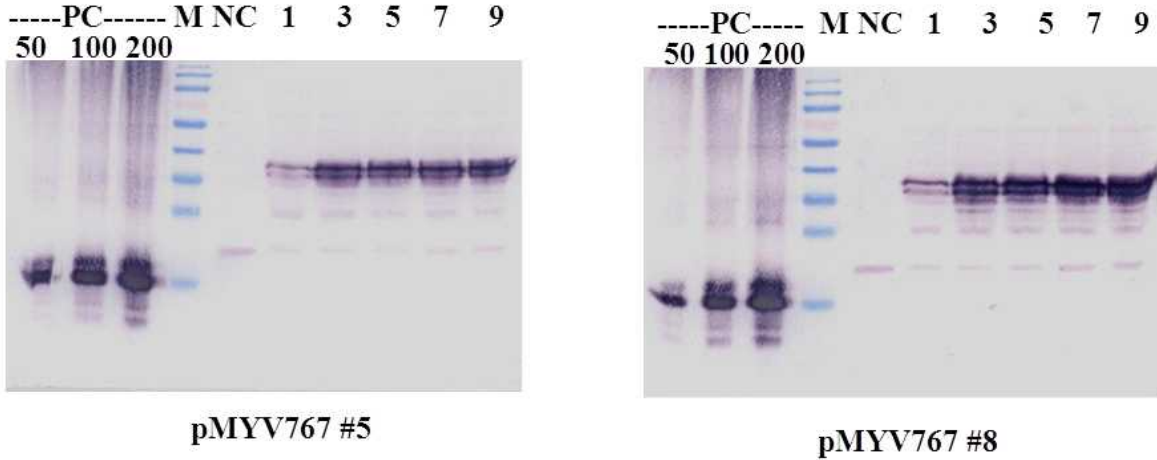


그림 78. Time-course Western-blot analysis of heterologous S1D-Co1 fusion protein in transgenic rice calli lines #5 and #8. M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, S1D antigen expressed in *E. coli* with the known amount 100, 200 and 300ng; 1~9: days after induction.

S1D-LL37 (pMYV797) 항원단백질을 발현하는 lines중에 고발현을 보이는 pMYV767 #18과 #24를 가지고 세포현탁배양을 구축하고 항원단백질의 발현을 유도한 후에 시간별로 발현을 확인한 결과 유도후 3과 5 dpi에서 항원단백질의 고발현을 확인하였다 (그림 79).

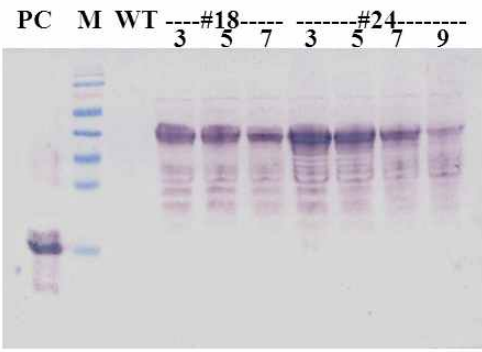


그림 79. Time-course Western-blot analysis of heterologous S1D-LL37 fusion protein in transgenic rice calli lines #18 and #24. M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, S1D antigen expressed in *E. coli*; 3~9:days after induction.

(6) *N. benthamiana*에서 vaccum agroinfiltration 방법을 이용한 S1CD, S1CD-Co1 항원유전자의 발현

pMYV8019 (S1CD)와 pMYV8010 (S1CD-Co1) 식물발현벡터를 포함하고 있는 Agrobacterium을 이용하여 항원단백질을 대량생산하기 위한 방법으로 vaccum agroinfiltration 방법을 이용하여 S1CD와 S1CD-Co1 항원단백질의 발현을 확인하였다.

pMYV8010 (S1CD-Co1) 항원유전자의 시간에 따른 항원단백질의 발현을 확인한 결과 3일째에 항원단백질의 고발현을 확인하였다 (그림 80)

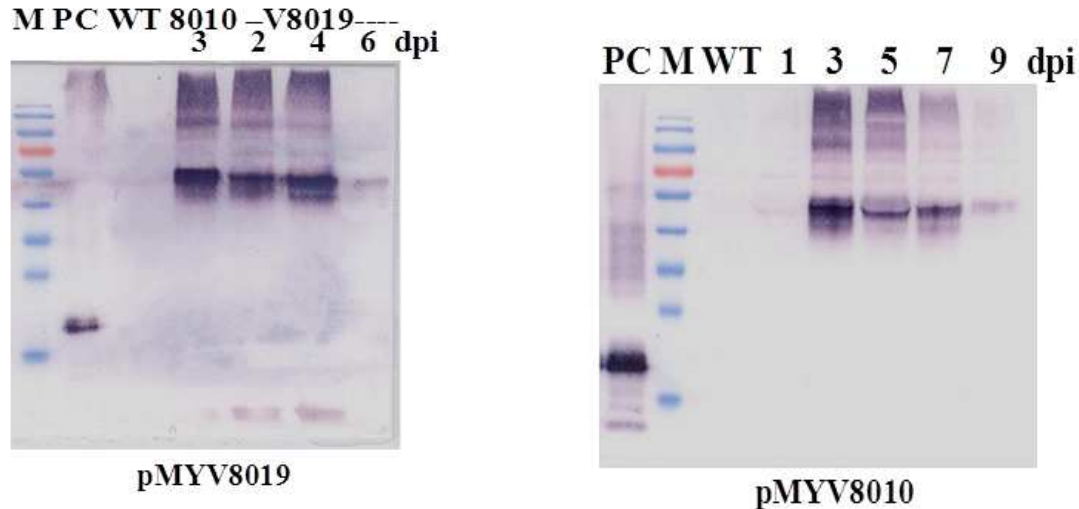


그림 80. Western-blot analyses of transiently expressed S1CD (pMYV8019) protein and S1CD-Co1 (pMYV8010) fusion protein in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves using vacuum agroinfiltration. Western blotting was conducted using mouse anti-S1D antibody as primary antibody to detect S1CD and S1CD-Co1 antigen. Infiltrated leaf dics were sampled at 1-9 days post-infiltration (dpi). M represents the prestained SDS-PAGE standards; PC, S1D antigen expressed in *E. coli*.

(라) 벼에서 발현된 S1D, S1D-Co1와 S1D-LL-37 항원단백질의 동물실험

S1D (pMYV725 #15), S1D-Co1(pMYV767 #8)과 S1D-LL37 (pMYV797) 항원단백질을 고 발현을 보이는 벼의 캘러스를 선발하여 동물실험을 위한 시료 확보를 위한 대량생산을 위하여 식물세포배양을 구축하였다.

항원단백질에 따라 유도 조건을 달리하여 항원단백질 발현을 유도하여 진공 pump를 이용하여 벼의 캘러스를 수확하였고 이를 blender를 이용하여 캘러스를 부순 후에 PBS 버퍼를 이용하여 단백질을 추출한 후에 ammonium sulfate를 첨가하여 단백질을 침전시켰음. 침전된 단백질을 PBS 버퍼를 이용하여 투석을 실시하여 동물실험에 이용할 시료를 준비하였다.

Dong Yang Oriental company로부터 female BALB/c mice를 구입하였고 각각 5마리씩 4 그룹으로 분류하여 대조군, S1D, S1D-Co1과 S1D-LL37를 먹이는 그룹으로 분류하였음. 동물 실험은 그림 81의 계획에 따라서 10 주 동안 매주 경구적인 방법으로 시료를 쥐에 먹였다.

현재 계속 동물실험을 위하여 계속 먹이고 있고 S1D, S1D-Co1과 S1D-LL37를 먹인 쥐에서 4 주차에 혈액을 채취하여 박테리아에서 추출한 S1D 항원단백질에 대한 IgG 항체 유도에 대해서 ELISA를 이용하여 확인하였다.

S1D, S1D-Co1과 S1D-LL37 항원단백질을 먹인 그룹에 비해서 대조군에 비해서 S1D 항원단백질에 대해서 IgG 항체 유도를 확인하지 못하였다 (그림 82).

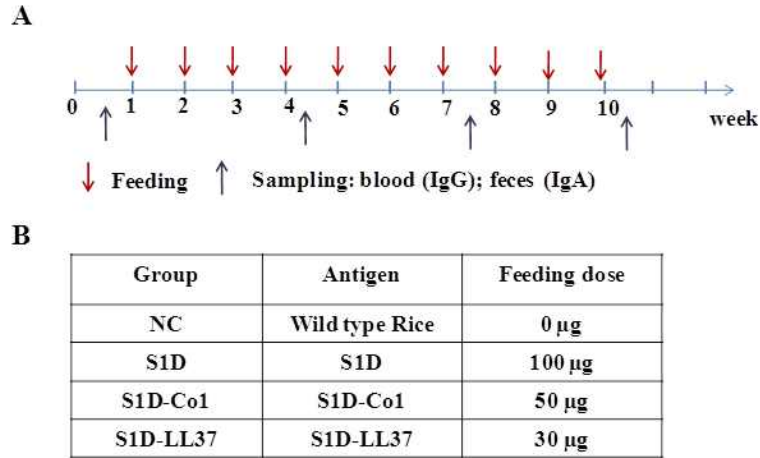


그림 81. Mouse feeding strategy with concentrated rice-based proteins. (A) Mouse feeding strategy. (B) Mouse groups and feeding dose. Rice calli expressing S1D, S1D-Co1 and S1D-LL37 fusion proteins were extracted and precipitated by ammonium sulfate for mouse feeding. Each mouse in the experimental group (n=5) was gavaged with 2 ml of PBS buffer containing the appropriate amount of antigen with 1 week intervals.

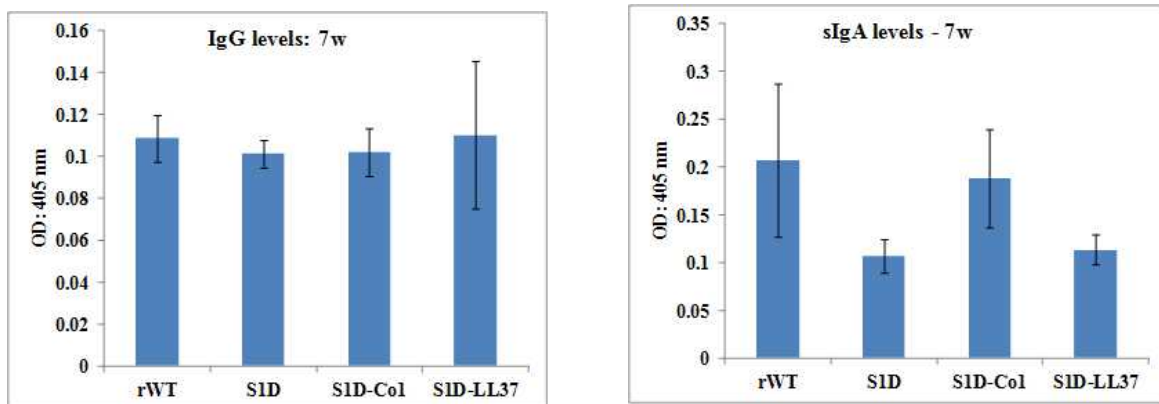


그림 82. Detection of S1D-specific antibody in immunized mice after feeding 7 weeks with precipitated rice extracts containing S1D, S1D-Co1 and S1D-LL37 determined by ELISA.

(마) *N. benthamiana*에서 발현된 S1CD, S1CD-Co1 항원단백질의 동물실험

동물실험을 위하여 S1CD (pMYV8010)와 S1CD-Co1 (pMYV8019)의 plasmid를 포함하고 있는 *Agrobacterium*을 이용하여 agroinfiltration 방법을 이용하여 *N. benthamiana* 잎에서 발현을 시킨 후에 잎을 수확하여 단백질을 추출하였고 ammonium sulfate를 첨가하여 단백질을 침전시키고 냉동건조하여 농축한 후에 PBS buffer로 희석하여 동물 실험에 사용하였다.

Mouse feeding with infiltrated *N. benthamiana* powder

Groups	Constructs	Feeding amount	Mouse number
Bs1-I	WT	200 mg	5
Bs1-II	V8019 (S1CD)	200 mg (~50 ug)	5
Bs3-III	V8010 (S1CD-Co1)	200 mg (~50 ug)	5
	Total		15mice

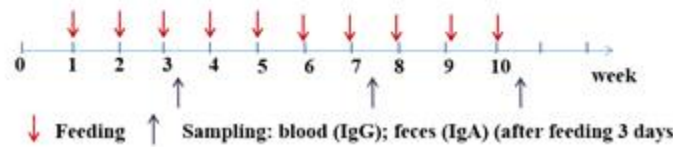
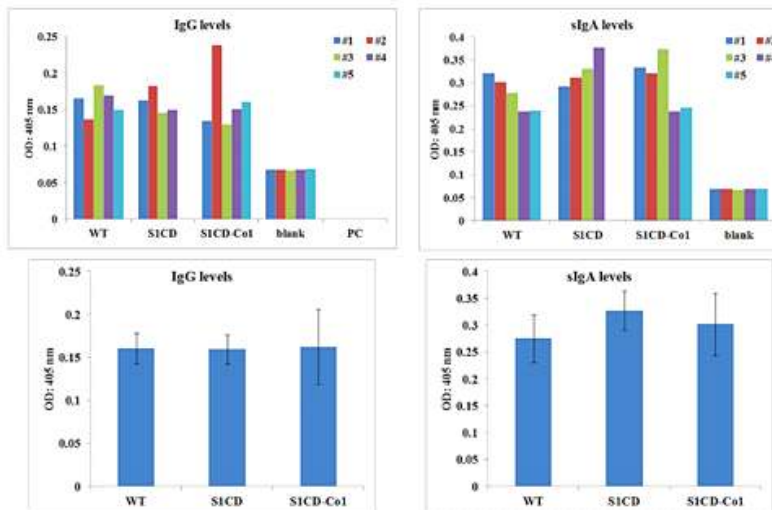


그림 83. 동물실험 그룹과 투여 방법

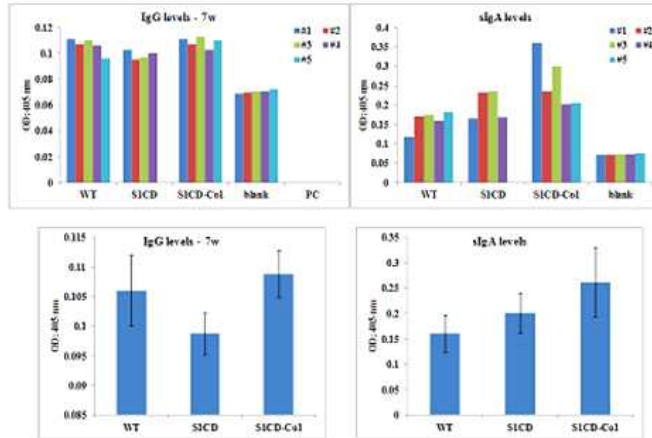
Dong Yang Oriental company로부터 female BALB/c mice를 구입하였고 각각 5마리씩 4 그룹으로 분류하여 대조군, S1CD와 S1CD-Co1를 먹이는 그룹으로 분류하였다. 동물 실험은 그림 83의 계획에 따라서 10 주 동안 매주 경구적인 방법으로 시료를 쥐에 먹였다.

항원단백질 4 주, 10 주 먹인 S1CD와 S1CD-Co1 항원단백질을 먹인 그룹에서는 대조군과 비슷한 IgG 항체 유도를 확인하였고 항원단백질을 7 주차 먹었을 때에 S1CD와 S1CD-Co1 그룹에서 대조군에 비해서 약간 높은 IgA에 대한 면역반응을 보였다 (그림 84).

Immune response in mouse feeding with lyophilized *N. benthamiana* powder containing S1CD and S1CD-Co1: 4w3d



Immune response in mouse feeding with lyophilized *N. benthamiana* powder containing S1CD and S1CD-Co1: 7w3d



Immune response in mouse feeding with lyophilized *N. benthamiana* powder containing S1CD and S1CD-Co1: 10w3d

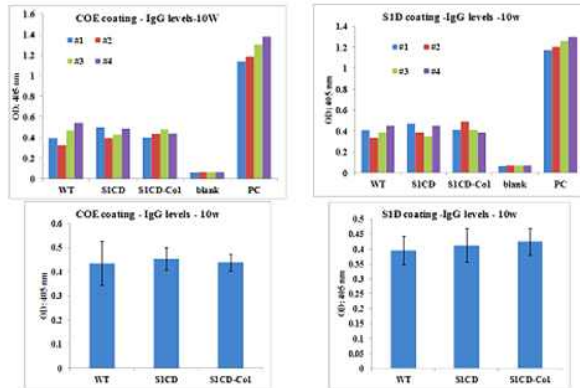


그림 84. 항원단백질을 먹인 쥐에서 면역반응 확인

5. PEDV 항원단백질을 발현하는 식물체를 이용한 목적동물 실험  
가. 연구목적

PEDV에 대한 항원단백질 (LTB-COE, pMYV110과 COE-Co1, pMYV733)을 발현한 쌀캘러서를 임신모돈에 경구 투여하여 모돈의 혈액과 초유에 PED 특이 항체의 생산을 검증하고 모체이행항체에 의한 분만자돈의 PED 바이러스 감염에 대한 방어효능을 평가하기 위하여 실시하였다.

나. 실험방법 및 재료

(1) 평가물질 및 바이러스

PED 바이러스(PEDV) 항원단백질을 enterotoxigenic *E. coli* heat-labile toxin의 B subunit와 결합한 항원단백질(LTB-COE, pMYV110)과 M cell targeting peptide Co1과 융합된 항원단백질 (COE-Co1, pMYV733)을 발현하는 2종의 쌀캘러스와 PEDV 항원단백질을 발현하지 않은 일반 쌀캘러서를 분말화하여 준비하였다.

쌀캘러스 발현 PEDV 항원단백질의 방어효능을 비교평가하기 위하여 일반적으로 농장에서 사용되고 있는 경구용백신을 구입하여 대조군으로 사용하기 위하여 준비하였다.

동물실험을 위해 2007년 분리된 PED 야외 분리 바이러스를 사용하였으며 본 동물실험



험에 사용되기 전에 7일 미만의 포유자돈에 접종하여 특이 병원성을 유발하는 것을 확인하였고 감염 포유자돈의 장내용물을 수거하여 정량 RT-PCR로 정량한 후 -80℃에 보관하였음.

다. 동물실험

(1) 임신모돈 평가 실험

8 마리의 분만 5주전 모돈을 4 그룹으로 2마리 씩 나누어 표1과 같이 PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스 및 일반 싼켈러스와 경구용 백신을 투여하였다. 싼켈러스 또는 백신 투여 전(0d)과 분만 3주 전(14d) 또는 분만 1주 후(42d)에 총 3회에 걸쳐 전 모돈에서 채혈을 실시하고 분만 직후 모든 모돈에서 초유를 채취하였다.

표 14. 임신모돈에 대한 평가물질 경구 투여

그룹	개체 수	처치
상용 Vaccine	2	일반 경구용 PED 백신을 분만 5주 및 3주 전 2회 급여
Wild	2	분만 5, 4, 3주 전에 일반 싼켈러스 3회(110g/회) 급여
V733	2	분만 5, 4, 3주 전에 COE-Co1 발현 싼켈러스 3회(110g/회) 급여
V110	2	분만 5, 4, 3주 전에 LTB-COE 발현 싼켈러스 3회(110g/회) 급여

(2) 분만자돈 평가 실험

8 마리의 모돈에서 분만된 자돈 중 모돈 당 5마리씩 총 40마리를 선별하여 5일간 정상적으로 초유를 섭취하도록 한 뒤 전체 40마리의 포유자돈을 전북대 동물실험축사에서 평가물질 투여 그룹 별로 10마리씩 4개의 돈방에 나누어 대용유(이지바이오)를 공급하며 사육하였다.

2일 후 모든 포유자돈에 PEDV의 RNA가  $1 \times 10^6$  copies/ml로 검출되도록 PBS로 희석한 장내용물을 자돈당 1 ml씩 경구투여 하였다. PED 바이러스 투여 전(0d)에 혈액과 분변을 채취하고 PED 바이러스 투여 후 3, 5, 7일에는 분변을 채취하고 바이러스 투여 10일 후에 생존한 모든 포유자돈을 안락사한 후 부검을 실시하였다.



그림 85. 분만자돈의 동물실험축사 입사



그림86. 분만자돈의 대용유 급여

### (3) PEDV 정량 RT-PCR

채취한 분변을 PBS를 이용하여 30% 유제로 준비한 후 MagMax<sup>®</sup> Total Nucleic Acid Isolation Kit(Applied Biosystems)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 PED 바이러스의 nucleocapsid 유전자를 타겟으로 하는 정량 RT-PCR을 AgPath-ID<sup>™</sup> One-Step RT-PCR Kit(Applied Biosystems)를 이용하여 실시하고 PED 바이러스를 정량적으로 검출하였다.

### (4) COE 및 LTB에 대한 ELISA

COE 및 LTB 항원단백질 또는 두 항원을 생산하기 위해 사용한 대장균 벡터인 BL21 대장균 항원(LB broth에서 16시간 배양 후 10분간 sonication하여 원심분리 후 상층액을 수거)을 각각 100 ng의 농도로 0.01 M carbonate buffer (pH= 9.6, Pierce)를 이용하여 코팅한 plate를 이용하여 모든의 혈액과 초유의 COE 및 LTB 특이 IgG를 검출하였다.

즉, 채취한 혈청 또는 초유는 PBS로 1:50 또는 1:5로 각각 희석한 뒤 항원 코팅 plate에서 한 시간 배양한 후 세척하고 horseradish peroxidase(HRP)가 레이블되어 있는 anti-swine IgG 단클론항체를 1:10000의 농도로 첨가하여 한 시간 동안 배양하고 세척 후에 TMB로 발색하였다. 20분 동안 발색 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 정지시키고 480 nm에서 optical density(OD)를 측정하였다.

COE 및 LTB를 코팅한 well의 OD 값에서 BL21항원을 코팅한 well의 OD 값을 뺀 OD차이(OD diff)값을 계산하여 COE 또는 LTB 특이 IgG 농도를 측정하였다.

### (5) PEDV nucleocapsid antibody ELISA

PEDV nucleocapsid 특이 항체를 검출하는 PEDV ELISA Kit (QAYEE-BIO)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 모든의 혈액 및 초유와 포유자돈의 혈액을 검사하였다. 즉, 혈청 및 초유는 sample diluent로 1:5 또는 1:2로 희석한 후 50  $\mu$ l를 항원이 코팅된 plate에 넣고 곧 바로 HRP가 레이블되어 있는 anti-swine IgG mouse 단클론항체 50  $\mu$ l를 추가로 첨가한 후 1시간 동안 배양함. 세척액으로 5회 세척 후 50  $\mu$ l의 chromogen solution A와 50  $\mu$ l의 chromogen solution B를 plate에 첨가하고 10분간 발색하였다. Stop solution을 첨가하여 발색을 정지 시킨 후 450 nm에서 OD를 측정하였다.

## 라. 실험결과

### (1) 모든의 경구투여 전 후의 COE 및 LTB 특이 항체가의 변화

모든에서 채취한 혈액과 초유의 COE 및 LTB 특이 항체가를 측정하였다. 측정결과 혈액과 초유 모두에서 의미있는 수준의 COE 항체가 검출되지 않았으나 LTB 특이 항체가의 경우는 LTB-COE (pMYV110)과 COE-Co1 (pMYV733)의 PEDV 단백질을 발현한 싼캘러스를 급여한 모든들의 혈액과 초유에서 LTB 특이 항체가가 검출되었다 (그림 87과 88).

특히 LTB-COE (pMYV110)을 급여한 모든들에서 가장 높은 LTB 특이 항체가가 검출되었으며 COE-Co1 (pMYV733)을 급여한 모든에 비해서도 훨씬 높은 수준의



LTB 항체가 검출되었다 ( $p < 0.001$ ).

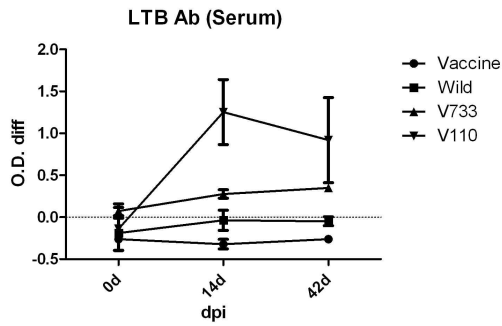


그림 87. 모돈의 경구투여 전 후의 혈액 LTB 특이 항체가

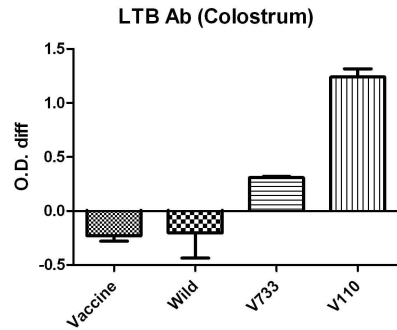


그림 88. 모돈의 경구투여 전 후의 초유 LTB 특이 항체가

(2) 모돈의 경구투여 전 후의 PEDV 특이 항체가의 변화

모돈에서 채취한 혈액과 초유의 PEDV 특이 항체가를 PEDV nucleocapsid 특이 항체를 검출하는 ELISA를 이용하여 검출하였다. 모돈에 백신 또는 PEDV 항원단백질 발현 신피켈러스를 경구 투여한 후 2주 후에 PEDV 특이 항체가가 검출되기 시작하였으며 경구 투여 6주(42d) 후에 백신과 LTB-COE (pMYV110) 항원단백질 투여 모돈의 항체가가 특히 계속 증가하는 것으로 보였고 COE-Co1 (pMYV733) 항원단백질 투여 모돈은 2주에 가장 높은 수준의 항체가를 보인 후 6주에도 비슷한 수준의 높은 항체가를 보여 전체 그룹 중에서 가장 높은 수준의 PEDV 특이 항체가가 검출되었다(그림 89).

비슷하게 V733를 투여한 모돈에서 채취한 초유에서 가장 높은 수준의 PEDV 특이 항체가가 검출되었고 백신과 V110을 투여한 모돈의 초유에서는 서로 비슷한 수준의 항체가를 보였고 일반 신피켈러스를 투여한 모돈(Wild 그룹)과 비교해서 높은 수준의( $p < 0.05$ ) 항체가를 보였다 (그림 90).

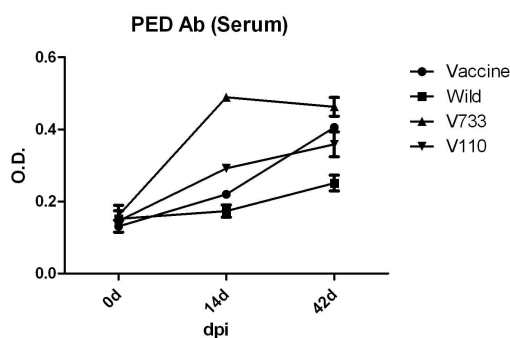


그림 89. 모돈의 경구투여 전 후의 혈액 PEDV 항체가

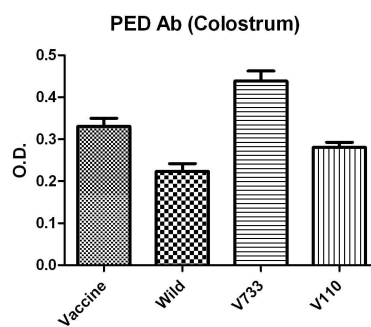


그림 90. 모돈의 경구투여 전 후의 초유 PEDV 항체가

(3) 분만자돈의 PED 공격접종 후 임상증상 및 폐사율

백신 또는 PEDV 항원단백질 발현 및 비발현 신피켈러스를 급여한 모돈들에서 분만된 자돈 40마리에 대한 야외 PEDV를 이용한 공격접종을 실시하였다. PEDV 공

격접종 2일 후부터 설사하는 개체들이 관찰되기 시작하였고 3일에는 모든 그룹의 자돈들에게서 설사가 관찰되었고 실험이 종료된 10일까지도 설사가 계속 진행되었다.

일반 싯켈러스와 LTB-COE 항원단백질 (pMYV110) 싯켈러스를 급여한 모돈에서 분만된 자돈 중 2마리 또는 1마리의 자돈이 공격접종 3일 후에 폐사하였고 COE-Co1 항원단백질 (pMYV733) 싯켈러스를 급여한 모돈에서 분만된 자돈 중 1마리가 4일 후에 폐사하였고 백신을 접종한 모돈에서 분만된 자돈들에서는 5일 후에 2마리가 최초로 폐사하였다(표 15).

실험이 종료된 10일 이전까지 일반 싯켈러스 급여 그룹(Wild그룹)의 자돈 중 7마리가 폐사 되어 70%의 폐사율을 보였으며 백신그룹과 COE-Co1 항원단백질 (pMYV733) 그룹에서는 각각 4마리의 자돈이 폐사하여 40%의 폐사율을, LTB-COE (pMYV110) 그룹은 5마리의 폐사가 관찰되어 50%의 폐사율이 관찰되었다.

또한 Wild과 LTB-COE 항원단백질 (pMYV110) 그룹의 자돈의 폐사는 3일부터 꾸준히 관찰되는 반면 백신과 LTB-COE 항원단백질 (pMYV733) 그룹은 5일 후에 대부분의 폐사가 집중되는 양상을 보였다.

표 15. 분만자돈의 PEDV 공격접종 후 폐사율

그룹	개체 수	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	합계	폐사율 (%)
Vaccine	10	0	0	0	2	0	1	1	0	4	40
Wild	10	0	2	1	1	1	1	1	0	7	70
COE-Co1	10	0	0	1	1	1	1	0	0	4	40
LTB-COE	10	0	1	0	1	2	1	0	0	5	50

#### (4) 분만자돈의 PEDV 공격접종 후 분변의 PEDV 배출량 측정

백신 또는 PEDV 항원단백질 발현 및 비발현 싯켈러스를 급여한 모돈들에서 분만된 자돈 40마리에 대한 야외 PEDV를 이용한 공격접종을 실시하고 공격접종 전(0d) 및 3일, 5일 또는 7일 후에 모든 자돈의 분변을 직장에서 채취하였다.

채취한 분변에서 RNA를 추출하여 정량 RT-PCR로 PEDV의 RNA를 검출한 결과 3일까지는 모든 자돈에서 약  $10^6$  copies/ml의 RNA가 검출되었다. COE-Co1 항원단백질 (pMYV733) 그룹은 공격접종 5일 후에  $10^5$  copies/ml 전 후의 RNA가 검출되어 약간의 감소가 관찰되다가 7일에는  $10^2$  copies/ml의 PEDV RNA가 검출되어 비교 그룹 중 가장 낮은 PEDV의 배출이 관찰되었다. LTB-COE 항원단백질 (pMYV110)그룹 또한 7일에  $10^4$  copies/ml 전 후의 RNA가 검출되어 백신과 Wild그룹과 비교해 다소 낮은 수준의 PEDV의 배출이 관찰된 반면 백신과 Wild그룹의 자돈에서는 7일까지도  $10^5$  copies/ml 전 후의 RNA가 검출되어 5일의 배출량( $10^6$  copies/ml) 보다 바이러스 배출이 다소 감소되었으나 여전히 높은 수준의 바이러스 배출이 관찰되었다(그림 91).

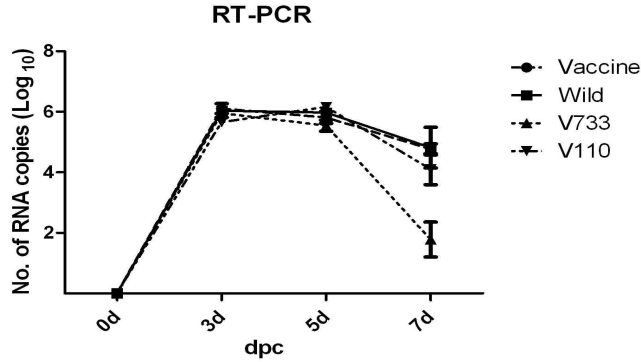


그림 91. 분만자돈의 PEDV 공격접종 후 분변의 PEDV 배출량

(5) 분만자돈의 PEDV 특이 항체가 측정

백신 또는 PEDV 항원단백질 발현 및 비발현 싼켄러스를 급여한 모돈들에서 분만된 자돈 40마리에 대한 야외 PEDV의 공격접종 전에 채혈을 실시하여 분만 자돈의 모돈에서 이행된 PEDV 특이 항체가를 측정하였다.

COE-Co1 항원단백질 (pMYV733)그룹의 자돈들에게서 가장 높은 수준의 항체가가 검출되었으며 Wild그룹과 백신 및 LTB-COE 항원단백질 (pMYV110)그룹과 비교하여서도 유의성 있는( $p < 0.05$ ) 높은 수준의 PEDV 특이 항체가가 검출되었다. LTB-COE 항원단백질 (pMYV110)과 백신그룹은 서로 유사한 수준의 PEDV 특이 항체가가 관찰되었고 Wild그룹과 비교하여 유의성 있는( $p < 0.05$ ) 높은 수준의 항체가가 검출되었다(그림 92).

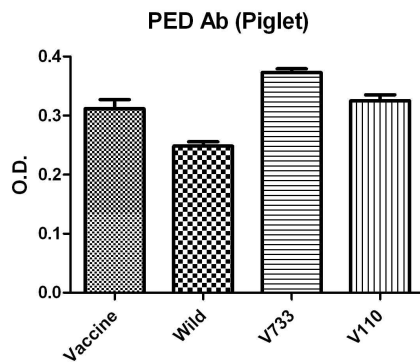


그림 92. 분만자돈의 PEDV 특이 항체가

(6) 분만자돈의 PEDV 공격접종 후 부검 결과

폐사 자돈은 폐사 직후 부검을 실시하고 생존 자돈들은 공격접종 10일 후에 모두 안락사 뒤 부검을 실시하였다. 폐사돈을 포함한 모든 그룹의 자돈에서 소장 전반적인 용모 상실이 관찰되었고 PEDV 특이적인 수양성 설사를 보이는 것으로 관찰되었으며 그룹간의 유의성 있는 병변의 차이는 관찰되지 않았다(그림 93).

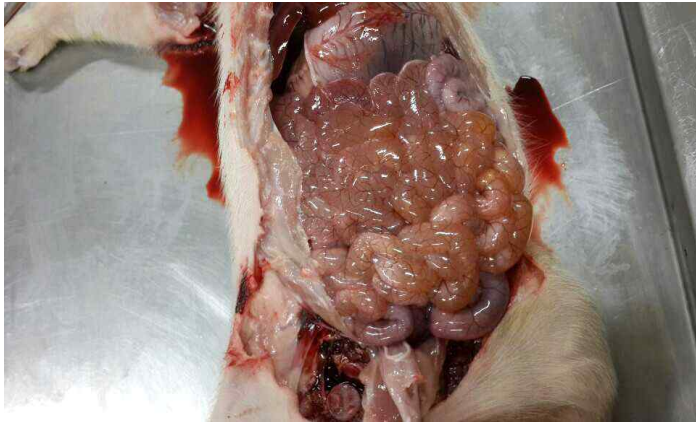


그림 93. 분만자돈의 소장에서 PEDV 특이 병변 관찰

#### (7) 결론 및 고찰

PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스를 공급한 모돈들에서 일반 싼켈러스와 상용 PEDV 백신을 급여한 모돈들에서 발견되지 않은 LTB 특이 항체가 검출되는 것이 관찰되었고 (그림 87) 또한 PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스를 공급한 모돈들에서 상용백신을 투여한 모돈과 비슷한 수준 또는 보다 높은 수준의 PEDV 특이 항체가 검출되었으므로 PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스의 특이 항체유도 효과가 동물실험을 통해 확인되었다(그림 89).

모돈 분만 직후 채취한 초유를 검사한 결과, PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스를 공급한 모돈들에서 일반 싼켈러스를 급여한 모돈들에서 발견되지 않은 LTB 특이 항체와 PEDV 항체가 검출되는 것으로 보아(그림 88와 90) 모돈에서 형성된 항체는 초유에 분비가 되며 분만 후 5일간의 초유섭취를 통해 자돈들에게 전달이 되는 것으로 확인되었다(그림 90).

PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스를 공급한 모돈들 또는 일반 싼켈러스와 상용 PEDV 백신을 급여한 모돈들에서 분만된 40마리의 자돈을 대상으로 PEDV를 공격 접종한 결과, 모든 자돈에서 비슷한 양상의 설사를 포함한 임상증상과 병변(그림 92)이 관찰되었으나 PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스를 공급한 모돈들에서 분만된 자돈들에게서 보다 낮은 수준의 폐사율이 관찰되었고(표 15) 공격접종 5일 또는 7일에 보다 낮은 수준의 분변을 통한 바이러스 배출율이 검출되는 것으로 보아(그림 91) PEDV 감염의 피해를 일부 줄여 줄 수 있는 것으로 판단된다.

단, PEDV 항원단백질을 발현한 싼켈러스를 공급한 모돈들에서 분만된 자돈들에서의 평가결과가 PEDV 예방을 위해 농장에서 많이 사용되고 있는 상용백신을 투여한 모돈들에서 분만된 자돈들과의 평가결과와 비교했을 때 비슷한 수준의 방어효과가 관찰되는 것으로 보아 본 동물실험에서 사용한 PEDV의 공격접종 농도( $1 \times 10^6$  copies/ml)가 일반적인 감염 수준보다 높은 것을 감안한다면 보다 낮은 수준의 공격접종을 실시할 경우 방어효과에 대한 평가가 보다 좋아질 수 있을 것으로 예상된다.

6. 형질전환 벼의 주요 농업적 특성 분석을 위한 포장 실험

선발된 형질전환 벼 포장시험은 경상북도 군위군 효령면 소재 경북대학교 부속실험실 습장 내의 농촌진흥청 지정 “GMO 벼 특성 평가 포장” 에서 2013년도 하계에 수행되었다. 이 연구에서 공시된 재료는 항원유전자의 copy 수가 한 개 또는 두 개로 확인된 LTB-COE 항원유전자를 벼에 형질전환하여 재분화된 M0식물체로부터 M2세대까지 격리온실에서 Single Seed Descent 방법으로 육성시키며, 형질전환 유전자의 발현량이 높고 계통 내의 각 개체들이 모두 고정된 총 5계통을 선발 공시하였다 (표 16).

Table 16. Major agronomic characteristics of 5 selected transformants of rice under field condition.

No	Lines	Heading date (M.D)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Sterility Segregation
1	V110 #7(pUbi, LTB-COE)	8.20	76	23	++
2	V743 #7(pUbi, LTB-COE)	8.21	74	23	++++
3	V110 #6-4(pUbi, LTB-COE)	8.21	76	23	++
4	V110 #3-3(pUbi, LTB-COE)	8.21	75	23	++++
5	V109 #6-7(pRamy1A, LTB-COE)	8.21	74	22	+++++
	Wild(Dongjin)	8.21	76	24	-

선발된 5개 M3계통 및 대조품종인 모품종 동진벼를 5월 3일에 파종하여 6월 1일에 재식밀도를 30 x 15cm로 1주 1본씩 1계통 당 20주를 이양 재배하였다. 시비량 및 시비방법은 경북대학교 육종포장 표준방법에 따라 시용하였으며 모든 계통이 등숙 할 때까지 담수 상태를 유지하였다.

주요생육시기별 주요농업 특성은 모든 계통에 대하여 개체별로 출수기, 간장(지면에서 이삭목까지의 길이) 및 수장(이삭길이), 임성 및 등숙정도(불임성정도) 등을 조사하여 평균으로 산출하였으며, 각 계통 중에서 대조품종인 모품종 동진벼와 거의 비슷한 특성을 나타내는 5개체를 최종 선발 수확하였으며, 탈곡 후에 현미를 내어 현미의 특성을 조사하였다.

주요생육시기별 주요농업 특성은 표16, 그림 94 및 그림 95와 같다. 그림95에서 보는 바와 같이 생육초기부터 출수 직전(8월 16일)까지 생육전반기에서는 형질전환 계통간에 모두 대조구인 모품종 동진벼와 생육특성이 거의 비슷하였다.

그러나 출수기(8월 21일) 직후(8월 26일)부터 등숙초기인 유숙기(9월 3일)에 이르면서 개체별로 불임성 정도의 차이가 나타나면서 등숙에 따라 나타나는 “이삭숙임” 정도가 개체별로 차이를 보이기 시작하였다(그림 96).

그 후 성숙기에는 이삭숙임 정도에 따라 불임성이 없이 정상적으로 등숙한 개체와 불임성을 보이는 개체를 뚜렷이 구분할 수 있었다. 형질전환 계통 간에는 1번과 3번 계통이 비교적 불임성 개체가 적은 반면, 2번, 4번 및 5번 계통에서는 불임성 개체가 상대적으로 많았다. 성숙기에 최종적으로 불임성이 없이 정상적으로 등숙한 개체를 각 형질전환 계통별로 5개체씩만을 선발 수확하였다.



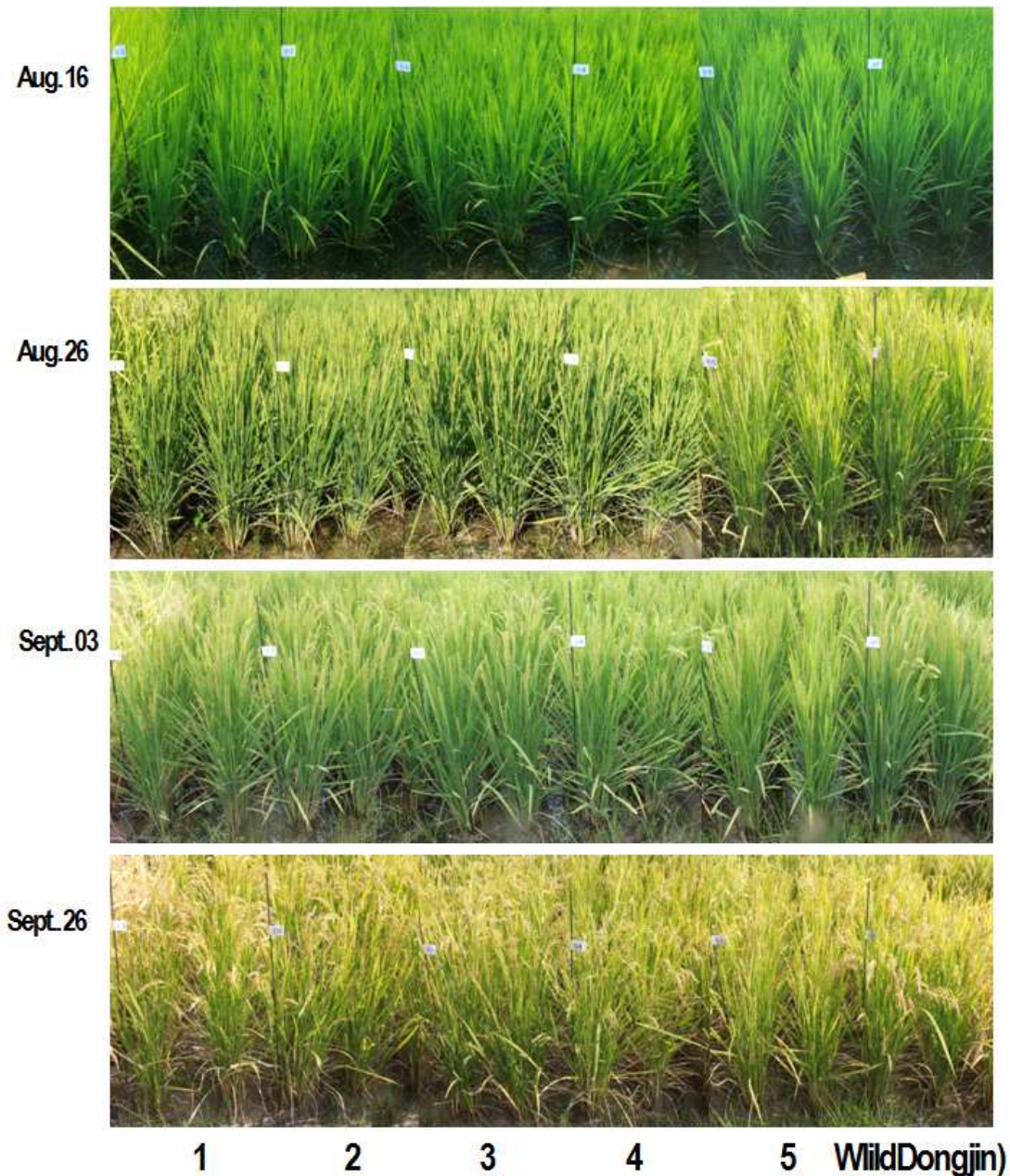


그림 94. Photographs of agronomic characteristics of 5 selected transformants of rice at four heading-maturing stages under field conditions.

모든 식물의 조직배양 혹은 형질전환체에서 불임성 등이 일반적으로 나타난다는 보고가 많이 있는데, 이러한 변이가 유전적 지배를 받는다는 것이 벼를 포함한 몇몇 작물에서 알려져 있고, 벼의 불임성 현상에는 여러 개의 유전자가 복잡하게 관여하는 것으로 보고되고 있다.

이와 같이 불임성 정도의 변이가 심하게 나타나는 것이 등숙기의 기온 등 여러 환경 요인들과도 관련이 있을 것으로 생각되지만, 특히 형질전환 유전자의 염색체 삽입 위치, 삽입 유전자의 발현의 차이 등 여러 가지 유전적 인자들이 복합적으로 작용하는 것으로 생각되었다. 한편 이 원인을 밝히고 이를 개선하기 위한 여러가지 연구가 수행되어지고 있지만

아직도 그 효율이 크게 개선되지 않고 있어서 육종현장에서는 각 세대를 통하여 정상적인 계통을 선발하는 방향으로 진행되고 있어 본 연구에서도 이와 같이 정상개체를 선발하였다.



그림 95. Difference of sterility characteristics within lines of selected transformants of rice at milky stages under field conditions

### 제 3 절 능성 어류 노다 바이러스 예방 백신용 담배 신품종 개발

(제 1 핵심 제 2세부과제- (주) 젠닥스)

#### 1. 노다바이러스 예방 백신용 신품종 담배 개발

가. 노다바이러스 coat protein 유전자 분리 및 재조합단백질 생산

##### (1). 유전자 분리

노다바이러스는 신경친화성 single stranded positive-sense RNA 바이러스로 뇌 및 척추내 신경에 병변을 일으켜 특이적인 신경증상 (선회 또는 돌발적 유영과 척추만곡등의 증상)이 나타난다. 이러한 증상을 보이는 개체를 구입, 선별하여 실험에 이용하였다.



감염개체의 뇌, 비장, 신장으로 부터 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. Prokaryotic expression system에 맞도록 대장균 발현을 위한 BL21 균주 (Invitrogen, USA) 및 pRSET vector (Invitrogen, USA)를 적용하였고, GenBank에 등록된 노다바이러스 coat protein 유전자 정보 (GenBank #AY324870)를 이용하여 coat protein-specific primer set를 아래 표1과 같이 합성하였다.

표 1. Primers used in this study for cloning of nodavirus coat protein gene

Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Restriction enzyme
coat-F	ATAT <u>CTCGAG</u> * ATGGAGACCCACTTGTATGG	XhoI
coat-R	ACAC <u>AAGCTT</u> * TTGGGCGACCGTGTAGCCGG	HindIII

\* Underlined: restriction enzyme sites

분리된 total RNA를 이용하여 reverse primer를 첨가하고 SuperScript® III Reverse Transcriptase (RT, Invitrogen)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 위 2개의 primer set를 이용하여 coat protein 유전자를 증폭하였다 (PCR 조건은 94°C/5 분 pre-denaturation, 94°C/40 초-57°C/40 초-72°C/1 분으로 30 cycles, 최종 72°C/5 분 post-annealing 실시함). 증폭된 PCR산물을 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 이를 gel elution한 후 2개의 PCR 산물을 XhoI과 HindIII 제한효소로 처리하고 이를 동일한 효소로 처리된 pRSET vector에 cloning을 실시하였다.

즉, elution한 PCR산물 1 µl와 vector 3 µl에 T4 DNA ligase와 buffer를 첨가하여 37°C/1 h 반응 후 cloning용 대장균 JM109 (Invitrogen)에 형질전환 하여 ampicillin (Sigma) 첨가 선택배지에서 colony만을 선별하였다. 선별된 대장균을 5 ml의 LB broth에서 배양 후 miniprep을 실시하고 이 construct를 XhoI과 HindIII 제한효소로 처리하여 insert size를 확인하였다 (그림 1).



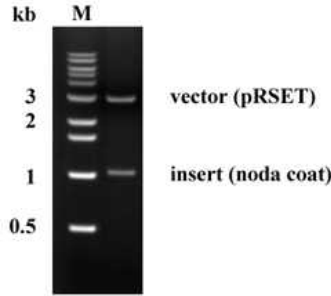


그림 1. Noda coat protein gene 클로닝 검증

Insert의 크기가 확인된 colony의 염기서열을 분석하여 frame-shift 없이 on-frame으로 insert가 삽입되었음을 확인하였다. sequence가 확인된 construct를 miniprep으로 준비하고 단백질 발현용 대장균 BL21에 형질전환을 실시하였다. 형질전환된 colony를 random으로 선택 후 30ml의 LB broth에 증균 후 IPTG로 단백질 발현을 유도하고 매 시간마다 1ml씩 sampling하여 SDS-PAGE에서 전개하고 Coomassie blue로 염색하여 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과, 아래 그림 2와 같이 약 50 kDa의 타겟 단백질 발현 1시간째부터 단백질의 발현이 확인되었다.

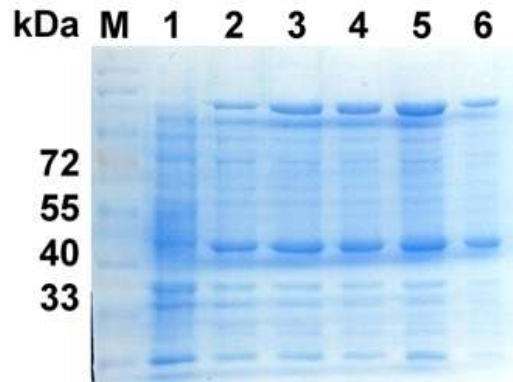


그림 2. IPTG로 발현 유도된 BL21의 단백질 발현 양상을 시간별로 확인. Lane 1: before induction, lane 2-6: 발현 1시간-5시간 시료. M: 단백질 size marker.

단백질 발현을 확인한 후 순수분리를 위하여 Ni<sup>2+</sup>-charged resin (Probond, Invitrogen)을 이용하여 단백질의 순수분리를 실시하였다. 그 결과 다른 단백질의 오염 없이 순수하게 단백질이 분리됨을 확인하였다 (그림 3).

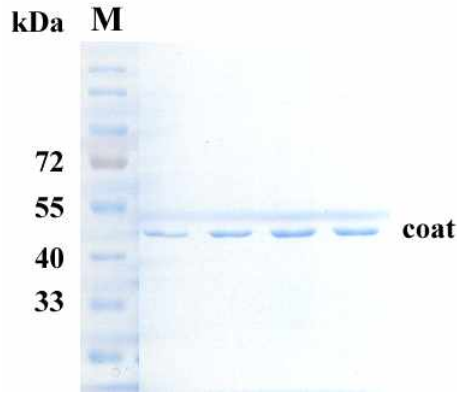


그림 3. 순수분리된 재조합 coat protein (SDS-PAGE)

(2). 노다바이러스 coat protein 항체생산

순수분리된 재조합 단백질을 항원으로 이용하여 anti-noda coat protein Ab를 생산하였다. 6주령 암컷 토끼 (New Zealand albino)에 재조합 항원 500 µg을 Freund's complete adjuvant 500 µl와 혼합 후 피하접종을 실시하였다. 그 후 2주 간격으로 동량의 항원에 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 2회 더 boosting을 실시하였고 최종 접종 후 7일 후 토끼를 희생하여 혈청을 분리하고 항원-항체반응을 ELISA로 확인하였다.

즉, 재조합 항원으로 coating된 ELISA plate (1 µg/ml, 90 µl씩 항원 coating 실시)를 1% BSA sol.로 blocking하고 1차 항체로는 토끼의 혈청을 1:500 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-rabbit HRP-labeled (1:5000)으로 이용하여 반응하고 발색을 한 다음 405 nm의 흡광도에서 ELISA reader로 측정하여 OD값의 차이가 항체의 생성으로 해석하였다. 그 결과, 음성 대조군은 OD값이 0.72 (±0.2)인 반면 실험군의 OD값은 2.77 (±0.07)로 통계적으로 매우 유의성 있게 높은 (P<0.001) 높은 항체를 형성하였음이 확인되었다.

나. 노다바이러스 항원단백질 유전자의 식물체 발현 최적화를 위한 코돈 최적화

색소체는 원핵생물 유래이므로 단백질 발현을 극대화시킬 수 있도록 원핵세포의 전사과정에 맞도록 코돈을 바꾸고 해당 염기서열을 합성하여야 한다. 노다바이러스 캡시드 유전자를 위해 단백질의 발현을 극대화 시킬 수 있도록 식물 색소체 유전자 전사과정에 맞도록 Graphical codon usage analyser program과 <http://www.kazusa.or.jp/codon>의 database를 활용하여 염기서열을 담배 색소체의 코돈에 맞게 최적화하였다 (그림 4).

코돈이 최적화된 노다바이러스 캡시드 유전자는 overlap extension PCR기법을 응용하여 합성하였다 (그림 5). 약 60 bp 길이로 Forward 방향의 13개의 프라이머와, Forward 프라이머와 약 20 bp정도 겹치도록 Reverse 방향으로 13개의 프라이머를 작성하였다. 8개의 프라이머 조합 (F1~F7, R2~R8)으로 95° C 5 분 동안 pre-denaturation; 30 cycles의 95° C 20 초 denaturation; 51° C 15 초 annealing; 72° C 30 초 extension; 그리고 95° C 5 분 final extension조건으로 PCR을 수행하여 약 340 bp 길이의 block1을 만들었다 (1st step). 똑같은 조건으로 block2, 3를 만든 후 3개의 PCR 반응산물들을 gel elution 한 후 동량의 비율로 혼합하여 template를 준비하였다.

1,042 bp의 전장 클론을 만들기 위해 template 2 ul, 10 pmole 농도의 F1, R26 프라이머 각각 1 ul, 2.5 mM dNTPs 2 ul, pyrobest DNA polymerase 0.3 ul (takara), 10 x PB buffer 2.5 ul를

넣고 총 반응액이 25 ul 되게 만들어서 95° C 5분; 30 cycle의 95° C 30 초, 50° C 30초, 72° C 1 분 30초 ; 95° C 5 분의 조건으로 2nd PCR을 수행하였다 (2nd step). 최종 증폭된 산물을 gel-elution한 후, pGEM T-easy 벡터로 클로닝하여 염기서열을 분석 확인하였다.

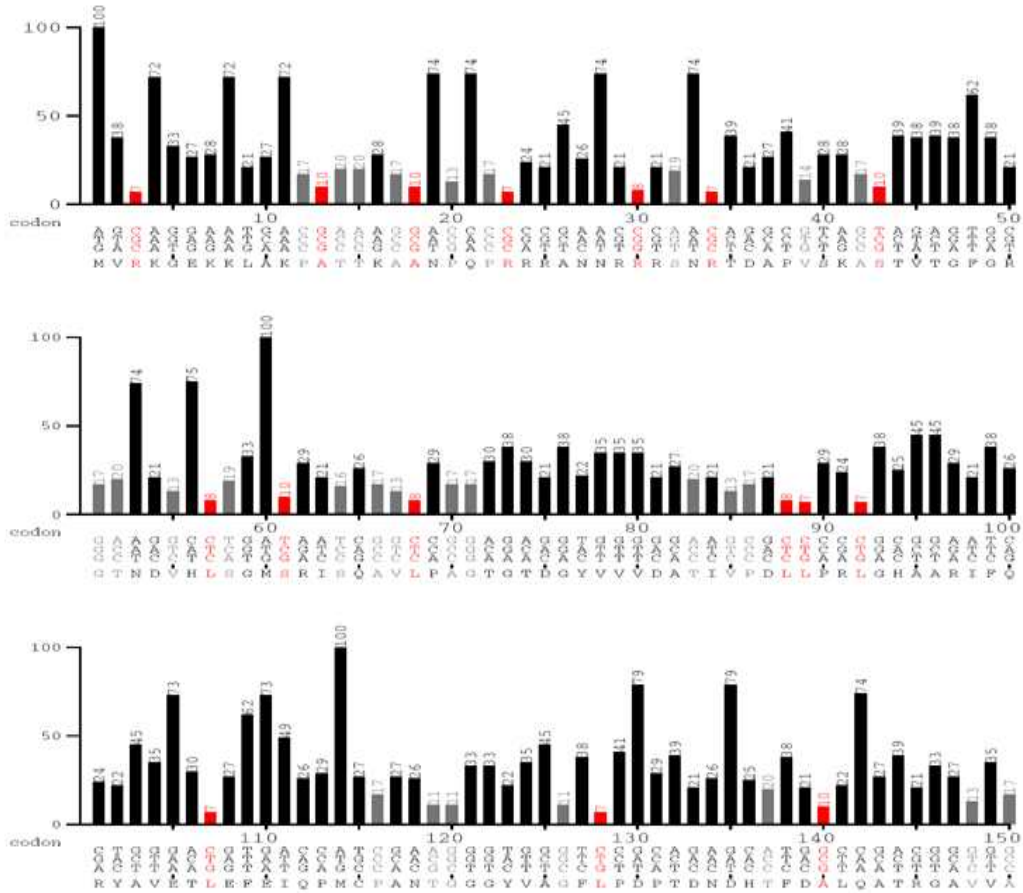


그림 4. 노다 바이러스 캡시드 단백질 유전자 코돈 분석

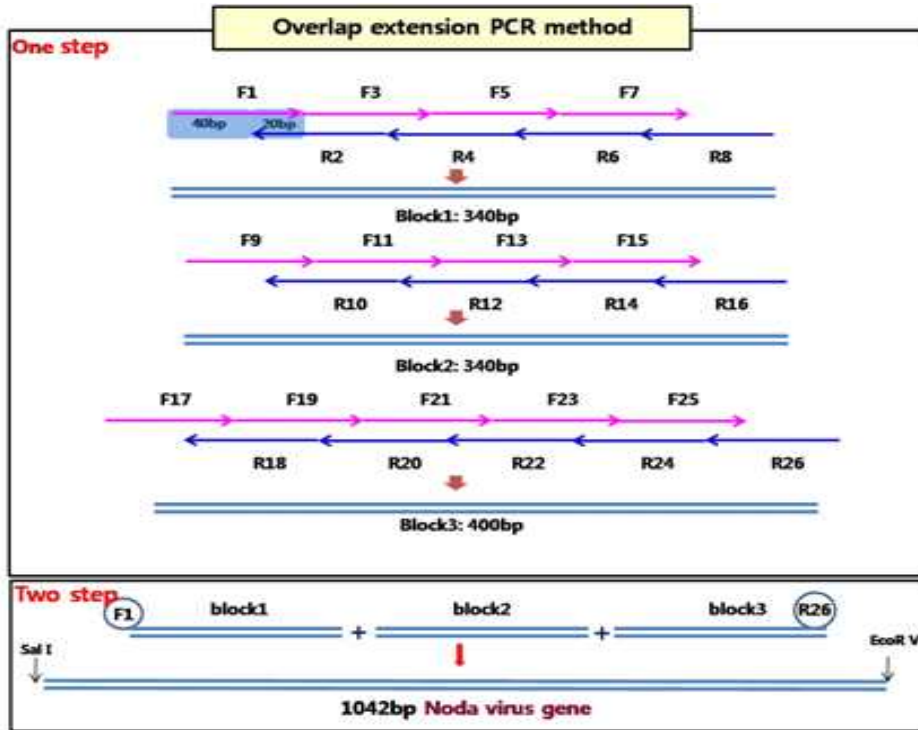


그림 5. 유전자 합성을 위한 Overlap extension PCR 방법

다. 식물 형질전환 벡터제작

(1). 핵형질전환 벡터 제작

식물세포에서의 단백질 고축적 기술을 적용하기 위한 일환으로 노다바이러스 항원단백질 유전자의 색소체 발현 연구수행과 함께 먼저 노다바이러스 항원 유전자를 핵 내로 도입하여 그 발현수준을 알아보고자 하였다.

담배 핵에서의 발현을 위해 노다바이러스 항원단백질 유전자를 코돈 최적화시킨 후 담배 핵에 도입하기 위한 형질전환 벡터 (pHC30::SynNoda)를 제작하였다 (그림 6).

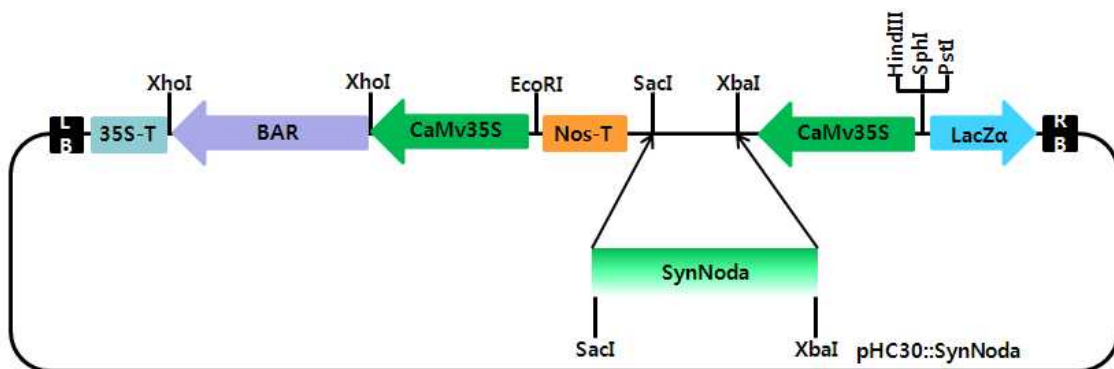


그림 6. 담배 핵 형질전환용 노다 바이러스 항원단백질 유전자가 도입된 벡터

식물 핵형질전환용 pHC30 벡터를 제한효소 SacI과 XbaI 으로 처리하여 절단 한 후 gel purification kit (Bioneer)를 사용하여 분리하였다. pGEM T-easy 벡터에 클로닝되어있는 노다바이러스 항원단백질 유전자도 SacI과 XbaI 제한효소로 처리한 후 gel purification kit (Bioneer)를

사용하여 분리하였다. 분리된 노다바이러스 항원단백질 유전자를 DNA Ligation kit-Mighty mix (Takara)를 이용하여 SacI과 XbaI 제한효소가 처리된 pH30 벡터로 도입하여 pH30::SynNoda를 제작하였다 (그림 6).

(2). 색소체 형질전환 벡터 제작

코돈 최적화된 노다바이러스 캡시드 유전자는 색소체 형질전환 과정 중 유전자간의 이차재조합을 방지할 수 있도록 고안한 rclp promoter가 포함된 색소체 형질전환 기본벡터 카세트인 TIA::RclpGAH로 도입하였다 (그림 7, 8). 기본벡터인 TIA::RclpGAH로부터 mGFP부분을 제거하기 위해 DNA를 제한효소 PstI로 자른 후 Klenow 효소 처리를 하였다. 처리한 반응물을 SalI 제한효소로 자른 다음 Phenol/Chloroform 및 에탄올 정제를 하여 벡터를 준비하였다.

pGEM T-easy 벡터내의 타유전자는 EcoRV와 SalI 제한효소로 처리한 후 gel purification kit (Bioneer)을 사용하여 분리하였다.

분리된 타유전자를 DNA Ligation kit-Mighty mix (Takara)를 이용하여 mGFP가 제거된 TIA::RclpGAH 벡터 (SalI/PstI\*)자리로 subcloning한 후 E.coli 내로 도입하여 TIARclp::synNoda를 제작하였다 (그림 8).

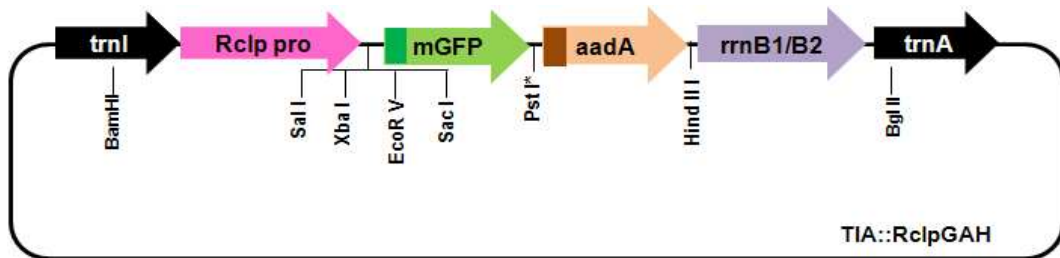


그림 7. 담배 색소체 형질전환 기본 카세트 벡터

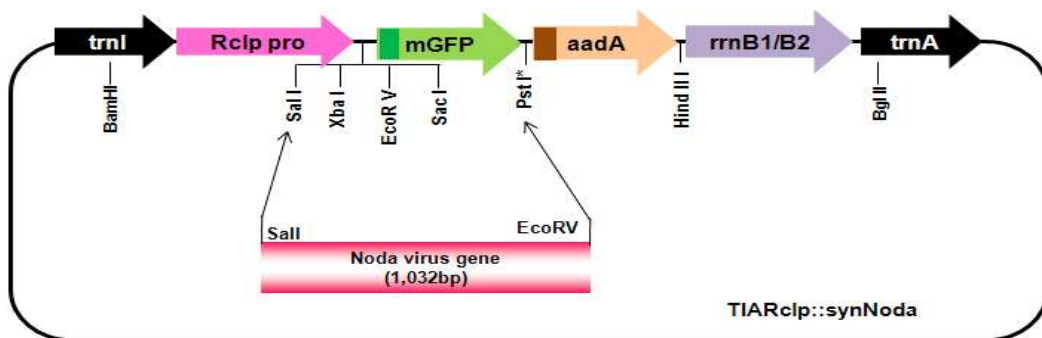


그림 8. 담배 색소체를 활용한 노다 바이러스 예방 백신생산용 벡터

라. 노다바이러스 항원단백질 유전자 발현 담배식물체 개발

(1). 담배 유전자 도입 및 핵형질전환 식물체 개발

(가) 핵형질전환 담배 생산

노다바이러스 항원단백질 유전자가 담배 핵게놈으로 도입되어 발현되는 형질전환체를 제조

하고자 하였다. 선발마커로서 bar 유전자를 사용하는 최종벡터 (pHC30::SynNoda)를 Agrobacterium에 형질전환하였다. pHC30::SynNoda 벡터를 식물체에 도입하기 위해 Agrobacterium-매개 진공 침윤법에 따라 5~6주간 무균배양된 담배유식물체의 위에서부터 3~4번째 잎을 사용하였다. Agrobacterium과 공동배양 후 잎 절편체를 멸균된 paper로 닦은 후, Murashige & Skoog Shoot Multiplication Medium B배지에서 3일 동안 암배양하였다. 공동배양 3일 후 멸균수로 Agrobacterium을 씻어준 후 Murashige & Skoog Shoot Multiplication Medium B배지에 phosphinothricin 항생제가 포함된 선발배지에서 3~4주 동안 명배양하였다. 3주 간격으로 새로운 배지로 계대배양하였으며, 선발배지에서 유도된 shoot는 뿌리 유도를 위해 MS배지로 옮겨 약 2~3주 후 화분으로 옮겨 순화시켜 재배하였다 (그림 9).

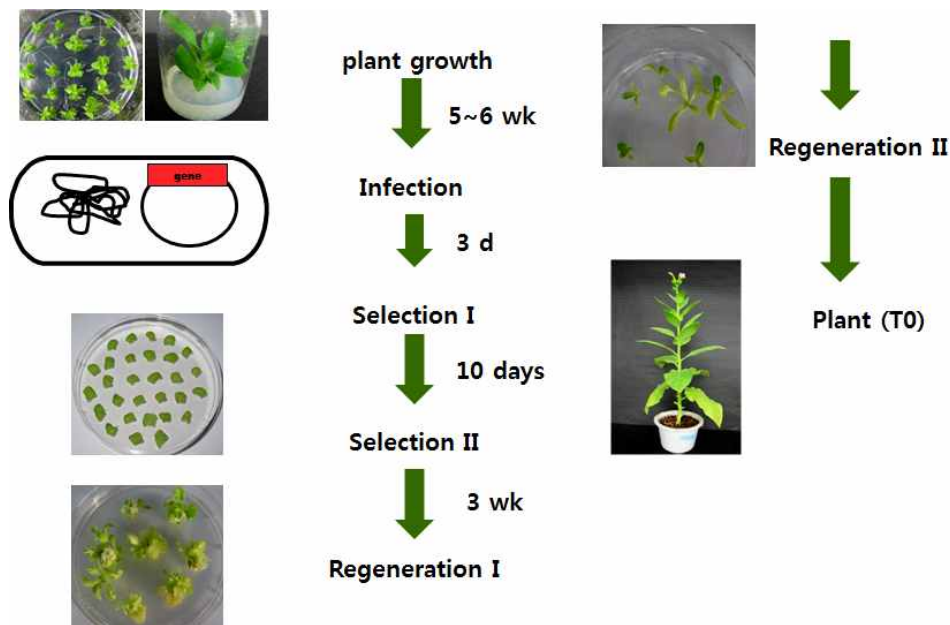


그림 9. 담배 핵형질전환 과정 모식도

(나) 핵 형질전환 선발개체 분석

① 유전자 도입 분석 (gDNA PCR)

항생제 배지에서 재분화된 식물체가 목표 유전자가 도입된 형질전환체인지를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 pHC30 벡터 특이적 프라이머 (35S For/NosT Rev)로 PCR을 수행하였다. 또한 형질전환 매개체로 사용한 Agrobacterium 오염을 확인하기 위해 Agrobacterium 특이적 프라이머 (Agro 592F/Agro 592R)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그림 10에서 보듯이 노다바이러스 유전자가 삽입된 걸로 확인된 개체 중 8번에서 Agrobacterium이 오염되었음이 확인되었다. 따라서 최종적으로 그림 10-1에 붉은 원으로 표시된 형질전환 라인(1, 3, 4, 5, 6, 7, 12)을 선발하여 이후의 실험을 실시하였다.



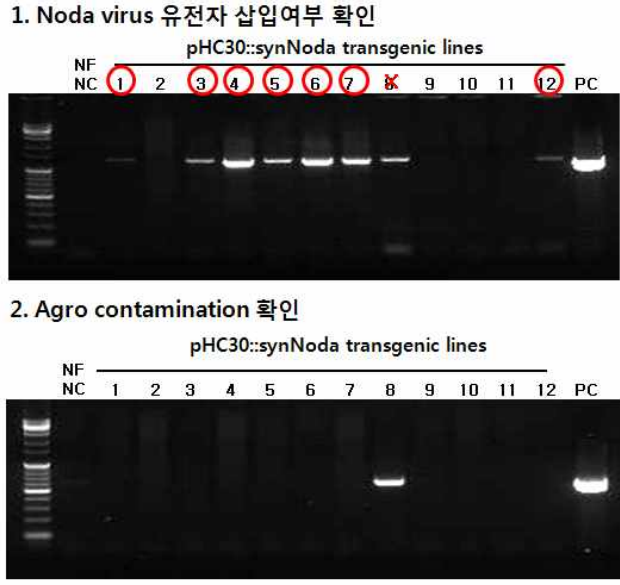


그림 10. 항생제배지에서 선발된 핵 형질전환 담배의 gDNA PCR 검증

② 유전자 발현 검증 (RT-PCR)

gDNA PCR로 선발된 식물체에서 노다바이러스 유전자의 transcript (RNA level에서의 발현)를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 노다바이러스 유전자 특이적인 primer로 PCR을 수행하였다. PCR product의 specificity를 높이기 위해 61°C와 64°C에서 반복하여 수행한 결과를 비교하여 최종 라인(3, 4, 7)을 선발하였다 (그림 11). 선발된 개체들을 대상으로 노다바이러스 항체를 이용한 Western blot으로 노다바이러스 항원단백질의 발현을 확인하고 있다.

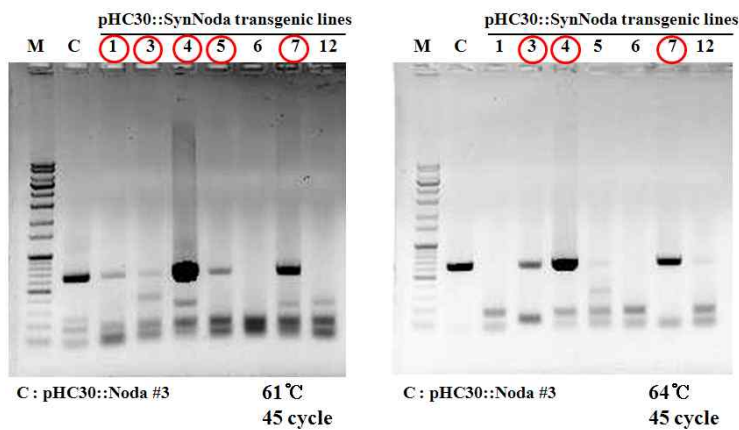


그림 11. 핵 형질전환 담배의 노다바이러스 transcript 검증

③ 핵형질전환 식물체의 항원단백질 발현검증

노다바이러스 항원단백질 유전자의 색소체 발현 연구수행과 함께 노다바이러스 항원 유전자를 핵 내로 도입하여 그 발현수준을 알아보려고 하였다. 담배 핵에서의 발현을 위해 노다바이러스 항원단백질 유전자를 코돈 최적화시킨 후 5' 전방에 signal sequence를 fusion하여 담배

(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 핵에 도입하였다. 항생제 배지에서 재분화된 식물체가 목표 유전자가 도입된 형질전환체인지를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 pHC30 벡터 특이적 프라이머 (35S For/NosT Rev)로 PCR을 수행하였다. 또한 형질전환 매개체로 사용한 *Agrobacterium* 오염을 확인하기 위해 *Agrobacterium* 특이적 프라이머 (Agro 592F/Agro 592R)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그림 11에서 보듯이 노다바이러스 유전자가 삽입된 걸로 확인된 개체 중 8번에서 *Agrobacterium*이 오염되었음이 확인되었다. 따라서 최종적으로 그림 10-1에 붉은 원으로 표시된 형질전환 라인 (1, 3, 4, 5, 6, 7, 12)을 선발하여 이후의 실험을 실시하였다.

(2). 담배 색소체 형질전환 및 형질전환체 개발

(가) 색소체 형질전환 담배 생산

항원 단백질을 발현할 담배는 사료형태로 직접 제공되므로 니코틴이 함유되어 있지 않은 담배를 사용하였다. 항생제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 발아 후 5주 이상 기내에서 배양된 담배 잎을 Rmop 배지 위에서 치상한 후 Bio-Rad 사 PDS-1000 기종을 사용하여 형질전환을 시행하였다. CaCl<sub>2</sub>와 spermidine을 사용하여 형질전환 plasmid 벡터를 0.6 um gold particle로 coating 하였다. 무균 상태 chamber 내 vacuum은 28 Hg, 압력은 1100 psi, 거리는 9 cm로 하여 배지 위에 치상된 담배 잎에 bombarding 하였다. Bombardment된 담배 잎을 2일간 동일 배지에 배양한 후, 5 mm x 5 mm 절단하여 Rmop sp 선발배지에서 6-7주 배양하여 저항성 shoot을 유도하였다.

Spectinomycin 저항성 배지에서 유도된 shoot는 3 mm x 3 mm 크기로 절단하여 동일한 선발배지에서 재분화를 통하여 저항성 shoot을 다시 유도하였다. 이와 같이 선발 배지에서 재분화를 반복하여 도입된 유전자의 homoplasmly를 높여주었다 (그림 12).

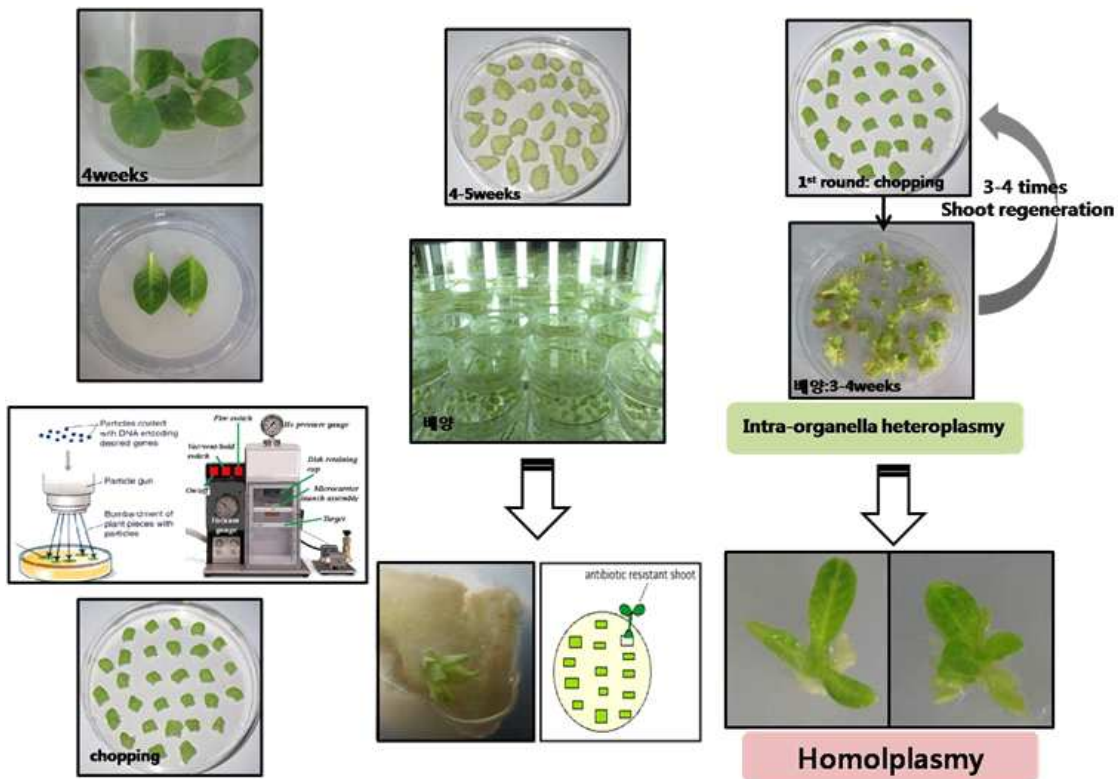


그림 12. 색소체 형질전환체 생산 과정



(나) 색소체 형질전환 선발개체 분석

① 선발개체의 유전자 도입 분석 (gDNA PCR)

항생제 첨가 배지에서 재분화된 식물체가 목표의 유전자가 도입된 형질전환체인지를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 벡터 특이적인 trnIF와 trnAR primer로 PCR을 수행하였다. 야생형에서는 1.6 kb에서 DNA 밴드가 검출이 된 반면, 형질전환체에서는 목표의 유전자가 도입된 것을 나타내는 4.5 kb에서 DNA밴드가 검출이 되었다 (그림 13).

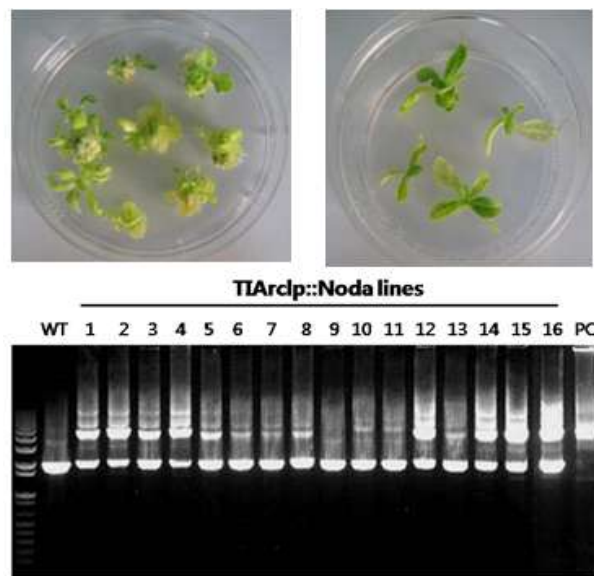


그림 13. 재분화된 색소체 형질전환체의 PCR 검증

② 선발개체의 유전자 발현 검증 (RT-PCR) 및 재조합 단백질 발현 검증 (Western blot)

재분화배지에서 1차 선발된 형질전환 식물체를 화분으로 이식하여 식물생장실에서 재배하였다. RT-PCR로 노다바이러스 항원단백질의 transcript가 발현되는 식물체를 선별한 후 목표의 유전자가 단백질 level에서 발현하는지를 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 식물체 잎에서 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2  $\mu$ m immun-blotTNPVDF membrane(Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 위 A-2에서 생산한 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-rabbit HRP-labeled를 1:10000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응 시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. 그 결과 색소체 형질전환체에서 노다바이러스 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 14B).

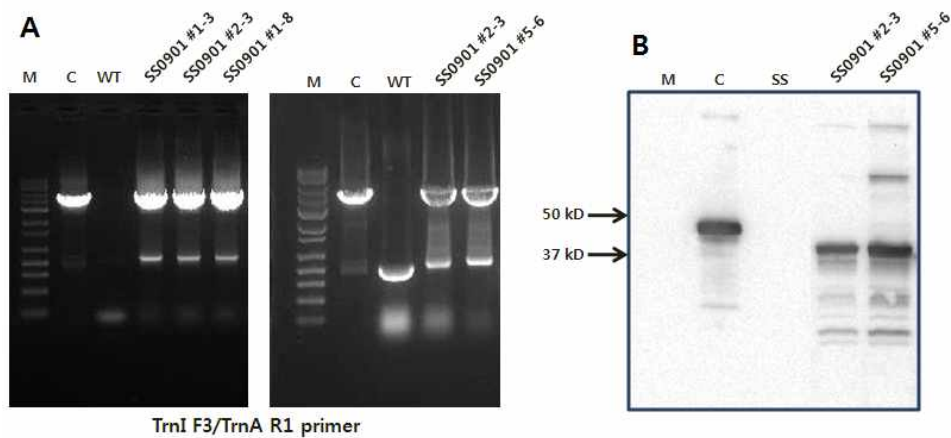


그림 14. T<sub>0</sub> 색소체 형질전환담배의 항원유전자 및 항원단백질 발현

#### 마. 색소체 형질전환체 후대검증

(1). 삼선 품종의 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증

(가) T<sub>1</sub> 세대 담배 색소체 계층 내에 도입된 항원유전자 확인

3개의 독립라인 T<sub>0</sub> 식물체에서 수확한 씨를 항생제 첨가 배지에서 생장시킨 후, 식물체가 목표의 유전자가 도입된 형질전환체인지를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 벡터 특이적인 trnIF (5' -ATC TCT CGA GCA CAG GTT TA-3')와 trnAR (5' -GTT CTT GAC AGC CCA TCT TT-3') primer로 PCR을 수행하였다. PCR product size가 크기 때문에 Ex Tag (Takara)을 사용하였고 95° C 5분간 pre-denaturation; 30 cycles의 95° C 30초 denaturation; 58° C 30초 annealing; 72° C 5분 extension; 그리고 72° C 5분 final extension 조건으로 PCR을 수행하였다. 유전자가 도입되지 않은 야생형에서는 1.6 kb의 DNA 밴드가 검출된 반면, T<sub>1</sub> 세대 형질전환체에서는 프로모터와 목표 유전자등 벡터가 도입되었음을 나타내는 4.5 kb의 DNA밴드가 확인되었다 (그림 15).

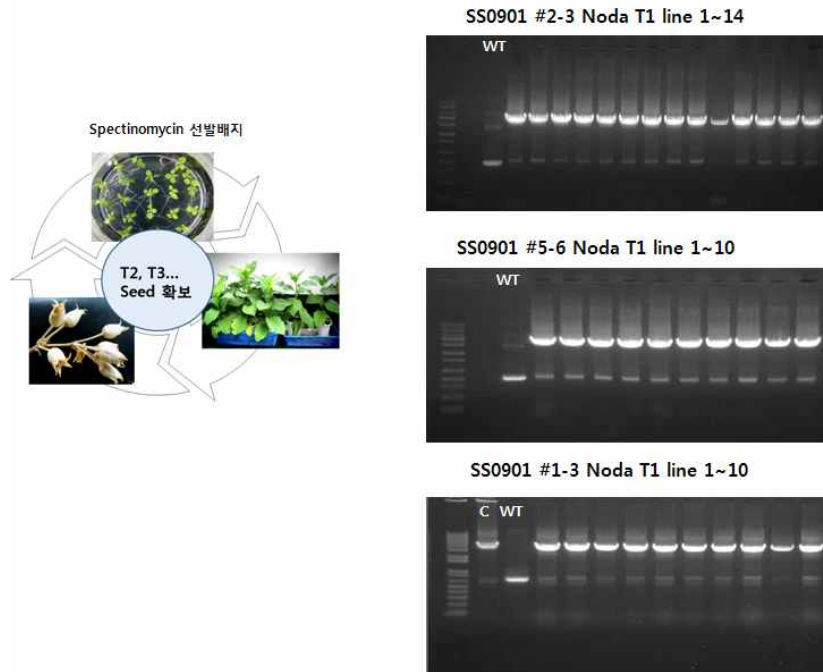


그림 15. 색소체 형질전환체 T<sub>1</sub> 세대의 항원유전자 색소체계놈 도입 검증

(나) T<sub>1</sub> 세대 담배 색소체 형질전환체의 RT-PCR 분석

Genomic DNA PCR로 유전자 도입이 확인된 T<sub>1</sub> 식물체를 대상으로 목표 유전자의 transcript (RNA level에서의 발현)를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 total RNA를 추출한 후 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 같은 양의 cDNA로 항상 발현하는 actin 유전자의 primer와 노다바이러스 유전자 특이적 primer로 가지고 PCR 한 결과 노다바이러스 유전자의 transcript가 T<sub>1</sub> 식물체에서 발현되는 것을 아가로스 젤 상에서 확인 하였다 (그림 16).

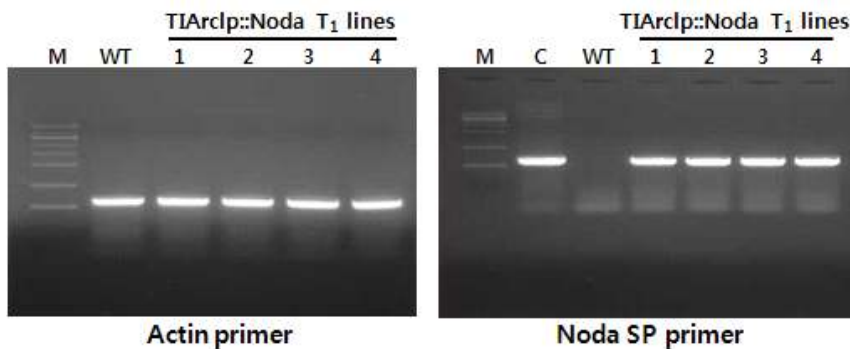


그림 16. 색소체 형질전환체 T<sub>1</sub> 라인의 RT-PCR 검증

(다) T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 세대 담배 색소체 형질전환체의 RT-PCR 분석

담배 색소체 형질전환체 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 식물체를 대상으로 목표 유전자의 transcript (RNA level

에서의 발현)를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 total RNA를 추출한 후 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 같은 양의 cDNA로 항시 발현하는 actin 유전자의 primer와 노다바이러스 유전자 특이적 primer로 가지고 PCR 결과 노다바이러스 유전자의 transcript가 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 식물체에서 발현되는 것을 아가로스젤 상에서 확인하였다 (그림 17).

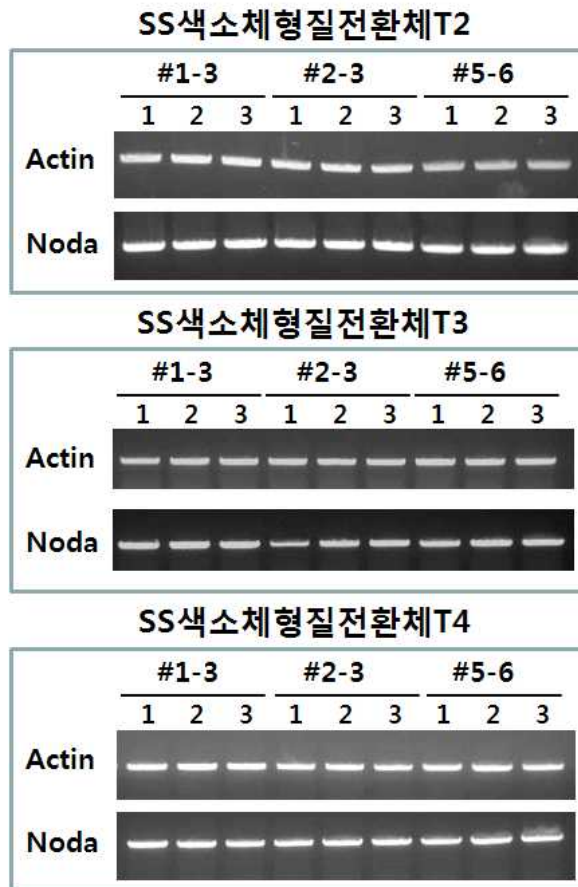


그림 17. 삼선 색소체 형질전환체 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 라인의 RT-PCR 검증

(라) T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 세대 담배 색소체 형질전환체의 항원단백질 발현 분석

RT-PCR로 노다바이러스 항원단백질의 transcript가 발현되는 식물체를 선별한 후 목표의 유전자가 단백질 수준에서 발현하는지를 확인하기 위하여 Western blot을 수행하였다. 식물체 앞에서 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2 μm immun-blotting membrane (Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 위 A-2에서 생산한 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-rabbit HRP-labeled를 1:10000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응 시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. 그 결과 색소체 형질전환체 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> line에서도 노다바이러스 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 18).

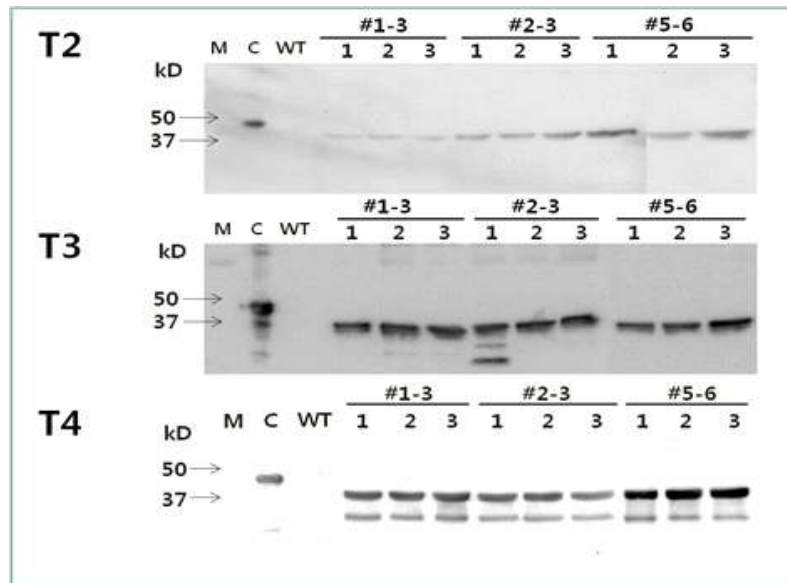


그림 18. 삼선 품종 색소체 형질전환체 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 라인의 항원단백질 발현

바. 항원단백질 분리 및 재조합 단백질 정량

(1). T<sub>1</sub> 세대 담배 색소체 노다바이러스 항원단백질 순수농도 측정

능성어 급이실험을 위한 항원단백질 투여량을 정하기 위해 색소체 형질전환체에서 발현되는 노다바이러스 항원단백질의 순수농도를 확인하였다. 먼저 Recombinant Noda Antigen 1 mg/ml을 1/100, 1/50, 1/20, 1/10로 희석하여 standard curve 만들었다. 색소체 형질전환체 잎에 단백질 extraction buffer를 넣어 총 단백질을 추출한 후 추출한 단백질을 1/10, 1, 2, 5ul 단위로 SDS-PAGE gel에 loading하였다. 0.2 μm immun-blotTMPVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer 하여 5% skim milk 로 blocking하고, 1차 항체로는 노다 monoclonal Antibody를 1:1000으로 희석하여 사용하였다. 2차 항체로는 Goat anti-mouse HRP-labeled를 1:1000의 농도로 사용하였으며 densitometer: TINA 2.0 program을 이용하여 형질전환식물체에서 발현된 항원단백질 순수농도를 측정하였다 (그림 19). 색소체 형질전환체의 노다바이러스 항원단백질의 순수농도 측정결과 최고 0.73mg/lg DW의 단백질이 발현되었으며 이 발현량은 19.1%-50.7% total soluble protein에 해당된다 (표 2).

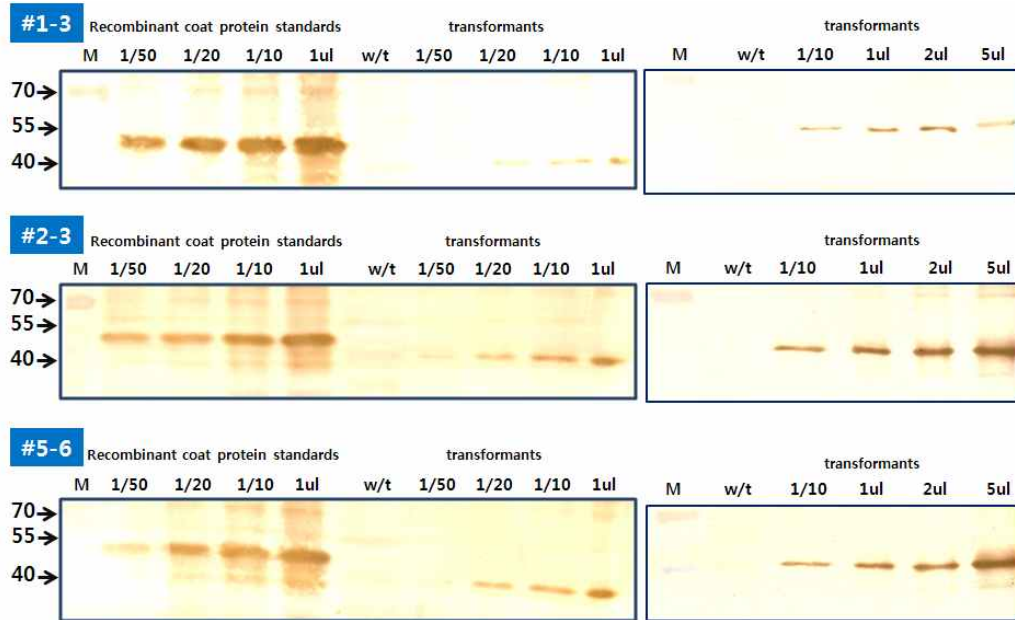


그림 19. 색소체 형질전환 식물체 (T<sub>1</sub>)내의 항원단백질 농도측정. 대장균에서 발현된 재조합 항원의 농도별 Western blot의 intensity를 색소체 형질전환체의 단백질 시료와 비교

sample	Concentration of Recombinant protein	
	mg/ml	% TSP
#1-3	193	19.1
#2-3	358	38.9
#5-6	487	50.7

표 2. 색소체 형질전환체 T<sub>1</sub> line의 항원단백질 발현양

## (2). 노다바이러스 항원단백질의 virus like particle 형성 확인

### (가) Sucrose step gradient를 이용한 노다바이러스 항원단백질 분리

노다바이러스 항원단백질의 virus like particle (VLP) 형성을 확인하기 위해 sucrose step gradient를 이용하여 형질전환 식물체로부터 항원단백질을 분리하였다. 항원단백질은 protein extraction buffer를 사용하여 추출하였으며 optima L-100 XP ultracentrifuge (BECKMAN coulter)의 SW41TI rotor를 이용하여 sucrose step gradient 농도 10, 20, 30, 40, 50% 조건으로 -4°C, 180000 x g, 4시간동안 원심분리하여 5개의 fraction과 pellet을 분리하였다 (그림 20B). 각각의 fraction을 centrifugal filter units (Millipore)을 이용하여 농축하여 western blot을 수행한 결과 4번 fraction에서만 노다바이러스 항원단백질이 존재하는 것을 확인하였다 (그림 20C).



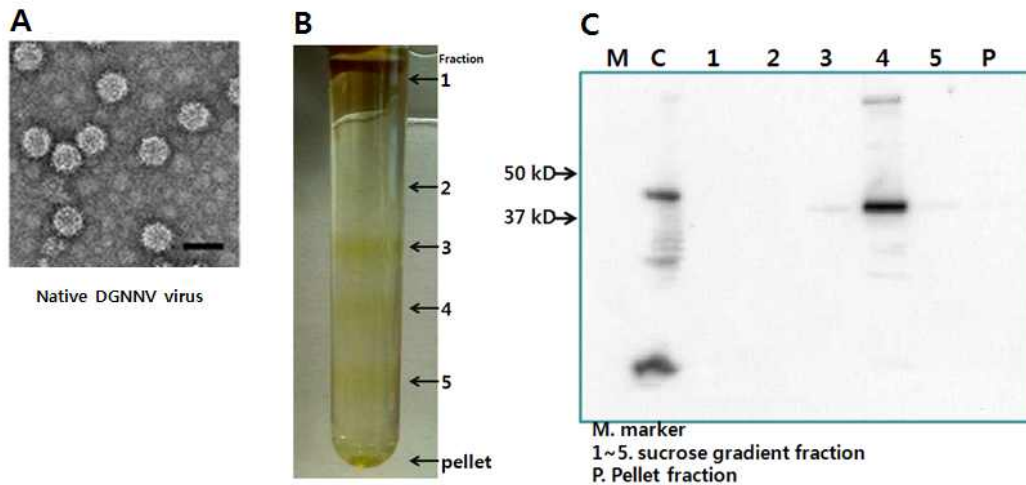


그림 20. Sucrose step gradient를 이용한 노다바이러스 항원단백질분리. A. Example of native DGNNV virus VLP; B. Sucrose step gradient; C. Western analysis of sucrose step gradient fractions

(나) Sucrose linear gradient를 이용한 노다바이러스 항원단백질 분리

노다바이러스 항원단백질의 virus like particle 형성을 확인하기 위해 형질전환 식물체에서 protein extraction buffer를 사용하여 단백질을 추출하여 sucrose linear gradient를 optima L-100 XP ultracentrifuge (BECKMAN coulter)의 SW41TI rotor를 이용하여 sucrose 농도 10, 50% 조건으로 180000 x g, 5시간동안 원심분리하여 500  $\mu$ l 씩 23개의 fraction을 획득하였다 (그림 21A). 이렇게 획득한 23개의 fraction들을 western blot을 수행하였다. 그 결과 18번에서 23번 fraction까지 노다바이러스 항원단백질이 분포하는 것을 확인하였고 그 중에서 19번 fraction에서 가장 많은 노다바이러스 항원단백질이 존재하는 것을 확인하였다 (그림 21C).

sucrose gradient를 통해서 얻어진 노다바이러스 항원단백질이 존재하는 fraction들을 전자현미경으로 virus like particle을 형성을 확인하였다.

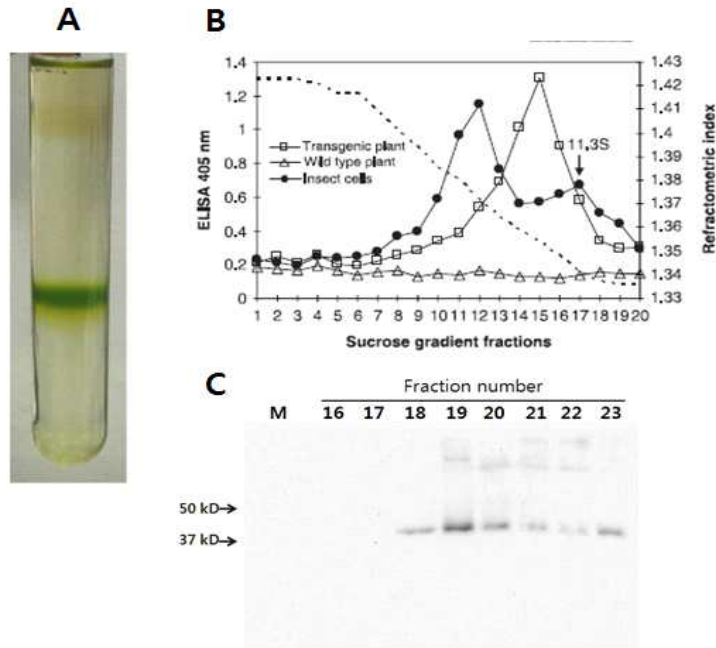


그림 21. Sucrose linear gradient를 이용한 노다바이러스 항원단백질 분리  
 A. Sucrose linear gradient; B. VLP fractionation; C. Western blot

사. 사업단 기반 연구

(1). 니코틴 프리 담배 품종으로부터 Noda 항원단백질 발현

(가) 니코틴 프리 담배 품종의 색소체 형질전환

여러 작물의 색소체 형질전환 방법이 보고되어 있으며 그 중 담배는 색소체 형질전환효율이 가장 높은 식물재료이다. 담배 색소체 형질전환 효율은 품종 간에 매우 적은 차이가 있으며 일반적으로 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, *Nicotiana benthamiana* 등이 가장 많이 재료로 이용된다. 그러나 아직까지 니코틴프리 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. MD609) 색소체 형질전환에 대한 방법은 알려져 있지 않다. 사업단의 기반기술 확립의 일환으로 본 연구팀은 니코틴프리 담배의 색소체 형질전환 방법을 체계화하고자 한다 (그림 22). 먼저 항생제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 발아 후 5주 이상 기내에서 배양된 니코틴프리 담배 잎을 Rmop 배지 위에서 치상한 후 Bio-Rad 사 PDS-1000 기종을 사용하여 형질전환을 시행하였다. CaCl<sub>2</sub>와 spermidine을 사용하여 형질전환 plasmid 벡터를 0.6 um gold particle로 coating 하였다. 무균 상태 chamber 내 vacuum은 28 Hg, 압력은 1100 psi, 거리는 9 cm로 하여 배지 위에 치상된 담배 잎에 bombarding 하였다. Bombardment된 담배 잎을 2일간 동일 배지에 배양한 후, 5 mm x 5 mm 절단하여 Rmop sp 선발배지에서 6-7주 배양하여 저항성 shoot을 유도하였다. Spectinomycin 저항성 배지에서 유도된 shoot는 3 mm x 3 mm 크기로 절단하여 동일한 선발배지에서 재분화를 통하여 저항성 shoot을 다시 유도하였다. 이와 같이 선발 배지에서 재분화를 반복하여 도입된 유전자의 homoplasmy를 높여주었다.



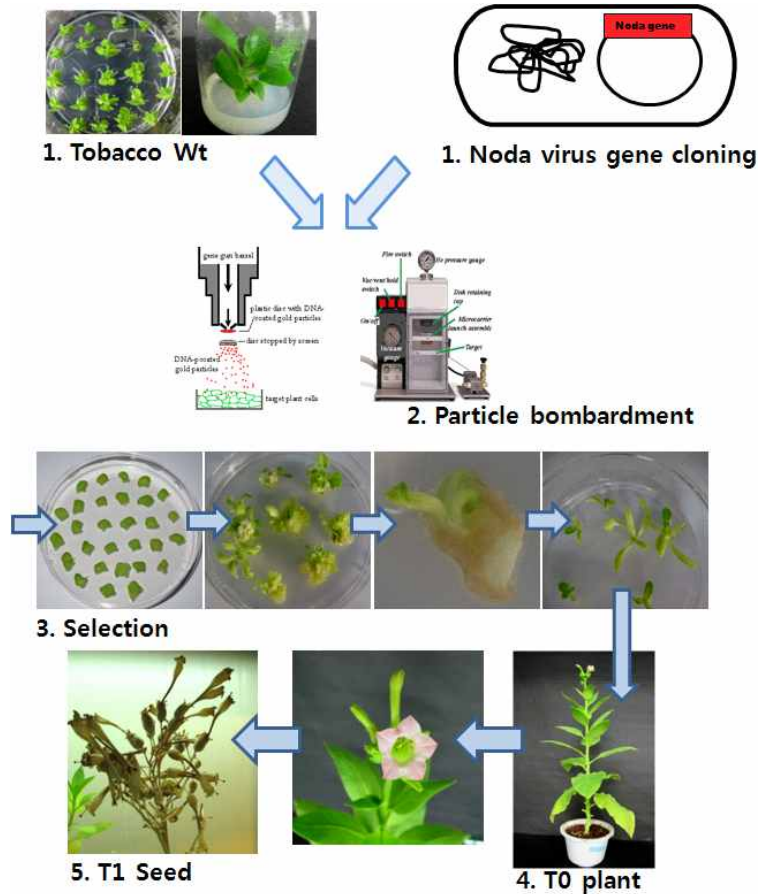


그림 22. 니코틴프리 담배색소체 형질전환 시스템 모식도

(나) T<sub>0</sub> 세대 니코틴프리 담배 색소체 계놈내에 도입된 항원유전자 확인

항생제 첨가 배지에서 재분화된 식물체를 모두 17개 독립라인을 확보하였으며 목표 유전자가 색소체계놈내에 도입되었는지를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 벡터 특이적인 trnIF (5'-ATC TCT CGA GCA CAG GTT TA-3')와 trnAR (5'-GTT CTT GAC AGC CCA TCT TT-3') primer로 PCR을 수행하였다. PCR product size가 크기 때문에 Ex Tag (Takara)을 사용하였고 95° C 5분간 pre-denaturation; 30 cycles의 95° C 20초 denaturation; 58° C 15초 annealing; 72° C 5분 extension; 그리고 95° C 5분 final extension 조건으로 PCR을 수행하였다. 유전자가 도입되지 않은 야생형에서는 1.6kb의 DNA 밴드가 검출된 반면, 형질전환체에서는 프로모터와 목표 유전자 등 벡터가 도입되었음을 나타내는 4.5 kb의 DNA밴드가 검출되었으며 17개의 항생제 선발 독립라인 중 13개 라인이 homoplasmly를 보여주었다 (그림 23).

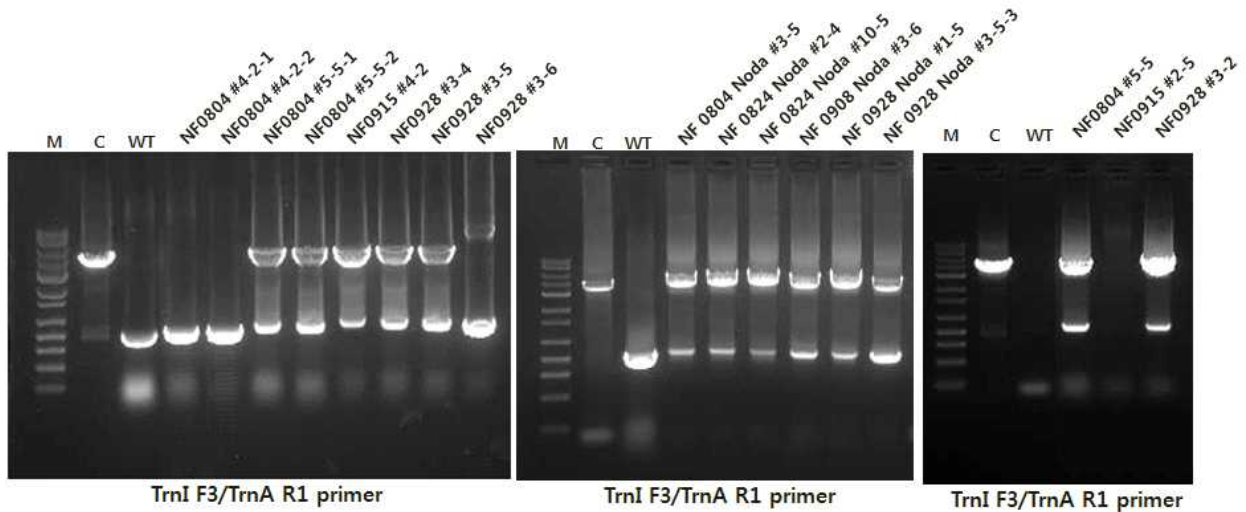


그림 23. 니코틴프리 담배 색소체 ( $T_0$ ) 계놈내에 목표 유전자 도입의 PCR검증

(다) 니코틴프리 담배 색소체 형질전환체의 항원단백질 발현분석

Genomic DNA PCR로 유전자 도입이 확인된 식물체를 대상으로 목표 유전자의 transcript (RNA level에서의 발현)를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 total RNA를 추출한 후 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 노다바이러스 유전자 특이적 primer로 PCR한 결과 상대적으로 발현양이 많은 라인들 (#3-5, #5-5, #5-6)을 선별할 수 있었다. 같은 양의 cDNA로 항시 발현하는 actin 유전자의 primer를 가지고 PCR 한 결과와 비교했을 때 노다바이러스 유전자의 transcript가 적어도 2-3배 이상 많은 것을 아가로스젤 상에서 확인 하였다 (data not shown). RT-PCR로 노다바이러스 항원단백질의 transcript가 발현되는 식물체를 선별한 후 목표의 유전자가 단백질 level에서 발현하는지를 확인하기 위하여 western blot을 수행한 결과 독립라인별로 항원단백질 발현수준의 차이는 있으나 NF0804 #5-5, NF0928#3-6 라인을 제외하고 모두 노다바이러스 항원단백질을 발현함을 확인하였다 (그림 24).

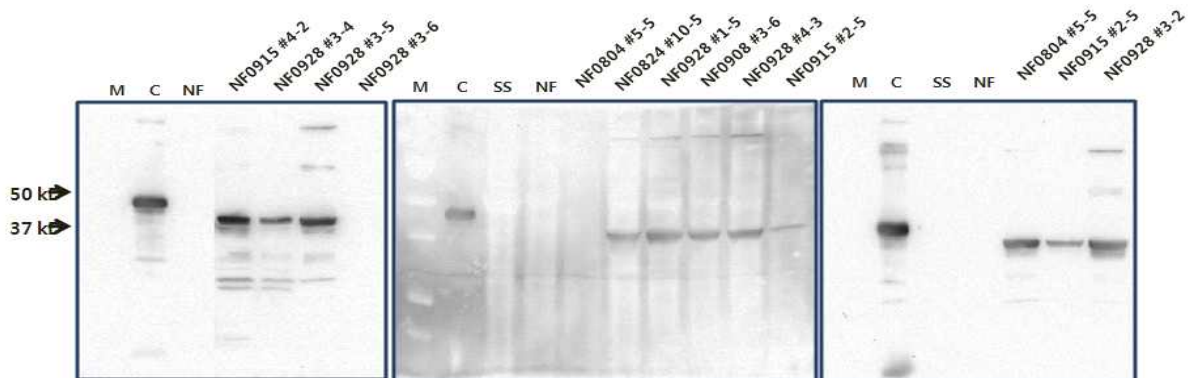


그림 24. 니코틴프리 담배 색소체 ( $T_0$ )의 항원단백질 발현 검증

(라) 니코틴프리 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증

①  $T_1$  세대 담배 색소체 형질전환체의 RT-PCR 분석

담배 색소체 형질전환체  $T_1$  식물체를 대상으로 목표 유전자의 transcript (RNA level에서의

발현)를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 total RNA를 추출한 후 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 같은 양의 cDNA로 항시 발현하는 actin 유전자의 primer와 노다바이러스 유전자 특이적 primer로 가지고 PCR 결과 노다바이러스 유전자의 transcript가 T<sub>1</sub> 식물체에서 발현되는 것을 아가로스젤 상에서 확인 하였다 (그림 25).

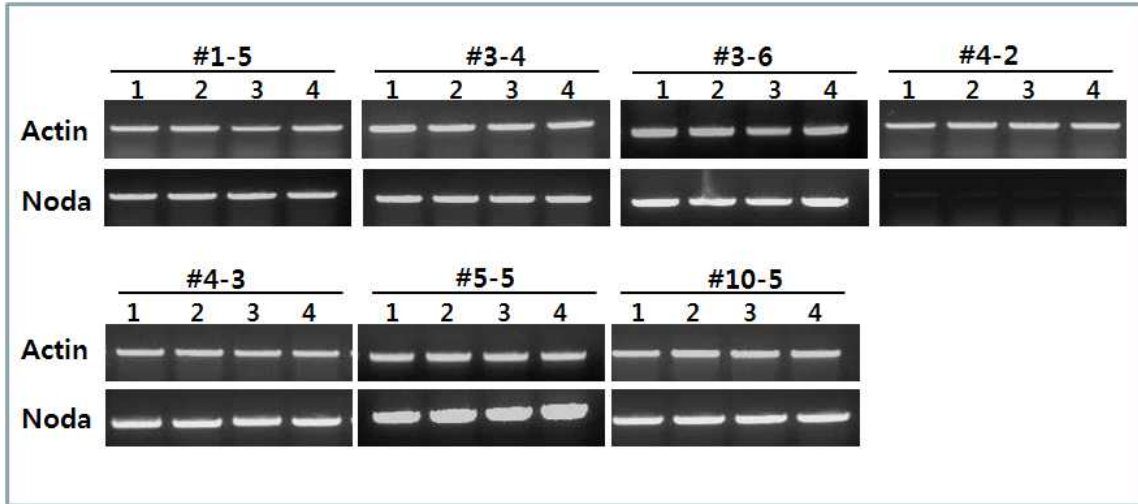


그림 25. 니코틴프리 색소체 형질전환체 T<sub>1</sub> 라인의 RT-PCR 검증

② T<sub>1</sub> 세대 담배 색소체 형질전환체의 항원단백질 발현 분석

RT-PCR로 노다바이러스 항원단백질의 transcript가 발현되는 식물체를 선별한 후 목표의 유전자가 단백질 수준에서 발현하는지를 확인하기 위하여 Western blot을 수행하였다. 식물체 앞에서 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2 μm immun-blotTMPVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 위 A-2에서 생산한 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-rabbit HRP-labeled를 1:10000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응 시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. 그 결과 색소체 형질전환체 T<sub>1</sub> line에서도 노다바이러스 항원단백질의 발현을 확인하였다 (그림 26).

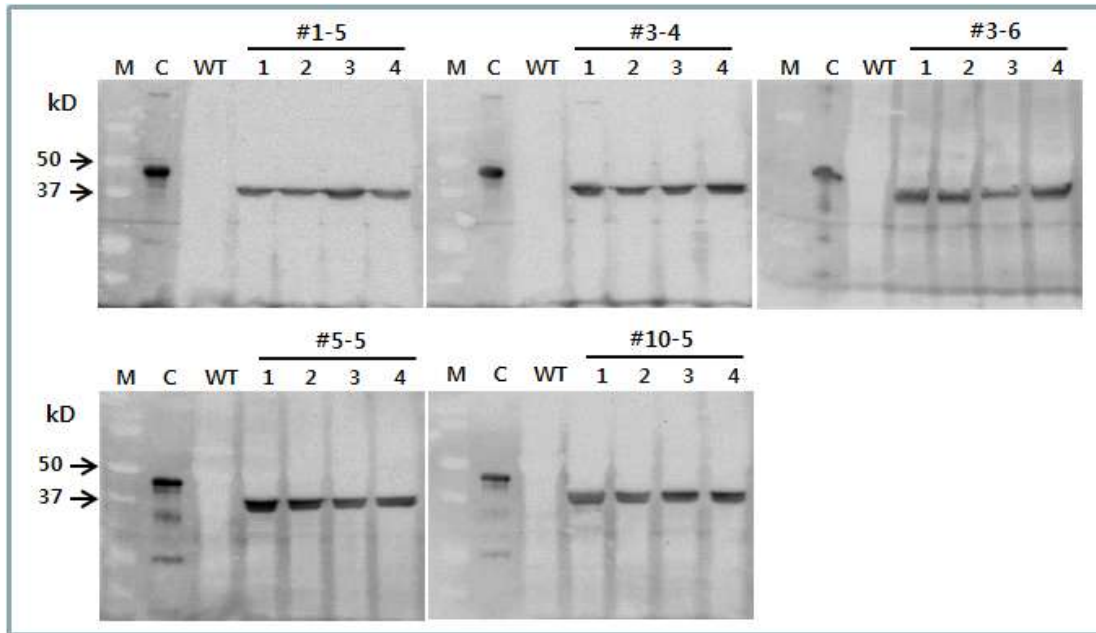


그림 26. 니코틴프리 색소체 형질전환체 T<sub>1</sub> 라인의 항원단백질 발현

(2). 담배에서의 transient expression system을 이용한 목적단백질의 대량 생산법 확립

(가) Viral expression 벡터를 이용한 transient agro-infiltration assay

최종 벡터 pGD-AltMV::Noda와 pGD-AltMV::Noda-FLAG를 Bio-rad의 MicroPulser를 이용한 electroporation 방법으로 세 종류의 Agrobacterium (LBA4404, EHA105, GV3101)에 형질전환하였다 (그림 27). 콜로니 PCR을 통하여 유전자 및 벡터의 도입이 확인된 Agrobacterium을 키워서 infiltration buffer에 O.D<sub>600</sub>=1.0으로 cell 농도를 맞춘 후 3-4주 된 *N. benthamiana* 잎에 주사기를 이용하여 접종하였다 (그림 28). 접종 후 5, 12일 일정 시간 간격으로 접종 부위를 샘플링한 후 total RNA를 추출하여 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 노다바이러스 유전자 특이적 primer로 PCR한 결과 발현이 되는 것을 확인할 수 있었고 접종 후 5일 보단 12일에서 transcript의 발현이 더 많이 되는 것을 확인하였다 (그림 29).

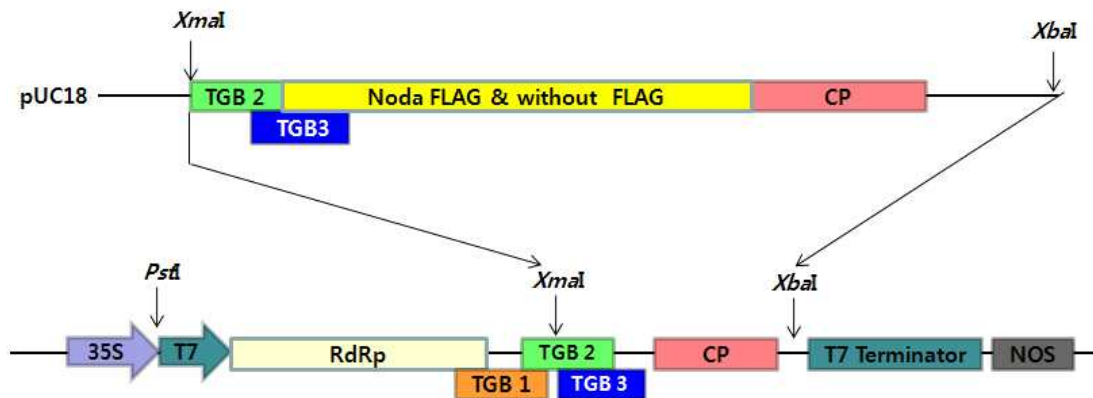


그림 27. 노다바이러스 viral expression 벡터

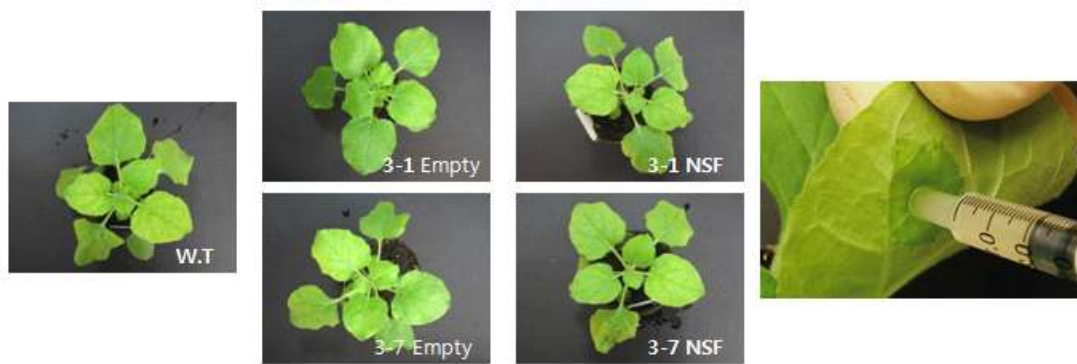


그림 28. *Nicotiana benthamiana* 식물체 infiltration 방법

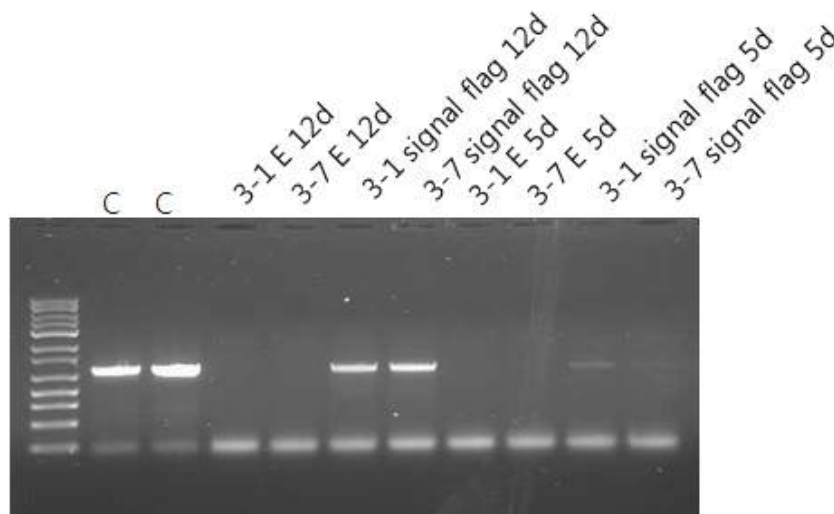


그림 29. Infiltration 식물체의 노다바이러스 transcript 검증

Western blot은 식물체 잎에서 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2  $\mu$ m immun-blotTMPVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 위 A-2에서 생산한 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-rabbit HRP-labeled를 1:10000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. 그 결과 단백질 수준에서의 발현을 확인할 수가 없었다 (그림 30). 결론적으로 담배 transient expression에 이용한 viral expression 벡터인 pGD-AltMV system이 작동하지 않은 것을 확인하였다.



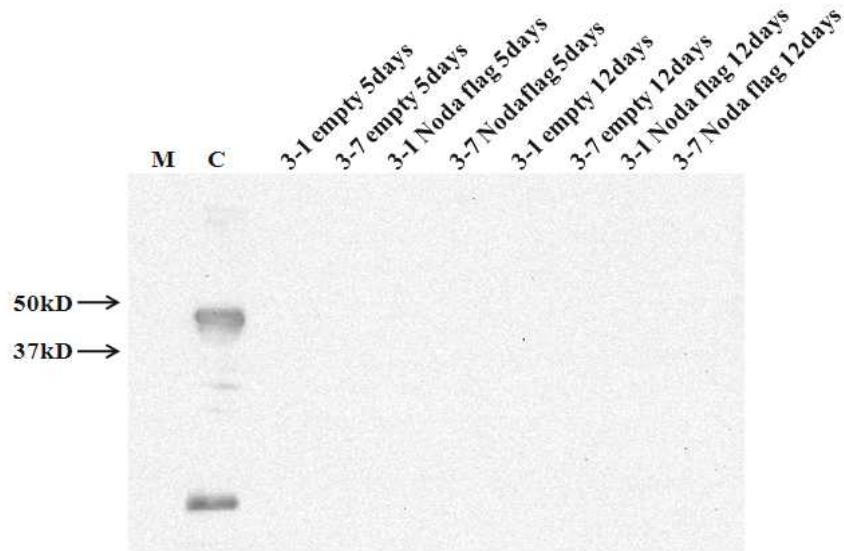


그림 30. Infiltration 식물체의 western blot 검증

(나) Agrobacterim vector pTRAKc-rbcs1-cTP::Noda vector에 p19 (RNA silencing suppressor)를 적용하여 infiltration을 통한 단백질 발현 확인

최종 벡터 pTRAKc-rbcs1-cTP vector에 Noda gene을 삽입하여 Bio-rad의 MicroPulser를 이용한 electroporation 방법으로 agrobacterium GV3101에 형질전환 하여 infiltration을 시도하였다 (그림 31). 접종 후 5, 10, 15, 20일 일정 시간 간격으로 접종 부위를 샘플링한 후 식물체 앞에서 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2  $\mu$ m immun-blotTMPVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-mouse HRP-labeled를 1:5000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응 시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. 그 결과 단백질 수준에서의 발현을 확인할 수가 없었다 (그림 32). 결론적으로 pTRAKc-rbcs1-cTP::Noda 벡터 p19을 적용하였을 때 단백질 발현양이 증가하는 양상을 확인할 수 있었고, 시간이 지남에 따라 p19을 적용하지 않은 벡터에서 보다 단백질 발현이 더 오래 유지되는 것 또한 확인할 수 있었다.

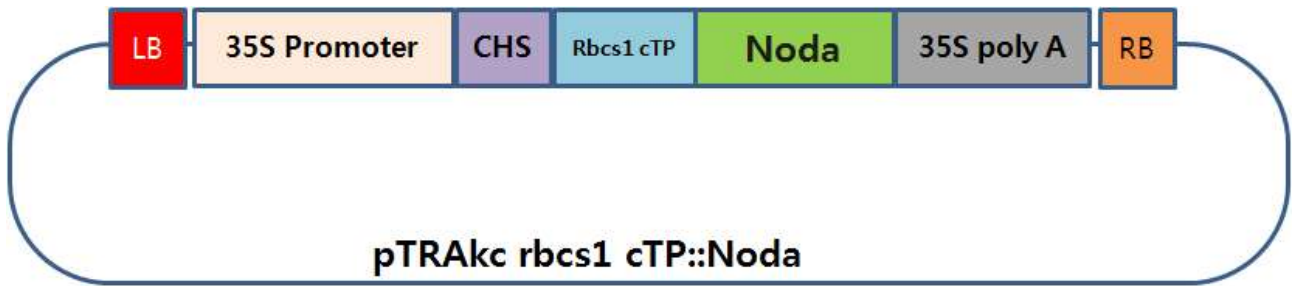
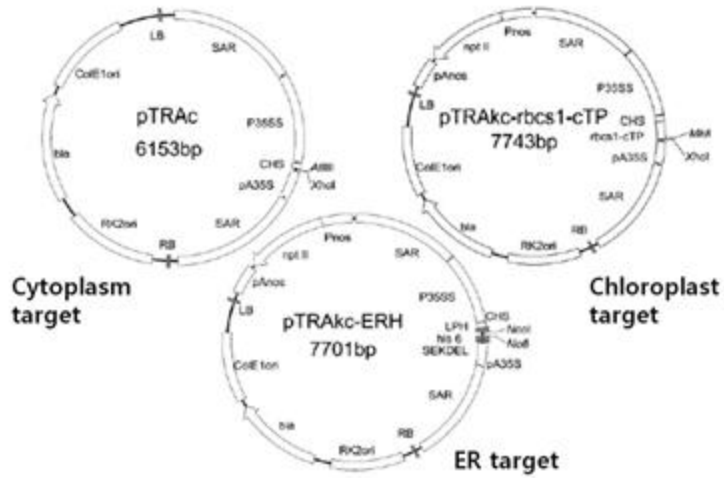


그림 31 pTRAc-rbcs1-cTP vector

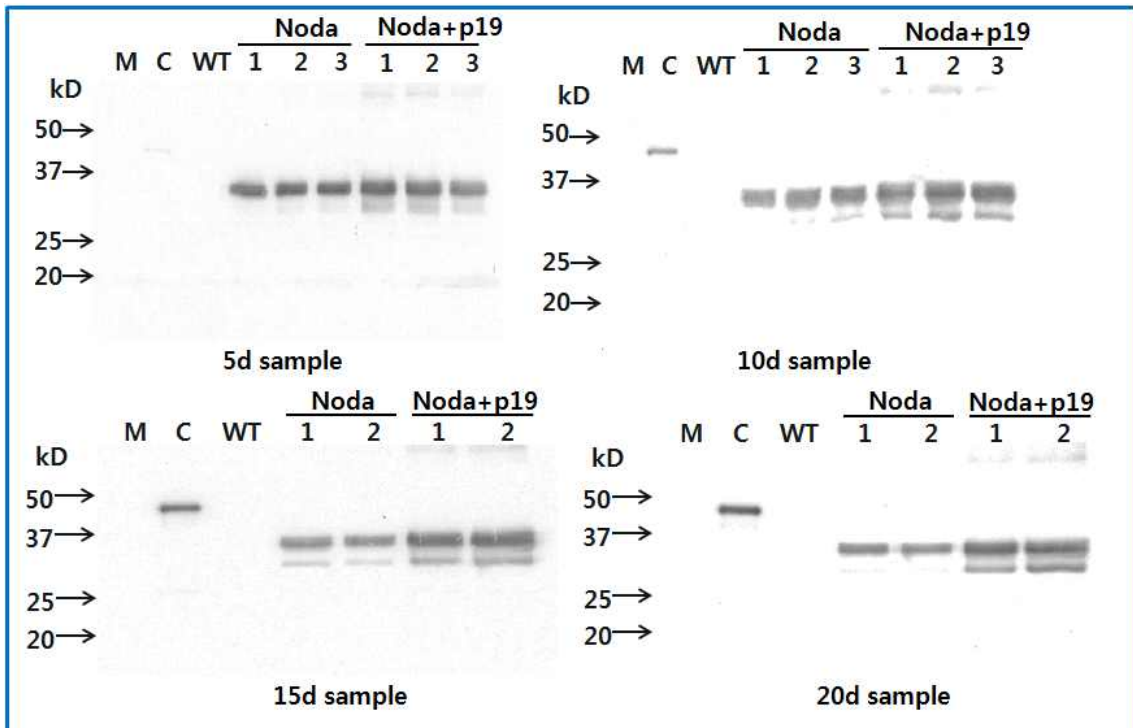


그림 32. p19적용 infiltration 식물체의 항원단백질 발현

(다) pTRAcKc-rbcs1-cTP::Noda vector를 vacuum inoculation을 통한 단백질 발현 최적 조건 확립

Agrobacterium GV3101에 형질전환된 pTRAcKc-rbcs1-cTP::Noda vector를 이용하여 vacuum inoculation 방법을 통하여 최적 단백질 발현조건을 찾기 위한 실험을 진행하였다. 콜로니 PCR을 통하여 유전자 및 벡터의 도입이 확인된 agrobacterium을 키워서 infiltration buffer에 O.D600=1.0으로 cell 농도를 맞춘 후 3-4주 된 *N. Benthamiana* 식물체를 agrobacterium이 녹아 있는 infiltration buffer에 침지하여 vacuum을 걸어서 inoculation을 진행하였다 (그림 33). 실험 조건으로는 silwet 농도 (0, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{l/L}$ ), vacuum 압력 (5, 15, 25 Hg), vacuum 시간(5, 10, 15, 20분), sampling 시기(3, 6, 9, 12, 15일), sampling 위치 (leaf number)를 정하여 각각의 실험을 진행하였다. Vacuum inoculation 진행하여 식물체 잎을 샘플링 한 후 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2  $\mu\text{m}$  immun-blotTMPVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-mouse HRP-labeled를 1:5000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응 시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. Vacuum inoculation 최적 발현 조건은 silwet 농도 200  $\mu\text{l/L}$ , vacuum 압력은 25 Hg, vacuum 시간은 15분, sampling 시기는 6-12일, sampling 위치는 7-8번 앞에서 단백질 발현이 가장 높게 되는 것을 확인하였다 (그림 34).



그림 33. Vacuum inoculation 방법

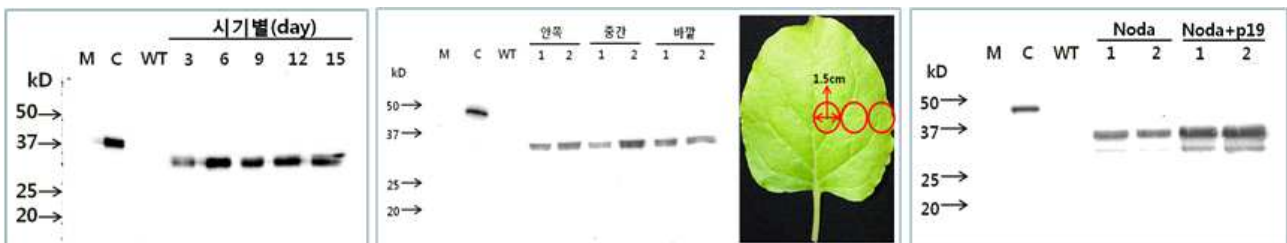


그림 34. Vacuum inoculation 조건에 따른 항원단백질 발현 검증



(라) pCAMBIA1302 vector를 이용하여 infiltration 통한 단백질 발현 확인

pCAMBIA1302 벡터의 GFP 유전자를 enzyme digestion으로 제거하고 여기에 Noda gene과 signal sequence가 fusion된 Noda gene을 삽입하여 2개의 벡터를 제작하였다 (그림 35). 최종 벡터를 Bio-rad의 MicroPulser를 이용한 electroporation 방법으로 agrobacterium GV3101, LBA4404, EHA105에 형질전환 하였다. 콜로니 PCR을 통하여 유전자 및 벡터의 도입이 확인된 Agrobacterium을 키워서 infiltration buffer에 O.D<sub>600</sub>=1.0으로 cell 농도를 맞춘 후 3-4주 된 *N. Benthamiana* 잎에 주사기를 이용하여 접종하였다. 접종 부위를 샘플링한 후 식물체 앞에서 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2 μm immun-blotTMPVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-mouse HRP-labeled를 1:5000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응 시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. 그 결과 두 벡터 모두에서 단백질 수준에서의 발현을 확인할 수가 없었다 (그림 36).

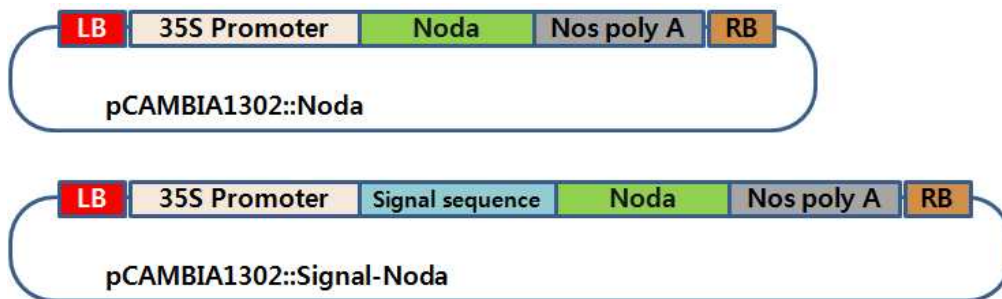


그림 35. pCAMBIA1302 적용 벡터

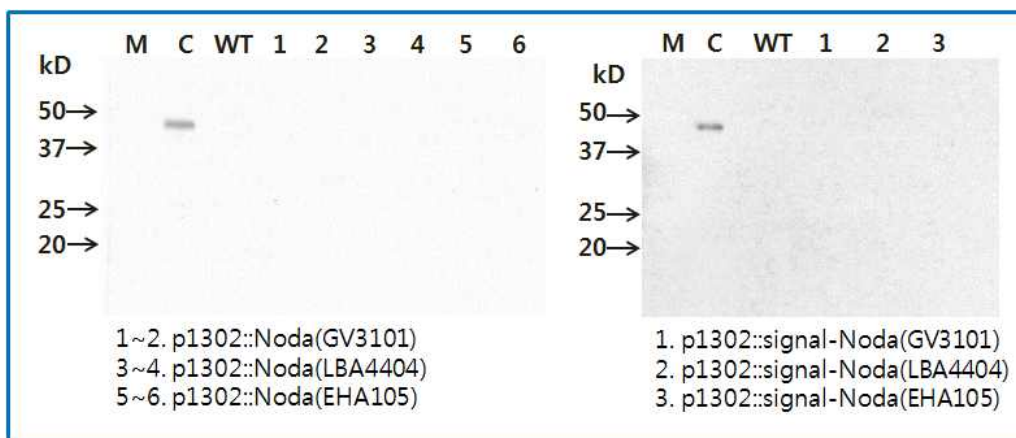


그림 36. pCAMBIA1302 적용 벡터 infiltration 식물체 항원단백질 발현

(마) 작물에 따른 일시적 발현 검증

앞서 실험을 진행한 담배 이외의 작물에서 infiltration을 통하여 일시적 발현을 검증하기 위하여 오크립 2종, 다채, 청정채, 근대, 상추 2종으로 실험을 진행하였다 (그림37).

Agrobacterium GV3101에 형질전환된 pTRAc-rbcs1-cTP::Noda vector를 이용하여 vacuum inoculation 방법을 통하여 최적 단백질 발현조건을 찾기 위한 실험을 진행하였다. 콜로니 PCR 을 통하여 유전자 및 벡터의 도입이 확인된 agrobacterium을 키워서 infiltration buffer에 O.D<sub>600</sub>=1.0으로 cell 농도를 맞춘 후 3-4주 된 *N. Benthamiana* 잎에 주사기를 이용하여 접종하였다. 접종 후 5일째에 접종 부위를 샘플링한 후 단백질 extraction buffer로 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 0.2 μm immun-blotTMPVDF membrane (Bio-Rad)에 transfer하여 5% skim milk 로 blocking하고 1차 항체로는 노다바이러스 항원단백질의 항체를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-mouse HRP-labeled를 1:5000의 농도로 사용하였다. Chemiluminescent substrate인 supersignal westpico (Thermo scientific)로 반응시킨 후 chemidocTMXRS+(Bio-Rad)를 통해서 확인하였고 대조구로는 대장균에서 발현시켜 정제한 단백질 (C, noda antigen)을 사용하였다. 그 결과 모든 식물체에서 단백질 발현이 확인되지 않았다 (그림38). 이와같은 실험 결과로 보아 infiltration을 통한 일시적인 단백질 발현 검증 테스트는 *N. benthamiana*가 가장 적합하다.



그림 37. 작물에 따른 일시적 발현검증 실험 작물

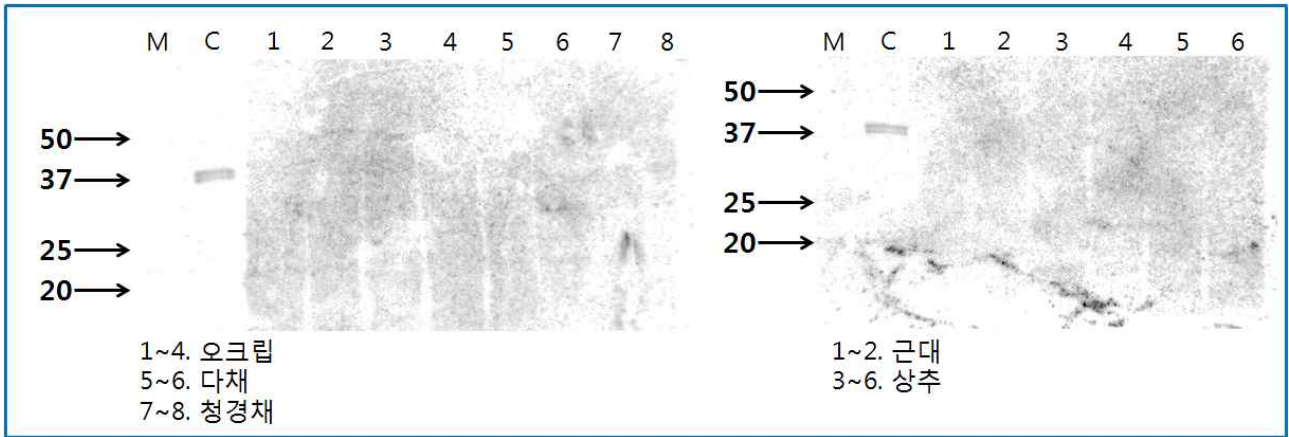


그림 38. 작물에 따른 일시적 발현검증 항원단백질 발현

## 2. 형질전환 담배 유래의 경구용 노다바이러스 백신의 효능 검증

### 가. 노다바이러스 rCoat protein에 대한 항체생산

#### (1). 항원접종 및 항체발현 확인

순수분리된 rCoat protein을 항원으로 이용하여 anti-rCoat protein Ab를 생산함. 이를 위하여 6주령 암컷 토끼 (New Zealand albino)에 재조합 항원 500  $\mu$ g을 Freund's complete adjuvant 500  $\mu$ l와 혼합 후 피하접종을 실시하였다. 이후 2주 간격으로 동량의 항원에 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 2회 더 boosting을 실시하였고 최종 접종 후 7일 후 토끼를 희생하여 혈청을 분리하고 항원-항체반응을 Seo 등 (2013) 아래와 같은 ELISA 방법으로 확인하였다.

rCoat protein으로 coating된 ELISA plate (1  $\mu$ g/ml, 90  $\mu$ l씩 항원 coating 실시)를 1% BSA sol.로 blocking하고 1차 항체로는 토끼의 혈청을 1:500 희석하여 사용하였고 2차 항체로는 Goat anti-rabbit HRP-labeled (1:5000)으로 이용하여 반응하고 발색을 한 다음 405 nm의 흡광도에서 ELISA reader로 측정하여 OD값의 차이가 항체의 생성으로 해석하였다. 그 결과, 음성 대조군은 OD값이 0.72 ( $\pm$ 0.2)인 반면 실험군의 OD값은 2.77 ( $\pm$ 0.07)로 통계적으로 매우 유의성있게 높은 ( $P < 0.001$ ) 높은 항체를 형성하였음을 확인하였다.

#### (2). 단클론항체의 역가 및 반응능 확인

별도로 준비한 3 clone의 단클론항체 (B13, B26, E54)에 대한 역가 test 및 반응능 test를 실시하였다. rCoat protein의 농도를 1  $\mu$ g/ $\mu$ l의 농도로 SDS-PAGE에 전개 후 Western blot을 위해 transfer하고 각 clone별 항체의 원액을 아래 그림 4과 같이 희석하여 항체의 희석에 따른 Western blot상의 반응능을 확인하였다. 그 결과, 3개의 clone 모두 1:100,000의 희석비에서도 항원-항체반응을 보여 양호한 반응능을 보여여주었다 (그림 39).

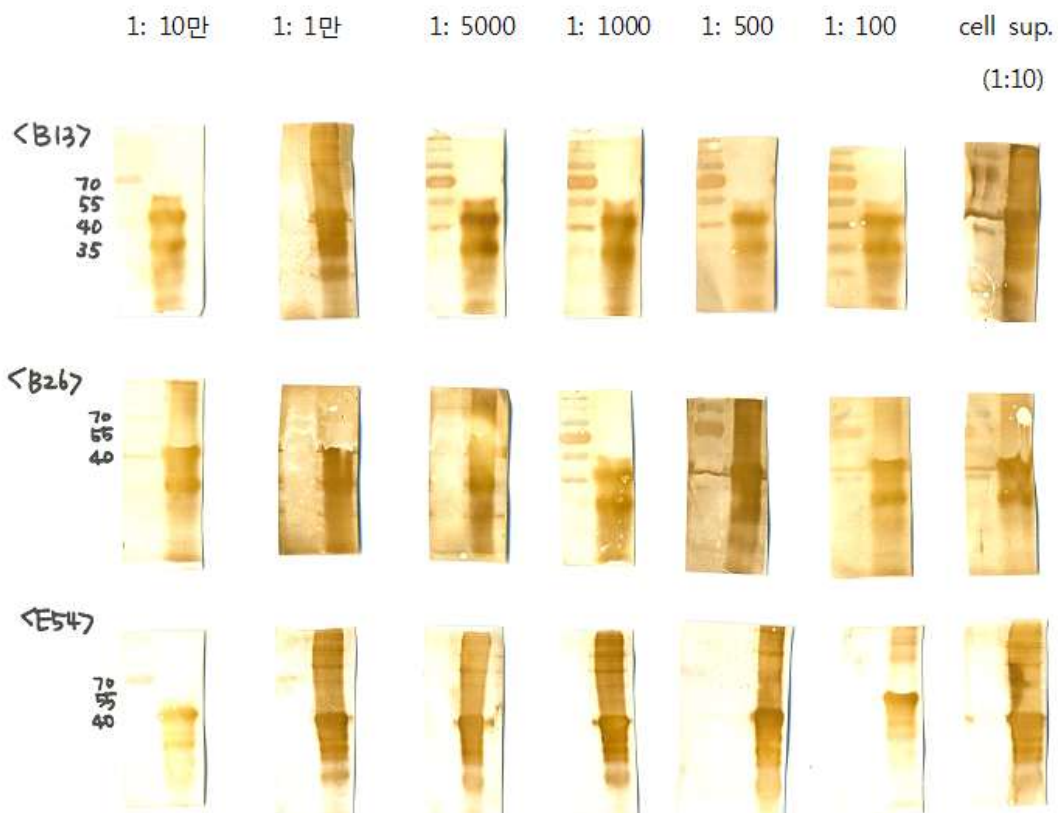


그림 39. 각 clone별 항체 희석 후 재조합 항원에 대한 반응검증 (Western blot)

나. 항체가 상승을 위한 키토산 formulae 개발

(1) 키토산 formulae 개발을 위한 resin 합성가능여부 확인

키토산 결정화제인 STP (sodium triphosphate)를 첨가함으로써 키토산의 resin formation 여부를 확인하기 위해 다양한 조건의 용매를 선택하여 결정화를 시도하였다. 여러 가지의 키토산 대상 중에서 생체자극이 덜하고 점막면역자극효과가 기대되는 CM-chitin 사용하여 본 실험에 이용하였으며 CM-chitin (Sigma)를 서방형 (sustained-releasing form)으로 전환하기 위해 resin-form으로 변형하기 위한 실험을 실시하였다.

키토산 결정화제인 STP (sodium triphosphate)를 첨가하여 resin을 만들기 위해 아래 표 2와 같은 다양한 조건의 용매를 사용하여 CM-chitin을 녹인 후 결정화를 시도하고 여러농도의 solvent (산 또는 염기)에 chitin을 녹인 후 STP 15% sol을 첨가하여 resin을 제조하였다 (표 3). 실험결과 액상 CM-chitin을 그대로 사용하기로 결정하였다.

표 3. 키토산 resin을 만들기 위한 solvent의 성상 및 resin 형성 결과

Solvent 성상	CM-chitin resin 형성
2% acetic acid (pH 7.14)	Not formed
2% acetic acid (pH 9)	Not formed
2% acetic acid (pH 11)	Not formed
2% acetic acid (pH 12.34)	Not formed
1N NaOH	Not formed
2N NaOH	Not formed
1N KOH	Not formed
12% NaOH/4% Urea*	Partially formed

\*생리적 독성으로 인해 본 실험에서는 사용하지 않음

(2) 실험동물 (마우스)을 이용한 예비실험으로 CM-chitin의 adjuvant로서의 효과 확인실험: IM route를 통한 IgG 유도 확인 실험

예비실험으로 아래 표 4과 같이 Bovine Serum Albumin (BSA)를 항원으로 이용하여 CM-chitin의 adjuvant 효과를 확인하였다. Group당 mouse 3마리씩, 2주 간격으로 2회 더 boosting 실시 후 채혈하고 혈중 IgG 농도를 확인하였다.

표 4. 키토산의 adjuvant로서의 효과를 알아보기 위한 조제의 구성

Group	Composition (피하투여, SC)
1	PBS 100 uL
2	BSA* 25 uL + PBS 75 uL
3	BSA 25 uL + FCA** 50 uL + PBS 75 uL
4	BSA 25 uL + CM-chitin*** 15 uL + PBS 60 uL
5	BSA 25 uL + CM-chitin 30 uL + PBS 45 uL
6	BSA 25 uL + CM-chitin 60 uL + PBS 15 uL

\*BSA: 1mg/ml, \*\* FCA: Freund's complete adjuvant, \*\*\* CM-chitin: final 1% sol.



위 실험결과를 확인하기 위해 ELISA로 항체가를 측정하였다. 즉, 접종된 마우스에서 채혈 후 혈청을 분리하고 이 혈청내의 항체가 (IgG titer)를 확인함으로써 CM-chitin의 adjuvant로서의 효과를 확인하였다. BSA를 항원으로 coating (1 ug/uL) 후 마우스 혈청 (1:100희석)을 1차 항체로, 염소 항-마우스 IgG HRP-labeled를 2차 항체로 사용한 후 발색시킨후 ELISA reader를 이용하여 OD<sub>405nm</sub>에서 흡광도를 측정하였다 (표 5).

표 5. 키토산의 adjuvant로서의 효과를 알아보기 위한 실험 결과

Group	OD <sub>405nm</sub>
1	0.745
2	0.621
3	1.689
4	<b>1.579</b>
5	<b>1.61</b>
6	<b>1.629</b>

실험결과, 음성대조군 (group 1, 2)은 항체가가 유도되지 않았지만 FCA를 이용한 양성대조군 (group 3)의 항체가에 비해 실험군들 (group 4, 5, 6)도 항체가를 효과적으로 유도함을 확인하였다. 즉, 마우스에서 CM-chitin이 adjuvant로서의 역할을 수행함을 확인하였다.

(3) 실험동물 (마우스)을 이용한 예비실험으로 CM-chitin의 adjuvant로서의 효과 확인실험: oral route를 통한 IgA 유도 확인 실험

예비실험으로 아래 표 6와 같이 Bovine Serum Albumin (BSA)를 항원으로 이용하여 CM-chitin의 adjuvant 효과를 확인하였다. Group당 mouse 3마리씩, 2주 간격으로 2회 더 boosting 실시 후 회장전단부 및 말단부 sampling 한 후 장점막 내 IgA 농도를 측정하였다.

표 6. 경구투여를 통한 키토산의 adjuvant로서의 효과를 알아보기 위한 조제의 구성

Group	Composition (경구투여, oral)
1	BSA* 25 uL + PBS 75 uL
2	BSA 25 uL + FCA** 50 uL + PBS 75 uL
3	BSA 25 uL + CM-chitin*** 15 uL + PBS 60 uL
4	BSA 25 uL + CM-chitin 30 uL + PBS 45 uL
5	BSA 25 uL + CM-chitin 60 uL + PBS 15 uL

\*BSA: 1mg/ml, \*\* FCA: Freund's complete adjuvant, \*\*\* CM-chitin: final 1% sol.

위 실험결과 확인을 위해 ELISA를 실시하였다. 구강투여된 마우스의 회장부위 (전단부 및 말단부)를 채취 후 PBS로 washing하고 장점막에 존재하는 IgA를 회수하여 항체가 (IgA titer)를 확인함으로써 CM-chitin의 adjuvant로서의 효과를 확인하였다.

BSA를 항원으로 coating (1ug/uL) 후 마우스 혈청 (1:100희석)을 1차항체로, 염소 항-마우스

IgA HRP-labeled를 2차항체로 사용한 후 발색시킨 후 ELISA reader를 이용하여 OD<sub>405nm</sub>에서 흡광도를 측정하였다 (표 7). 실험결과, 음성대조군 (group 1,2)은 항체가 유도되지 않았지만 실험군들 (group 4, 5)은 항체를 효과적으로 유도함을 확인함으로써 (\*P<0.001) → CM-chitin이 경구투여로도 adjuvant로서의 역할을 수행함을 알 수 있었다.

표 7. 경구투여를 통한 키토산의 adjuvant로서의 효과를 알아보기 위한 실험 결과

Group	OD 405nm	
	회장전단부	회장말단부
1	0.232	0.409
2	0.235	0.234
3	0.066	0.075
4	0.775*	1.670*
5	0.463*	1.226*

#### (4) rCoat protein의 능성어에서 항원성 확인 실험

기존 연구결과, 마우스에서는 rCoat이 항원성을 보임을 밝힌 바, 실제 숙주동물인 능성어류 (다금바리)에서 항원성이 인정되어 항체유도를 하는지 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 소규모 실험으로 rCoat 항원을 준비하고, 2개의 group을 다음과 같이 준비하였다. Group당 능성어 치어 3마리씩, 2주간격으로 2회 IP route로 더 boosting 실시하여 혈액 내 IgM 농도 측정하고 (Salinas 등 (2011)에 의하면 어류는 Ig의 class가 규명되지 않고 IgM만 존재함이 현재까지 밝혀진 바, 공히 IgM으로 검사함) 접종은 아래 표 8과 같이 실시하였다.

항체유도확인을 위해 ELISA를 실시하였다. 항원은 rCoat를 이용하였고 (1 ug/uL) 1차항체는 능성어의 혈청시료를 (1:100), 2차 항체는  $\alpha$ -grouper IgM mAb (1: 500, Aquatic Diagnostics, UK)를 이용하였으며 ELISA reader를 이용하여 OD<sub>405nm</sub>에서 흡광도 측정한 결과는 위 표 8과 같았다.

표 8의 결과를 도식화하면 아래 그림 40와 같이 통계적으로 유의성있게 (P < 0.05) 항체가 유도됨을 알 수 있었다.

표 8. rCoat protein의 항원성을 확인하기 위한 조제의 구성 및 그 결과

Group	Composition (IP)	OD 405nm ( $\pm$ SD)
1	rCoat* 20 ug + FCA (FICA)** 20 uL	0.18 (0.023)
2	rCoat 20 ug + PBS 75 uL	0.09 (0.006)

\*rCoat: 1mg/ml, \*\* Freund's complete (incomplete) adjuvant

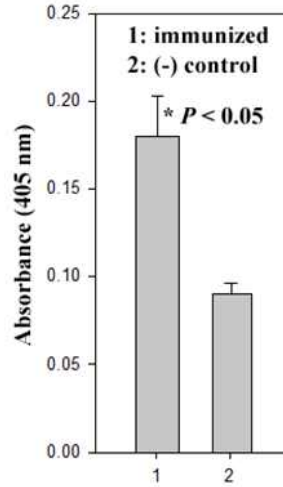


그림 40. 노다바이러스 항원단백질의 항체가 확인

rCoat 항원이 능성어류의 면역기관인 신장에서 염증반응을 통해 면역세포의 침착 및 조직학적인 변화가 있는지 알아보기 위해 조직절편을 준비하였다. 즉, 능성어류에 rCoat 접종 후 부검에서 신장 두부조직 (두부가 면역반응을 담당하는 기관이고 미부는 비뇨기 담당기관임)을 채취하여 파라핀 포매 후 H&E stain을 실시하고 현미경 관찰 (400X)을 통해 염증세포의 침착을 확인하였고 그 결과, 다수의 호중구 및 염증세포가 침착됨을 확인하였다 (그림 41).

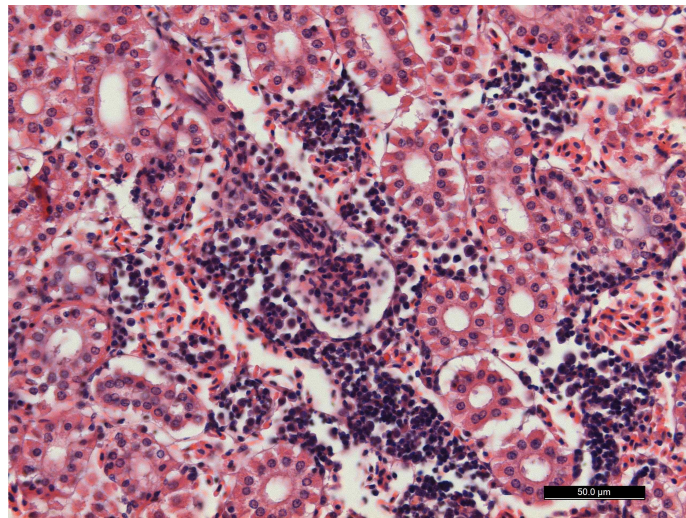


그림 41. rCoat 접종 후 나타나는 호중구 및 염증세포의 침착

#### (5) CM-chitin의 능성어에서 adjuvant로서의 효능 확인 실험

능성어에서 확인된 rCoat (FCA를 adjuvant로 이용할 경우)의 항원성에 대해 본 연구에서 활용하고자 하는 CM-chitin이 adjuvant로서 효능이 있는지 확인하기 위한 실험을 실시하였다. B-4와 유사한 방법으로 adjuvant로서 FCA를 사용하지 않고 CM-chitin을 사용하였으며 소실험으로 rCoat 항원을 준비하고, 2개의 group을 준비하였다.

Group당 능성어 치어 3마리씩, 2주 간격으로 2회 IP route로 더 boosting 실시하고 혈액 내 IgM 농도를 측정하고 (어류는 Ig의 class가 완전히 규명되지 않고 IgM만 존재함이 현재까지 밝혀진



바, 공히 IgM으로 검사함) 접종은 아래 표 9과 같이 실시하였다.

표 9. CM-chitin의 adjuvant로서의 효과를 확인하기 위한 조제의 구성 및 그 결과

Group	Composition (IP)	OD 405nm (±SD)
1	rCoat* 20 ug + CM-chitin 20 uL	0.177** (0.011)
2	rCoat 20 ug + PBS 75 uL	0.079 (0.006)

\*rCoat: 1 mg/ml, \*\* P < 0.05

항체유도확인을 위해 ELISA를 실시하였다. 항원은 rCoat를 이용하였고 (1 ug/uL) 1차항체는 능성어의 혈청시료를 (1:100), 2차 항체는  $\alpha$ -grouper IgM mAb (1:500, Aquatic Diagnostics, UK)를 이용하였으며 ELISA reader를 이용하여 OD<sub>405nm</sub>에서 흡광도 측정된 결과는 위 표9와 같았다. 이러한 결과를 통해 CM-chitin 역시 Freund's adjuvant에 상응하는 adjuvant로서의 효과가 있음을 알 수 있었다.

다. 어류 사료내의 담배 식물재료 최적 formulae 개발

(1) 어류사료 최대 함유율 측정

동물성 사료를 급이하는 능성어류에 있어 식물성 사료의 함유량이 먹이반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 식이거부반응 실험을 실시하였다. 식물분말을 이용하여 전체 사료에서의 식물함유량을 10, 20, 30%가 되도록 사료성분 조정 후 급이실험을 아래 표 10에 준해 실시하였다.

능성어 치어 9마리를 3 group으로 1일 2회 통상 급여와 동일한 조건으로 급이 실시하였으며 1주일 급이 후 다시 원래 사료를 1주일 급이하고 이 과정을 3회 반복하였다.

실험결과, 담배잎 분말에 대한 식이 거부반응 없이 모두 먹이반응 보임을 알 수 있었다. 담배잎 급이로 인한 장관내 특이 염증반응이나 부작용등도 관찰되지 않았다.

표 10. 식물사료 (담배잎)의 급이거부 반응을 확인하기 위한 조제의 구성

Group	Composition
1	능성어 사료 90% + 담배잎 분말 10% (w/w)
2	능성어 사료 80% + 담배잎 분말 20% (w/w)
3	능성어 사료 70% + 담배잎 분말 30% (w/w)

라. 공격접종을 위한 노다바이러스 순수분리 및 배양

(1) 1차 바이러스 순수분리

노다바이러스로 의심되는 개체로부터 Frerichs 등 (1996)의 방법에 준하여 뇌 (척수포함)를 시료채취하고 이것으로부터 바이러스 순수분리 시도하였다. 이를 위해 뇌시료 채취 후 tissue grinder를 이용하여 시료를 세절하고 원심분리 실시 (10,000 rpm/30 분)하였다.

상층액만 회수 후 0.45 uM membrane filter를 이용하여 filtration 후 시료 중 소량을 취하여 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성 후 RT-PCR 실시하여 감염확인하였다 (그림 42).

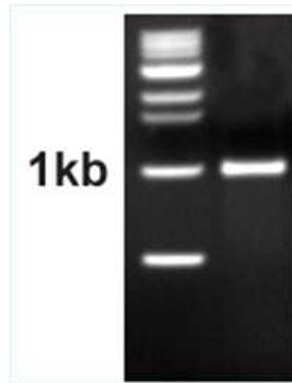


그림 42. RT-PCR을 통한 바이러스 존재여부 확인

세포 lysate 시료를 약 65-70% confluence의 SSN-1 cell에 접종하고 CPE 관찰 실시하였다. 접종 후 약 2-3일째부터 CPE가 약하게 관찰되고 5-7일째 확실한 CPE를 생성하였다 (그림 43). 바이러스 stock을 LN2 tank내 보관 실시하고 이후 실험에 이용하였다.

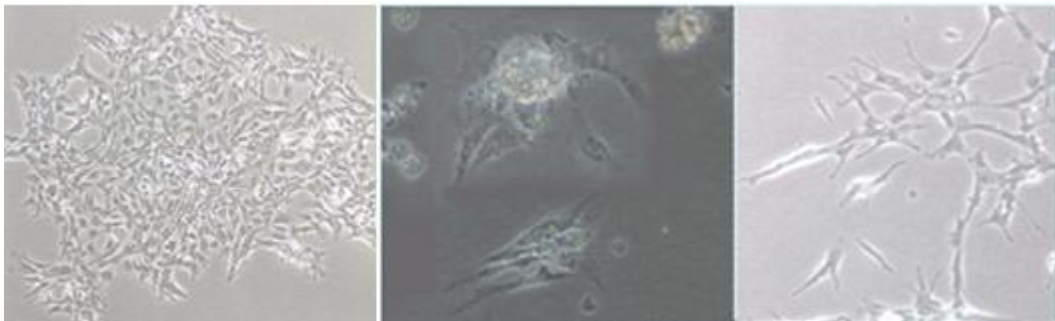


그림 43. 좌: 바이러스 접종 전의 SSN-1 cell (약 65-70% confluence), 우: 바이러스 접종 후 2-3일째 CPE를 형성한 모습

## (2) 2차 (추가) 바이러스 순수분리

전년도에 확보한 VNNV 이외에 추가로 2012년도에 발생한 VNNV 감염 의심 개체로부터 바이러스 순수분리 시도하였다. 뇌시료 채취 및 VNNV 분리는 이전 연도의 방법에 준하여 실시하였다.

VNNV 유전자 확인을 위해 sequencing 분석 실시 결과, VNNV의 coat protein sequence임을 확인하였다 (기 분리된 2012년 이전의 VNNV coat protein 유전자 sequence와 상동, 그림 44).

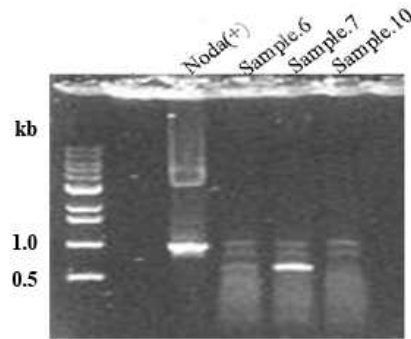


그림 44. RT-PCR을 통한 바이러스 존재여부 확인

세포 lysate 시료를 약 65-70% confluence의 SSN-1 cell에 접종하고 CPE 관찰 실시하였다. 새로이 분리된 VNNV stock을 LN2 tank내 보관 실시하고 이후 실험에 이용하였다. 바이러스 존재여부가 확인된 3개의 시료 #6, 7, 10에서 CPE를 형성하였다 (그림 45)

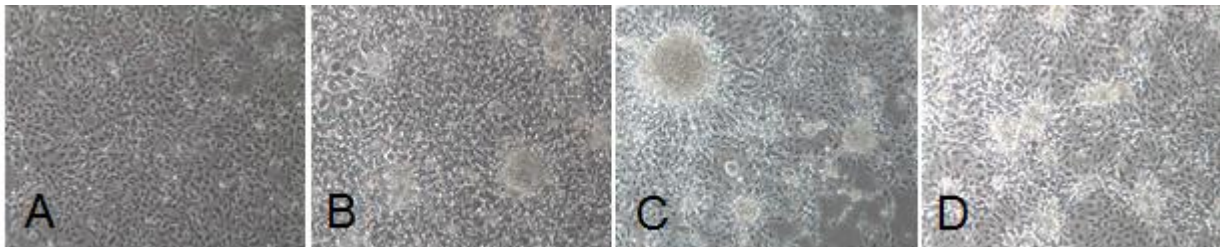


그림 45. A: 바이러스 접종 전의 SSN-1 cell (약 65-70% confluence), B-D: 바이러스 접종 후 2-3일째 CPE를 형성한 모습 (각각 #6, 7, 10 시료)

### (3) Virus titration

분리된 야외형 VNNV을 공격접종 및 이에 대한 생존율 조사를 실시하기에 앞서 titration 을 실시하여 역가를 측정하였다. Titration은 TCID50을 측정하여 실험에 이용하였다. SSN-1 cell에 VNNV stock을  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ , 그리고  $1 \times 10^4$ 배로 희석하여 CPE 빈도수를 구하여 TCID50을 구한 결과는 아래 표 11와 같다.

표 11. VNNV 공격접종을 위한 TCID50/ml 계산법

virus dilution factor	infected test unit	cumulative infected(A)	cumulative non-infected(B)	A/(A+B)	% infected
-1	5/5	10	0	10/10	100
-2	4/5	5	1	5/6	83.4
-3	1/5	1	5	1/6	16.7
-4	0/5	0	10	0/10	0

↓

103.25 TCID/ml임을 확인

마. 담배유래의 항원에 대한 마우스에서 항체유도 확인 실험

(1) 담배에서 발견된 rCoat protein을 이용한 면역실험

담배에서 Nodavirus coat protein이 발견됨을 확인하기 위해 Western blot을 실시하였다. 즉, 색소체형질전환체 3종 (#1-3, 2-3, 5-6)의 단백질 시료를 준비하고 이를 SDS-PAGE에 전개 후 (그림 46-좌), anti-coat protein 항체를 이용하여 Western blot을 실시하여 (그림 46-우) 단백질의 발견을 확인하였다.

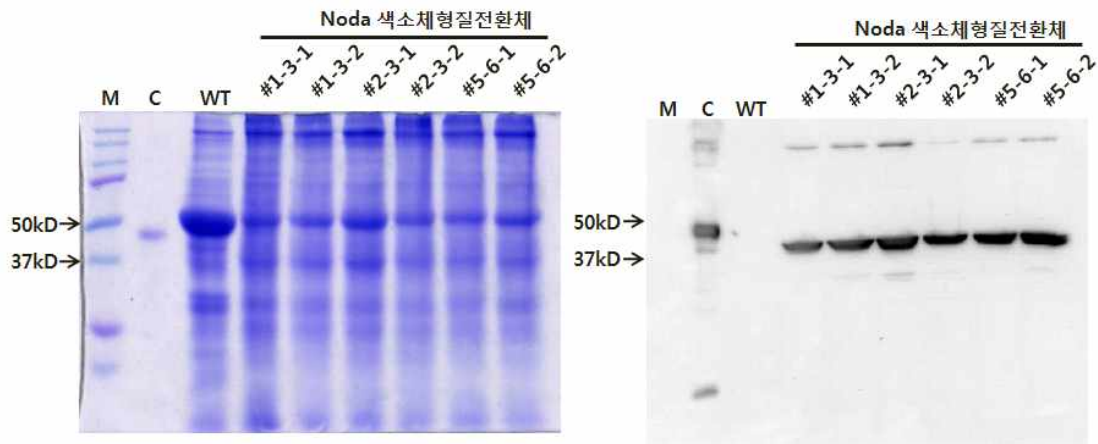


그림 46. 좌: #1-3, 2-3, 5-6 3개의 형질전환체의 단백질 시료를 SDS-PAGE에 전개 후 (좌), anti-coat protein Ab를 이용하여 Western blot을 실시한 결과

이후 담배에서 발견되는 재조합 단백질의 농도를 측정하였다. 각 시료의 단백질 시료를 이용하여 대장균에서 발견된 재조합 항원을 비교군으로 하여 농도비를 계산하였다. 즉, 대장균에서 발견된 기원의 농도를 희석하여 시료를 전개하고 색소체형질전환체로 부터의 단백질 시료를 비교하여 그 상대농도를 측정하였다. 그 결과, 그림 47에서 보는 바와 같이 Western blot의 결과를 얻을 수 있었고 이를 densitometer를 이용하여 상대농도비를 계산한 결과, 0.487 ug/uL의 농도를 얻을 수 있었다.

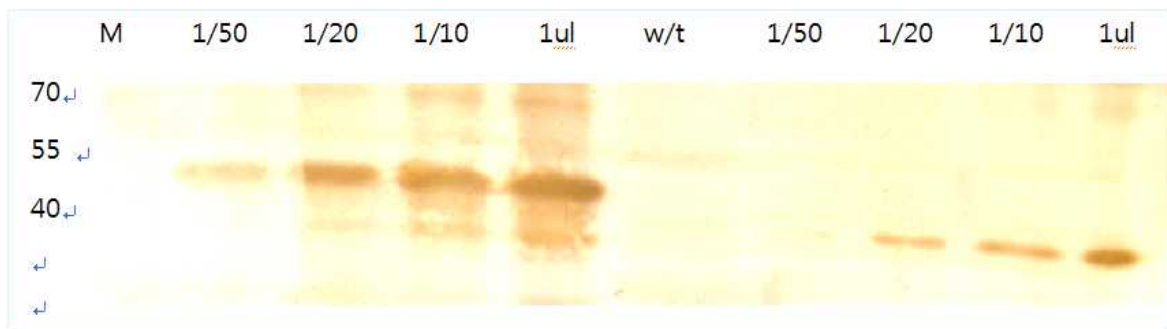


그림 47. 재조합 항원의 농도별 발현량 조사. (좌) 대장균 유래, (우)담배 색소체형질전환체 유래

(2) 담배유래의 항원에 대한 마우스에서 항체유도 확인 실험

담배에서 Nodavirus coat protein이 확인됨에 따라 이를 이용한 실험동물에서의 항체유도능

실험을 실시하였다. 6주령 암컷 ICR mouse를 준비 후 총 4개의 group으로 선별함. Group 1는 식물발현 재조합 항원 formulae를 먹이기만 한 group, group 2은 대장균에서 발현된 재조합 항원을 1회 주사하여 mouse에서 항원 감각 (priming)을 시킨 후 식물발현 재조합 항원 formulae를 먹인 group 이고 group 3는 대장균에서 발현된 재조합 항원을 1회 주사하여 mouse에서 항원 감각 (priming)을 시킨 후 1회 boosting 주사를 더 실시하고 식물발현 재조합 항원 formulae를 먹인 group 으로 구분함. 일반사료만을 급이한 group은 음성대조군 (group 4)으로 사용하였다. 급이는 각각의 group에서 식물체 함유량이 10% 및 20%가 되도록 다시 2 group으로 세분하여 급이를 실시함. 각 group별 주사 및 급이 formulae는 아래 표 12과 같다.

표 12. 각 group별 immunization 방법 및 마우스 개체수

Group	immunization and feeding formulae	Trial number
1	급이군	#1 sample total 10% 3
		2 sample total 20% 3
2	1차 면역 (priming) 후 급이군	#1 sample total 10% 3
		#2 sample total 20% 3
3	1차 면역 (priming) 후 1회 boosting 후 급이군	#1 sample total 10% 3
		#2 sample total 20% 3
4	음성대조군 (일반사료 급이군)	3

(가) Immunization of mouse

Priming 접종을 위한 항원은 5 ug Ag/mouse/1회로 준비하여 Freund' s complete adjuvant (FCA)와 혼합하여 피하로 주사하였다. Boosting 때에는 동일한 항원에 Freund' s incomplete adjuvant (FIA)를 혼합하여 사용하였다. 급이를 위한 항원의 준비는 각 % 농도에 맞게 식물사료를 섞고 총 항원이 10% 및 20% group별로 각각 1.5 ug과 3.0 ug의 항원이 포함되도록 준비한 다음 급이를 실시하였다. 급이는 매주 1회 총 4회 투여하였다.

(나) IgA 및 IgG 측정

급이를 통한 최종 면역 후 7 일째 마우스를 희생하여 혈액 및 소장 시료를 채취하여 항체를 측정하였다. 즉, 소장 부위를 약 3 cm 정도 채취한 뒤 장 관강내 분변을 제거하고 소장시료와 PBS 0.5ml을 합하여 Tissue grinder로 세절한 다음 원심분리하여 상층액을 채취하였다. 이 상층액 내의 IgA 농도를 측정하기 위해 96-well plates에 대장균내에서 발현 및 순수분리된 재조합 항원을 1 ug/well/90 ul로 coating 한 후 1% skim milk를 첨가한 PBS로 blocking하고, PBST (PBS+0.05% Tween-20, pH7.4)로 3회 washing하였다. 측정하고자하는 시료의 상층액을 1차항체로 사용하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, PBST로 3회 washing단계를 거쳐 2차항체를 goat anti-mouse IgA HRP-conjugated를 1:500으로 희석한 후, 사용하였고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, PBST로 3회 washing단계를 거쳐 면역하지 않은 마우스의 장샘플을 음성대조군으로 실험을 진행하였다. 결합된 2차 항체의 검출은 기질용액 [100 mM citric acid buffer, pH4.0, ABTS stock solution, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]을 이용하여 발색을 실시하였다. 이후 암실에서 기질용액과의 반응시간을 5분동안 실시한 후, 흡광도 OD<sub>405nm</sub>에서 ELISA reader를 이용하여

OD값을 측정하였다. 유사한 방법으로 혈액에서 채취한 혈청 시료를 PBS로 1: 100 희석한 다음 위의 방법에 준하여 ELISA를 실시하였다. 단, 이때 2차 항체는 goat anti-mouse IgG HRP-conjugated를 사용하였다.

(다) IgA 항체가 측정 결과

소장에서 채취한 시료중의 IgA를 측정한 결과는 아래 그림 13과 같다. 즉, 각 실험군의 20% 투여군에서 통계적으로 유의성 있게 ( $P < 0.05$ ) 항체가가 상승하는 것을 볼 수 있었다.

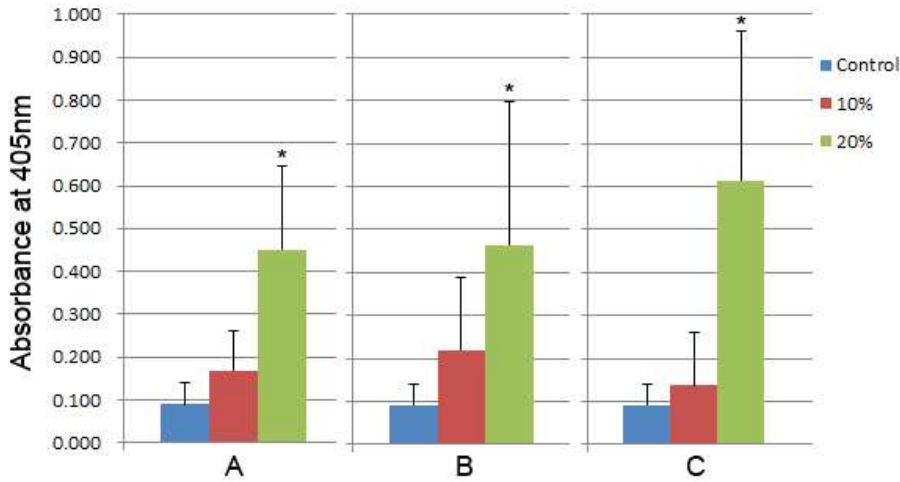


그림 48. 각 실험군별 IgA 항체가. A: 급이만 한 group #1, B: 1회 priming 후 급이한 group #2, C: 1회 priming과 1회 boosting 후 급이한 group #3. \*:  $P < 0.05$ .

(라) IgG 항체가 측정 결과

각 기간별로 채취한 혈액시료내에 존재하는 재조합항원에 대한 항체 (IgG)의 존재여부 및 그 농도를 측정한 결과는 아래 그림과 같다. 즉, 급이만 한 group 1에서는 통계적으로 유의성 있게 항체가가 상승하지 않았으나 (그림 49-A), priming을 통한 항원인식이 된 group에서는 급이를 통해 항체가의 상승을 유도할 수 있었다



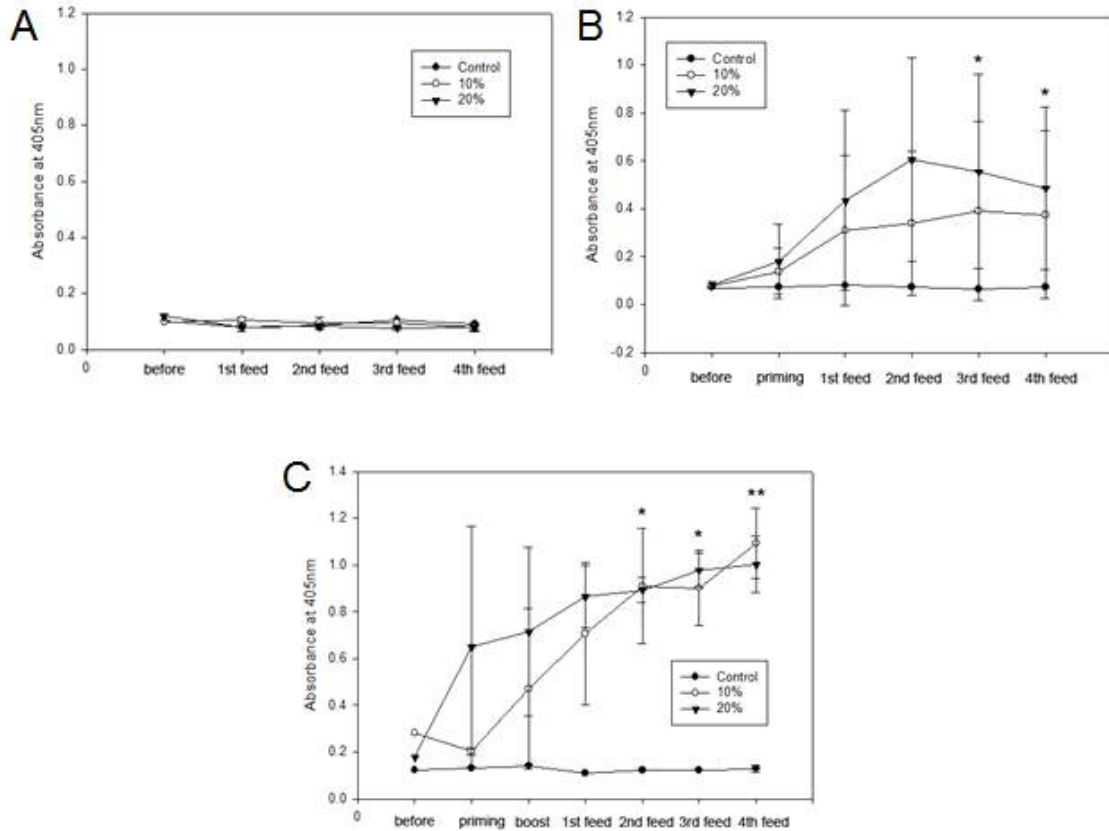


그림 49. 급이 및 주사를 통한 항원인식 후 혈중 IgG의 변화

비투여군 및 10%, 20% 급이군에서 통계적으로 유의성있는 항체가 상승은 보이지 않으며 (그림 49A), 주사 (priming)를 통한 항원인식 후 급이를 통해 IgG 항체가 통계적으로 유의성 있게 (\*  $P < 0.05$ ) 상승됨을 보여준다 (그림 49B). 주사 (priming) 및 boost를 통한 항원인식 후 급이를 통해 IgG 항체가 통계적으로 유의성 있게 (\*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ) 상승됨을 확인 할 수 있다 (그림 49C)

### (3) mouse에 공격접종 후 viral clearance 효과 검증

항원 투여 및 이로 인한 항체가 생성에 이은 야외형 VNNV 공격접종 및 항체로 인한 viral clearance의 정도를 비교하기 위하여 VNNV stock 1 ml을 복강으로 주사하고 접종 후 3일째 마우스를 희생하고 비장을 채취하여 잔류하는 VNNV의 titer를 real-time PCR로 정량분석을 실시하였다. 이를 위해 mouse 비장으로부터 RNA를 추출하고 VNNV 검출을 위해 cDNA를 합성하고 이를 template로 하여 SYBR® Green dye를 첨가하여 총 45 cycles로 정량 real-time PCR을 수행하였다.

threshold cycle number (Ct value)를 계산하여 Ct value가 1씩 상승 및 하강함에 따라 2배 농도의 RNA (=cDNA)가 감소하거나 잔류하는 것으로 해석하였다 (Ct value가 낮음 = virus RNA 양이 많음 = clearance가 일어나지 않았다. 즉, 항체가 낮아서 virus가 더 오래 생존함).

실험 결과, section B의 group 별로 아래와 같은 결과를 얻었다. 즉, 항체가 형성되었던 group에서 통계적으로 유의성있게 virus의 잔류가 줄어 clearance가 빨리 일어남을 알 수 있었다 (그림 50). Group #2와 #3의 경우 음성대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 ( $P < 0.01$ ) virus



의 clearance가 일어나 Ct value가 증가함을 보여주었다 (표 13).

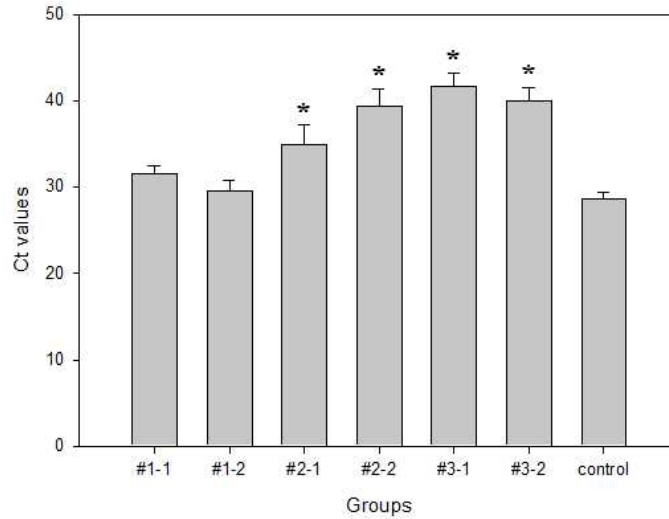


그림 50. 각 group별 VNNV coat protein 유전자에 대한 정량 real-time PCR결과

표 13. 각 group별 Ct value의 차이와 그에 따른 viral clearance로 인한 virus titer의 차이 환산표. Control을 기준으로 환산된 virus의 clearance 정도 차이 (몇 배).

Groups	mean Ct value	SD	control-value	Viral clearance
group 1-1	31.53	1.0063	2.93	7.63 times
group 1-2	29.53	1.2369	0.94	1.92 times
group 2-1	34.97	2.2527	6.37	82.71 times
group 2-2	39.31	2.0562	10.72	1686.71 times
group 3-1	41.62	1.5684	13.02	8306.35 times
group 3-2	39.98	1.6072	11.38	2665.16 times
control	28.59	0.8108	0	0 times

바. 담배유래의 항원에 대한 목적동물 (능성어)에서의 항체유도 확인 실험

가. 담배유래의 항원에 대한 능성어에서 항체유도 확인 실험 (1차 예비실험)

식물 (담배)에서 발견된 재조합 항원 단백질을 목적동물인 능성어에 투여함으로써 항체생성 유도능이 있는지를 검사하기 위해 실시하였다. 예비 1차 실험으로 급이만을 통해서도 항체유도가 가능한지 알아보기 위하여 10g ( $\pm 1$  g)정도의 무게를 보이는 능성어 치어를 준비 후 총 3개의 group으로 선별함. Group 1은 일반 사료를 먹인 control 15마리, group 2와 3은 담배에서 발견된 재조합 항원을 각각 1.2 ug 또는 3 ug을 함유한 사료를 경구투여한 한 group으로 각각 15마리씩 준비하였다. 급이는 매주 1회 총 3회 투여하였다 (표 14).

표 14. 각 group별 immunization 방법 및 능성어 개체수

Group	formulae	method
1	control	-
2	1.2ug of recombinant coat protein in tobacco	oral
3	3ug of recombinant coat protein in tobacco	

(가) IgM 측정

급이를 통한 최종 면역 후 6 일째 능성어로부터 혈액을 채취하여 항체를 측정하였다. 혈액 내 IgM을 측정하기 위하여 항응고 처리한 혈액 원심 분리 후 1:100으로 PBS로 희석하여 준비하였다. 이 후 96-well plates에 대장균내에서 발현 및 순수분리된 재조합 항원을 1 ug/well/90 ul로 coating 한 후 1% skim milk를 첨가한 PBS로 blocking하고, PBST (PBS+0.05% Tween-20, pH7.4)로 3회 washing하였다. 측정하고자하는 시료의 상층액을 1차항체로 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, PBST로 3회 washing단계를 거쳐 2차 항체를 mouse anti-grouper IgM 항체를, 그리고 3차 항체로 goat anti-,mouse IgG HRP-conjugated를 1:500으로 희석한 후, 사용하였고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, PBST로 3회 washing단계를 거쳐 면역하지 않은 group #1의 시료를 음성대조군으로 실험하였다. 결합된 2차 항체의 검출은 기질용액 [100 mM citric acid buffer, pH4.0, ABTS stock solution, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]을 이용하여 발색을 실시하였다. 이후 암실에서 기질용액과의 반응시간을 5분 동안 실시한 후, 흡광도 OD<sub>405 nm</sub>에서 ELISA reader를 이용하여 값을 측정하였다.

실험 결과, 1.2-3 ug의 항원을 급이만을 통하여서는 유효한 수준의 항체를 유도할 수 없었다 (그림 51). Group 1은 일반 사료 급이만 한 음성대조군, group 2와3은 담배 내 재조합 항원을 각각 1.2 ug 및 3 ug을 함유한 사료 경구투여군이다.

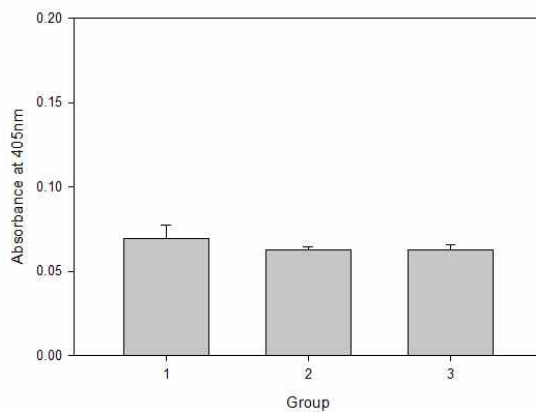


그림 51. 각 실험군별 IgM 항체가 검증

(2) 담배유래의 항원에 대한 능성어에서 항체유도 확인 실험 (2차 예비실험)

식물 (담배)에서 발현된 재조합 항원 단백질을 목적동물인 능성어에 투여함으로써 항체생성 유도능이 있는지를 검사하기 위해 실시하였다. 1차 예비실험의 결과, 소량 (1.2-3 ug)의 항원을 급이만을 통해서 능성어에 있어 유효한 수준의 IgM을 유도하기 어려워 항원량을 늘리고 재조합 항원의 주사를 통한 priming을 실시하여 효과적인 항체생산을 유도하였다. 10 g (± 1 g)

무게를 보이는 능성어 치어를 준비 후 총 3개의 group으로 선별하였다. Group 1은 일반 사료를 먹인 control 15마리, group 2와 3은 담배에서 발현된 재조합 항원을 각각 5 ug 또는 10 ug을 함유한 사료를 경구투여만 한 group으로 각각 15마리씩 준비하였다. Group 4, 5는 대장균에서 발현된 재조합 항원을 1회 주사 (개체당 5 ug)하여 항원 감작 (priming)을 시킨 후 식물발현 재조합 항원 formulae를 먹인 group이다 (표 15)

Priming을 위한 복강내 항원주사 (IP)의 경우 adjuvant로는 수산용 MontanideTM (SEPPIC, France)을 사용하였다.

표 15. 각 group별 immunization 방법 및 능성어 개체수

Group	formulae	administration method
1	control	-
2	5 ug of recombinant coat protein in tobacco	oral only
3	10 ug of recombinant coat protein in tobacco	
4	5 ug of recombinant coat protein in tobacco	5 ug Ag priming (IP*)+oral
5	10 ug of recombinant coat protein in tobacco	

\* IP: intraperitoneal route

#### (가) IgM 측정

각 group별 급이를 통한 최종 면역 후 6 일째 능성어로부터 혈액을 채취하여 항체가를 측정하였다. 항체가의 측정은 상기 기술된 방법과 동일하게 실시되었다. 실험 결과, Group 1은 일반 사료 급이만 한 음성대조군이며, group 2와3은 담배 내 재조합 항원을 각각 1.2 ug 및 3 ug을 함유한 사료 경구투여군이다. 고농도의 항원 급이 및 주사 (priming)를 통한 항원인식 후 급이를 통해 IgM 항체가가 통계적으로 유의성 있게 (\* P<0.05, \*\*P<0.01) 상승됨이 확인되었다. 5-10 ug의 항원을 급이만을 통하여서도 통계적으로 유효한 수준의 항체를 유도할 수 있었고 (그림 52)의 group 2와 3, 각각 P<0.05 및 P<0.01), 재조합 항원의 주사를 통한 priming 후 급이를 통해서도 통계적으로 유효한 수준의 항체를 유도할 수 있었다 (group 4와 5, P<0.01). 그러나 항체의 유도 수준이 절대적으로 높지 않아 (최소 OD<sub>405nm</sub>에서의 absorbance가 0.3 수준 이상) 3회 이상의 추가적인 항원의 투여 또는 항원의 유효적정 농도 측정에 대한 보완이 필요할 것으로 판단된다.

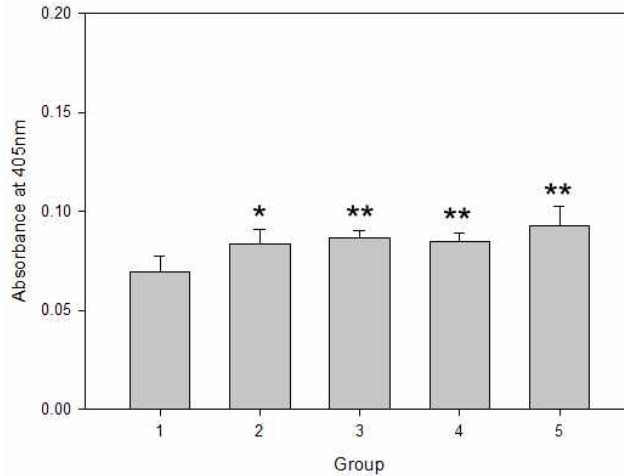


그림 52. 각 실험군별 IgM 항체가 검증

(나) 항원단백질 경구투여 후 어체조직의 병리조직학적 검사 (백신의 독성실험)

식물 (담배)에서 발현된 재조합 항원 단백질을 목적동물인 능성어에 투여함으로써 식물체 및 재조합 항원이 나타낼 수 있는 어체에 대한 위장관 장기독성평가실험을 실시하였다. 위장관 장기내 염증이나 기타 병리소견이 관찰되지 않는 것으로보아 경구투여에 의한 독성은 없는 것으로 판단하였다.

(3) mini/midi scale 공격접종 실시 및 상대생존율 조사 (본 실험)

추정된 VNNV stock 1 ml씩을 2차 항체유도 실험을 실시한 능성어 group별 15마리 중에서 무작위로 10마리씩을 선별하여 각 개체에 복강으로 VNNV를 주사하여 감염유발하고 1개월간 누적 치사량을 조사하고 발병 및 폐사한 개체의 뇌 및 척수조직으로부터 VNNV 유전자 검출을 실시하였다.

1개월간의 치사량을 조사한 결과는 아래 표 16와 같다. VNNV의 특성상 능성어의 급작스런 폐사는 관찰되지 않았으나 1주일이 경과하면서 그림 53과 같이 선회 등의 비정상적인 유행행동을 보이며 폐사가 나타나기 시작하였다. 그러나 VNNV의 대표적인 증상중의 하나인 망막의 괴사로 인한 백탁 등은 관찰되지 않았다.

비록 Fisher's Exact Test를 실시한 분석 결과, 통계적으로는 유의성있게 낮은 폐사율을 보이지 않았으나 음성대조군에 비해 group 5의 경우는 거의 1/2 수준의 폐사율을 보였다. 폐사한 개체들로부터 뇌조직을 채취하여 RT-PCR을 실시한 결과, 폐사 개체 모두에서 VNNV coat protein 유전자가 양성으로 검출되어 VNNV에 의한 폐사로 진단/확진된다.



그림 53. VNNV 접종 후 감염 능성어 개체

표 16. VNNV 공격접종으로 인한 누적폐사율 (각 group은 표 15과 동일하며 15마리 중 10마리 씩만을 무작위로 선택하여 공격접종을 실시함)

Group	formulae	cumulative death rate (%)
1	control	90
2	5 ug of recombinant coat protein in tobacco	*60
3	10 ug of recombinant coat protein in tobacco	70
4	5 ug of recombinant coat protein in tobacco	*60
5	10 ug of recombinant coat protein in tobacco	**50

- two-sided P value is \*0.3034 and \*\*0.1409 on Fisher' s Exact Test (P<0.5).

## 제 4 절 재조합 산업용 효소 생산 신제품 중 벼 개발

(제 1 핵심 3세부과제- (주) 엔비엠)

### 1. 식물유래 TEV endopeptidase 생산기술 개발 및 산업화

본 보고서는 5년간의 총 연구개발기간 동안 수행한 연구결과를 종합한 최종보고서로서 연구결과에의 이해를 돕기 위하여 연차별 주요 연구결과를 연구내용별로 취합하여 기술하였다.

가. 벼 현탁세포 고발현 system을 이용한 TEV endopeptidase 발현 식물의 제작

#### (1) Overlap-PCR을 이용한 TEV endopeptidase 유전자의 합성

벼 현탁세포에서 산업용 효소인 TEV endopeptidase를 발현하기 위해 유전자의 codon usage를 분석한 결과 각 아미노산에 해당되는 codon중에서 사용빈도가 낮아 벼에서 단백질로의 전환이 낮을 것으로 판단된 codon은 전체 codon 242개 중에서 100개가 해당되어 전체 codon중 약 41%에 해당되었다. 이러한 분석을 기초로 하여 벼에서 효율적으로 작용 가능한 염기서열을 설계하였으며 TEV endopeptidase 유전자 염기 사용빈도 분석결과를 아래의 표 1에, TEV endopeptidase 유전자 코돈 사용빈도 분석결과를 표 3-1-2에 나타내었음.

표 1. TEV endopeptidase 유전자 염기 사용빈도 분석

Base	Original seq. count (%)	Optimized seq. count (%)
A	224 (30.85)	221 (30.44)
C	148 (20.38)	151 (20.79)
G	164 (22.58)	150 (20.66)
T(U)	190 (26.17)	204 (28.09)

또한 기존 대장균등의 다른 발현 시스템에서의 선행 연구들을 살펴본 결과, amino acid 17번의 threonine을 serine으로 (T17S), 68번의 asparagine을 aspartic acid로 (N68D) 그리고 77번 isoleucine을 valine으로 (I77V)으로 mutation 시켰을 경우 효소의 solubility가 증가 되었으며, autolysis resistance를 위한 amino acid 219번의 serine을 valine로 (S219V) 치환하여 TEV endopeptidase의 안정성을 확보 하였다는 결과를 확인 하였다. 이 선행 연구들을 바탕으로, TEV endopeptidase를 벼에서 발현하고자 벼의 codon으로 최적화하는 작업을 수행하는 동시에, T17S, N68D, I77V 그리고 S219V로의 변이를 유도 하였다. 식물체에서 사용되어지는 codon양상은 <http://www.kazusa.or.jp/codon/> 의 database를 활용하여 분석하였고 DNASIS 프로그램을 이용하여 다음과 같은 염기서열을 디자인하였다 (그림 1).

표 2. TEV endopeptidase 유전자코돈 사용빈도 분석

Codon	Original seq. count (%)	Optimized seq. count (%)	Codon	Original seq. count (%)	Optimized seq. count (%)
TTT-Phe	6 (2.47)	3 (1.23)	TAT-Tyr	2 (0.82)	0 (0.00)
TTC-Phe	11 (4.54)	14 (5.78)	TAC-Tyr	2 (0.82)	4 (1.65)
TTA-Leu	2 (0.82)	0 (0.00)	TAA-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TTG-Leu	10 (4.13)	6 (2.47)	TAG-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TCT-Ser	3 (1.23)	11 (4.54)	TGT-Cys	3 (1.23)	1 (0.41)
TCC-Ser	0 (0.00)	1 (0.41)	TGC-Cys	1 (0.41)	3 (1.23)
TCA-Ser	6 (2.47)	6 (2.47)	TGA-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TCG-Ser	4 (1.65)	0 (0.00)	TGG-Trp	5 (2.06)	5 (2.06)
CTT-Leu	1 (0.41)	7 (2.89)	CAT-His	4 (1.65)	8 (3.30)
CTC-Leu	2 (0.82)	2 (0.82)	CAC-His	4 (1.65)	0 (0.00)
CTA-Leu	1 (0.41)	0 (0.00)	CAA-Gln	9 (3.71)	13 (5.37)
CTG-Leu	2 (0.82)	3 (1.23)	CAG-Gln	5 (2.06)	1 (0.41)
CCT-Pro	5 (2.06)	6 (2.47)	CGT-Arg	1 (0.41)	0 (0.00)
CCC-Pro	1 (0.41)	0 (0.00)	CGC-Arg	2 (0.82)	0 (0.00)
CCA-Pro	6 (2.47)	8 (3.30)	CGA-Arg	1 (0.41)	0 (0.00)
CCG-Pro	2 (0.82)	0 (0.00)	CGG-Arg	0 (0.00)	0 (0.00)
ATT-Ile	8 (3.30)	7 (2.89)	AAT-Asn	8 (3.30)	7 (2.89)
ATC-Ile	1 (0.41)	6 (2.47)	AAC-Asn	7 (2.89)	7 (2.89)
ATA-Ile	5 (2.06)	0 (0.00)	AAA-Lys	4 (1.65)	1 (0.41)
ATG-Met	7 (2.89)	7 (2.89)	AAG-Lys	10 (4.13)	13 (5.37)
ACT-Thr	5 (2.06)	3 (1.23)	AGT-Ser	3 (1.23)	0 (0.00)
ACC-Thr	5 (2.06)	3 (1.23)	AGC-Ser	6 (2.47)	4 (1.65)
ACA-Thr	9 (3.71)	14 (5.78)	AGA-Arg	4 (1.65)	9 (3.71)
ACG-Thr	2 (0.82)	0 (0.00)	AGG-Arg	2 (0.82)	1 (0.41)
GTT-Val	4 (1.65)	7 (2.89)	GAT-Asp	7 (2.89)	9 (3.71)
GTC-Val	2 (0.82)	1 (0.41)	GAC-Asp	3 (1.23)	2 (0.82)
GTA-Val	3 (1.23)	0 (0.00)	GAA-Glu	7 (2.89)	2 (0.82)
GTG-Val	4 (1.65)	7 (2.89)	GAG-Glu	4 (1.65)	9 (3.71)
GCT-Ala	1 (0.41)	4 (1.65)	GGT-Gly	5 (2.06)	7 (2.89)
GCC-Ala	0 (0.00)	0 (0.00)	GGC-Gly	3 (1.23)	0 (0.00)
GCA-Ala	1 (0.41)	0 (0.00)	GGA-Gly	4 (1.65)	10 (4.13)
GCG-Ala	2 (0.82)	0 (0.00)	GGG-Gly	5 (2.06)	0 (0.00)



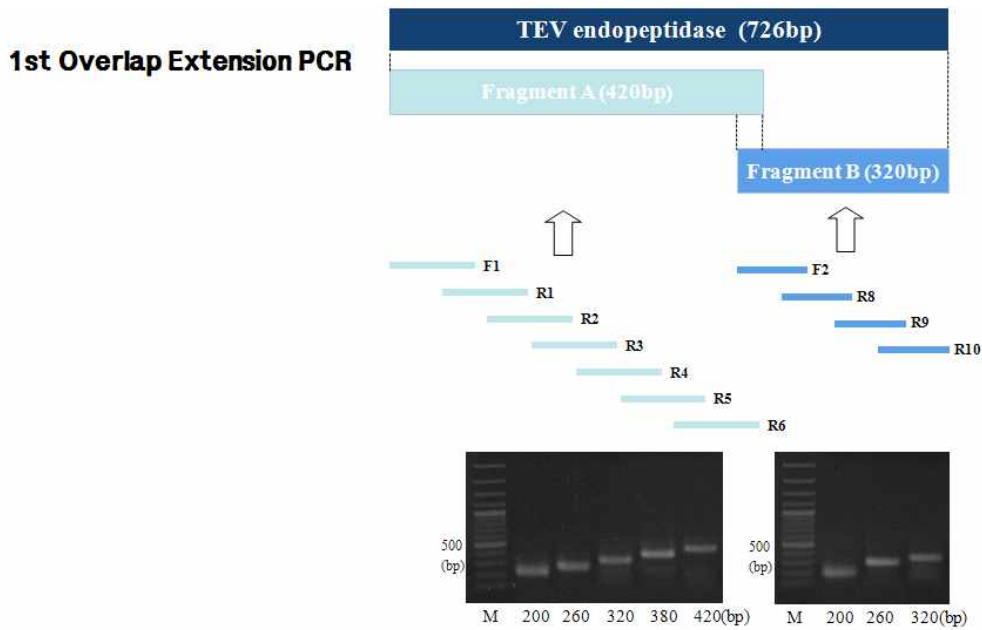
Wild type	GGA	GAA	AGC	TTG	TTT	AAG	GGA	CCA	CGT	GAT	TAC	AAC	CCG	ATC	TCA	AGC	ACC	ATT	
Opt. TEV	GGA	<b>GAG</b>	AGC	TTG	<b>TTT</b>	AAG	GGA	CCA	<b>AGG</b>	GAT	TAC	AAC	<b>CCA</b>	<b>ATT</b>	AGC	<b>TCT</b>	<b>TCT</b>	ATT	⇒ T17S
	G	E	S	L	F	K	G	P	R	D	Y	N	P	I	S	S	<b>S</b>	I	
			63			72			81			90			99			108	
	TGT	CAT	TTG	ACG	AAT	GAA	TCT	GAT	GGG	CAC	ACA	ACA	TCG	TTG	TAT	GGT	ATT	GGA	
	<b>TGC</b>	CAT	TTG	<b>ACA</b>	<b>AAC</b>	<b>GAG</b>	TCT	GAT	<b>GGA</b>	<b>CAT</b>	<b>ACC</b>	ACA	<b>TCT</b>	<b>CTG</b>	<b>TAC</b>	<b>GGA</b>	<b>ATC</b>	GGA	
	C	H	L	T	N	E	S	D	G	H	T	T	S	L	Y	G	I	G	
			117			126			135			144			153			162	
	TTT	GGT	CCC	TTT	ATC	ATT	ACA	AAC	AAG	CAC	TTG	TTT	AGA	AGA	AAT	AAT	GGA	ACA	
	<b>TTT</b>	<b>GGA</b>	<b>CCT</b>	<b>TTT</b>	<b>ATT</b>	ATT	<b>ACC</b>	AAC	AAG	<b>CAT</b>	<b>CTG</b>	<b>TTC</b>	AGA	AGA	AAT	<b>AAC</b>	<b>GGT</b>	ACA	
	F	G	P	F	I	I	T	N	K	H	L	F	R	R	N	N	G	T	
			171			180			189			198			207			216	
	CTG	TTG	GTC	CAA	TCA	CTA	CAT	GGT	GTA	TTC	AAG	GTC	AAG	AAC	ACC	ACG	ACT	TTG	
	<b>CTT</b>	<b>CTC</b>	<b>GTG</b>	CAA	<b>TCT</b>	<b>TTG</b>	CAT	GGT	<b>GTG</b>	TTT	AAG	GTC	AAG	<b>GAT</b>	<b>ACA</b>	<b>ACT</b>	<b>ACA</b>	<b>CTT</b>	⇒ N68D
	L	L	V	Q	S	L	H	G	V	F	K	V	K	<b>D</b>	T	T	T	L	
			225			234			243			252			261			270	
	CAA	CAA	CAC	CTC	GTT	GAT	GGG	AGG	GAC	ATG	ATT	ATC	ATT	CGT	ATG	CCT	AAG	GAT	
	CAA	CAA	<b>CAT</b>	CTT	GTT	GAT	<b>GGA</b>	<b>AGA</b>	GAC	ATG	<b>ATC</b>	ATC	ATT	AGA	ATG	<b>CCA</b>	AAG	GAT	
	Q	C	H	L	<b>V</b>	D	G	R	D	M	I	I	I	R	M	P	K	D	⇒ I77V
			279			288			297			306			315			324	
	TTC	CCA	CCA	TTT	CCT	CAA	AAG	CTG	AAA	TTT	AGA	GAG	CCA	CAA	AGG	GAA	GAG	CGC	
	TTC	CCA	<b>CCT</b>	TTT	<b>CCT</b>	<b>CAG</b>	AAG	<b>TTG</b>	AAA	<b>TTC</b>	AGA	GAG	CCA	CAA	<b>AGA</b>	GAA	GAG	<b>AGA</b>	
	F	P	P	F	P	Q	K	L	K	F	R	E	P	Q	R	E	E	R	
			333			342			351			360			369			378	
	ATA	TGT	CTT	GTG	ACA	ACC	AAC	TTC	CAA	ACT	AAG	AGC	ATG	TCT	AGC	ATG	GTG	TCA	
	<b>ATC</b>	<b>TGC</b>	CTT	GTG	ACA	ACC	AAC	TTC	CAA	ACT	AAG	TCT	ATG	TCT	AGC	ATG	GTG	TCA	
	I	C	L	V	T	N	F	Q	T	K	S	M	S	S	S	M	V	S	
			387			396			405			414			423			432	
	GAC	ACT	AGT	TGC	ACA	TTC	CCT	TCA	TCT	GAT	GGC	ATA	TTC	TGG	AAG	CAT	TGG	ATT	
	GAC	ACT	TCA	TGC	ACA	TTC	CCT	TCA	TCT	GAT	<b>GGT</b>	<b>ATC</b>	TTC	TGG	AAG	CAT	TGG	ATT	
	D	T	S	C	T	F	P	S	S	D	G	I	F	W	K	H	W	I	
			441			450			459			468			477			486	
	CAA	ACC	AAG	GAT	GGG	CAG	TGT	GGC	AGT	CCA	TTA	GTA	TCA	ACT	AGA	GAT	GGG	TTC	
	CAA	<b>ACA</b>	AAG	GAT	<b>GGT</b>	<b>CAA</b>	TGT	<b>GGA</b>	<b>TCA</b>	CCA	<b>CTT</b>	<b>GTG</b>	<b>TCT</b>	<b>ACA</b>	AGA	GAT	GGT	<b>TTT</b>	
	Q	T	K	D	G	Q	C	G	S	P	L	V	S	T	R	D	G	F	
			495			504			513			522			531			540	
	ATT	GTT	GGT	ATA	CAT	TCA	GCA	TCG	AAT	TTC	ACC	AAC	ACA	AAC	AAT	TAT	TTC	ACA	
	<b>ATC</b>	GTT	GGT	<b>ATT</b>	CAT	TCA	GCT	<b>TCT</b>	AAT	TTC	<b>ACA</b>	<b>AAT</b>	ACA	AAC	AAT	<b>TAC</b>	TTC	ACA	
	I	V	G	I	H	S	A	S	N	F	T	N	T	N	N	Y	F	T	
			549			558			567			576			585			594	
	AGC	GTG	CCG	AAA	AAC	TTC	ATG	GAA	TTG	TTG	ACA	AAT	CAG	GAG	GCG	CAG	CAG	TGG	
	AGC	GTG	<b>CCA</b>	<b>AAG</b>	AAC	TTC	ATG	<b>GAG</b>	<b>CTG</b>	<b>CTC</b>	ACA	AAT	<b>CAA</b>	GAG	<b>GCT</b>	<b>CAA</b>	<b>CAA</b>	TGG	
	S	V	P	K	N	F	M	E	L	L	T	N	Q	E	A	Q	Q	W	
			603			612			621			630			639			648	
	GTT	AGT	GGT	TGG	CGT	TTA	AAT	GCT	GAC	TCA	GTA	TTG	TGG	GGG	GGC	CAT	AAA	GTT	
	GTT	<b>TCT</b>	<b>GGA</b>	TGG	<b>AGA</b>	<b>CTT</b>	AAT	GCT	<b>GAT</b>	TCA	<b>GTG</b>	TTG	TGG	<b>GGA</b>	<b>GGT</b>	CAT	<b>AAG</b>	GTT	
	V	S	G	W	R	L	N	A	D	S	V	L	W	G	G	H	K	V	
			657			666			675			684			693			702	
	TTC	ATG	AGC	AAA	CCT	GAA	GAG	CCT	TTT	CAG	CCA	GTT	AAG	GAA	GCG	ACA	CAA	CTC	
	TTC	ATG	<b>GTT</b>	AAG	CCT	<b>GAG</b>	<b>GAA</b>	CCT	TTT	<b>CAA</b>	CCA	GTT	AAG	<b>GAG</b>	<b>GCT</b>	ACA	<b>CAG</b>	<b>CTT</b>	
	F	M	<b>V</b>	K	P	E	E	P	F	Q	P	V	K	E	A	T	Q	L	⇒ S219V
			711			720													
	ATG	AAT	GAA	TTG	GTG	TAC	TCG	CAA											
	ATG	AAT	<b>GAG</b>	TTG	<b>GTT</b>	TAC	TCT	CAA											
	M	N	E	L	V	Y	S	Q											

그림 1. 벼의 codon으로 최적화된 TEV endopeptidase의 유전자 염기서열

최적화된 coding sequence를 바탕으로 각각 80 mer의 oligonucleotide를 합성하고 (표 3), 본 연구팀에서 구축한 overlap-extension PCR방법을 이용하여 합성 유전자를 제작하였으며, 합성된 유전자의 염기서열 분석을 통하여 최종 726 base pair의 유전자를 특성화하였다 (그림 2).

표 3. TEV endopeptidase 유전자 합성을 위한 primer set

NO	Name	Length	Sequence
1	TEV(opt) F 1	80mer	5' - GGAGAGAGCTTGTTCAAGGGACCAAGGGATTACAACCCAA TTAGCTCCTCTATTTGCCATTTGACAAACGAGTCTGATGG - 3'
2	TEV(opt) F 2	80mer	5' - AAGCATTGGATTCAAACAAAGGATGGTCAATGTGGATCAC CACTTGTGTCTACAAGAGATGGTTTTATCGTTGGTATTCA - 3'
3	TEV(opt) R 1	80mer	5' - AGATGCTTGTTGGTAATAATAAAAGGTCCGAATCCGATTC CGTACAGAGATGTGGTATGTCCATCAGACTCGTTTTGTCAA - 3'
4	TEV(opt) R 2	80mer	5' - TTGACCTTGAACACACCCATGCAAAGATTGCACGAGAAGTG TACCGTTATTTCTTCTGAACAGATGCTTGTTGGTAATAAT - 3'
5	TEV(opt) R 3	80mer	5' - ATTCTAATGATGATCATGTCTCTTCCATCAACAAGATGTT GTTGAAGTGATGTTGTATCCTTGACCTTGAACACACCCATG - 3'
6	TEV(opt) R 4	80mer	5' - TCTTCTCTTTGTGGCTCTCTGAATTTCAACTTCTGAGGAA AAGGTGGGAAATCCTTTGGCATTCTAATGATGATCATGTC - 3'
7	TEV(opt) R 5	80mer	5' - TCTGACACCATGCTAGACATAGACTTAGTTTTGGAAGTTGG TTGTCACAAGGCAGATTCTCTCTTCTTTGTGGCTCTCT - 3'
8	TEV(opt) R 6	80mer	5' - TTTGTTTGAATCCAATGCTTCCAGAAGATACCATCAGATG AAGGGAATGTGCATGAAGTGTCTGACACCATGCTAGACAT - 3'
9	TEV(opt) R 7	80mer	5' - ATGAAGTTCTTTGGCACGCTTGTGAAGTAATTGTTTGTAT TTGTGAAATTAGAAGCTGAATGAATACCAACGATAAAACC - 3'
10	TEV(opt) R 8	80mer	5' - TCAGCATTAAAGTCTCCATCCAGAAACCCATTGTTGAGCCT CTTGATTTGTGAGCAGCTCCATGAAGTTCTTTGGCACGCT - 3'
11	TEV(opt) R 9	80mer	5' - GGTTGGAAAGGTTCCCTCAGGCTTAACCATGAAAACCTTAT GACCTCCCCACAACACTGAATCAGCATTAAAGTCTCCATCC - 3'
12	TEV(opt) R 1 0	72mer	5' - TCATCATTGAGAGTAAACCAACTCATTTCATAAGTTGTGT AGCCTCCTTAACTGGTTGGAAAGGTTCCCTCAGG - 3'



**2nd Overlap Extension PCR**



그림 2. Overlap-extension PCR방법을 이용한 TEV endopeptidase 유전자 합성

(2) 벼 현탁세포 특이적 발현 벡터의 제작

본 연구팀에서 사용하는 벼의 현탁세포배양의 경우, rice alpha amylase 3D promoter (pRAmy3D)와 특이적인 3D signal peptide (3Dsp) 를 사용하여 당 결핍조건에서 고발현과 효율적인 분비를 유도하게 된다. 이를 위하여, 3Dsp의 sequence를 TEV endopeptidase 특성화 유전자의 5'-region에 overlap-PCR을 이용하여 결합 하였으며, 최종적으로 880 base pair 의 TEV endopeptidase를 합성하였다 (그림 3).

### 3rd Overlap Extension PCR



그림 3. Rice alpha amylase 3D signal peptide를 포함하는 TEV endopeptidase 유전자 합성

합성된 유전자는 본 연구팀에 의하여 개발된 pRAmy3D와 mRNA의 분해를 억제하는 기능의 3D RAmY 5'UTR (terminator 포함), 그리고 selection marker로는 항생제인 hygromycin에 대하여 내성유전자인 hpt유전자가 포함된 식물발현벡터에 cloning하였음 (그림 4).

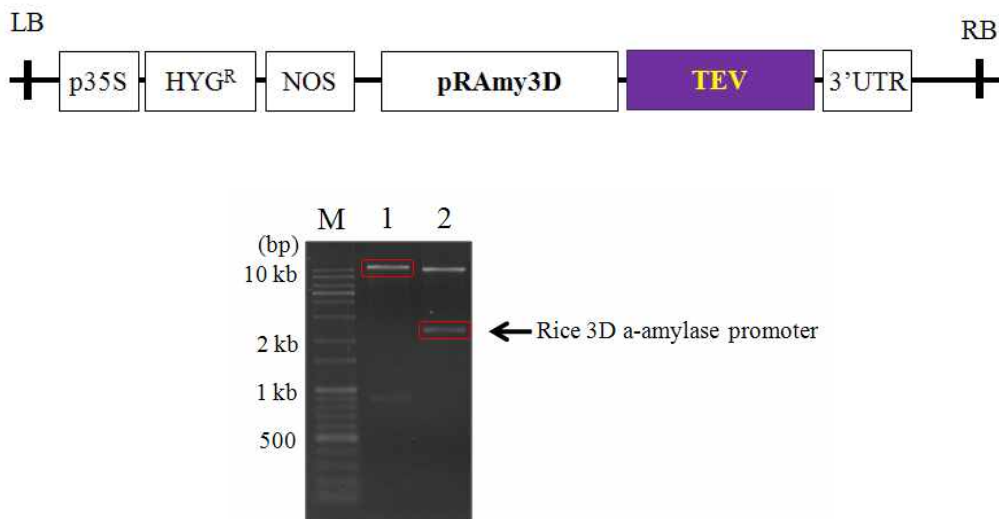


그림 4. 벼의 현탁세포 발현용으로 제작된 벡터 구조

### (3) 식물 형질전환

상기의 유전자를 유전자총 (Bombardmen)을 이용하여 벼 callus에 형질전환을 수행하였다. 형질전환 수행방법은 성숙된 벼 종자의 배로부터 유도된 캘러스 조직을 신선한 N6Co-culture 배지에 계대 배양하여 배 발생 캘러스의 발달을 유도한 후, 이 캘러스에 유전자총을 이용하여 TEV endopeptidase DNA를 벼에 도입시켰다. 형질전환은 TEV endopeptidase DNA (10ug)을 미리 준비해둔 microcarrier (금 입자; gold particle)에 2.5M CaCl<sub>2</sub>, 0.1M spermidine 용액을 이용하여 코팅하여 사용하였다. 형질전환 시키고 24시간 후에 벼 캘러스를 Co-culture 배지에서 hygromycin이 포함된 선발배지 (N6SE)로 옮겨 암조건 (25°C)에서 배양하였다. 매 3주 간격으로 신선한 배지로 옮겨 명조건 (25°C) 계대배양 하였고, 항생제를 포함하는 배지에서 성장하는 14 line의 캘러스를 선발하였으며 유전자도입 및 발현여부를 확인하기 위하여 증식배지에서 증식하였다. 하이그로마이신을 포함하는 배지에서 선발한 14 line의 형질전환

캘러스의 유전자 도입여부를 확인하기 위하여 Genomic DNA PCR을 실시하였다. Genomic DNA PCR을 실시하기 위하여 선발배지에서 선발한 캘러스(0.3g)로부터 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA는 lysis buffer [NaCl (6M), SDS (20%), proteinase K(400ug/mL), RNase(10mg/mL)]로 캘러스 조직을 lysis 시킨 후, phenol/chloroform 으로 처리하고, 에탄올에 씻어 말린 후, 증류된 물에 녹여 추출하였음. Genomic DNA 농도를 측정하여 200ng/ul를 genomic DNA PCR에 사용하였다. 유전자 도입여부를 확인하기 위하여 TEV endopeptidase 유전자를 증폭 할 수 있는 forward primer와 reverse primer를 사용하여 PCR을 수행 하였다. Genomic DNA PCR을 실시한 결과 유전자가 도입되지 않은 대조구에서는 항원 유전자에 해당하는 유전자의 증폭이 확인되지 않았으나 형질전환 된 캘러스에서는 항원유전자인 TEV endopeptidase 유전자의 증폭이 확인되어 항원유전자가 선발된 형질전환 캘러스에 안정적으로 도입되었음을 확인하였다 (그림 5).

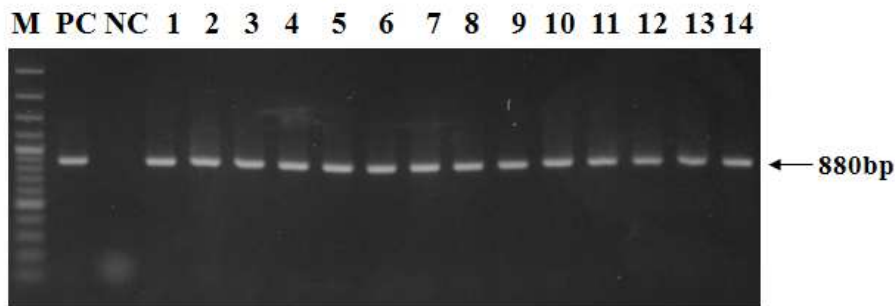


그림 5. Genomic DNA PCR을 이용한 유전자 삽입 확인

#### (4) 고발현 세포주의 선발

하이그로마이신 항생제에 저항성을 보이고 Genomic DNA PCR 분석 결과 안정적으로 TEV endopeptidase의 유전자 도입이 확인된 캘러스를 대상으로 TEV endopeptidase 유전자가 정상적으로 발현하는지를 확인하고자 Northern blot analysis를 실시하였음(그림 6). Northern blot analysis는 본 연구에서 사용한 RAmy3D 프로모터가 당결핍조건에서 특이적으로 발현하는 관계로 하이그로마이신 항생제에 저항성을 보이고 Genomic DNA PCR 분석 결과 안정적으로 TEV endopeptidase의 유전자 도입이 확인된 캘러스를 당이 결핍된 조건의 배지에서 5일간 생육시킨 후에 N6배지에서 5일 동안 배양하여 캘러스를 취하고 Tri-reagent로 RNA를 추출한 다음 30  $\mu$ g으로 정량하여 formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후 capillary transfer 방법에 의해 Hybond N<sup>+</sup>-membrane으로 transfer하고  $\alpha$  <sup>32</sup>P-dCTP로 표지한 TEV endopeptidase DNA를 probe로 하여 hybridization 하여 Northern blot analysis를 실시하였음. Northern blot analysis 결과 형질전환체간 발현 정도는 cell line 간에 큰 차이를 보였으며 이중에서 pJK44-1, pJK44-2, pJK44-8, pJK44-13, pJK44-14, pJK44-17번 line을 TEV endopeptidase 고생산 line으로 선발 하였고, 이 cell line을 이용하여 식물체 재분화를 유도하였으며 재분화된 식물체는 순화 과정을 거쳐 (재)전주생물소재연구소의 GMO 식물 재배 온실에서 재배하였다.

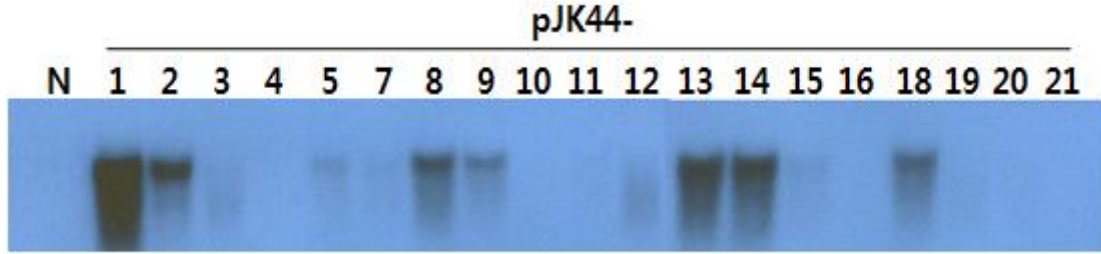


그림 6. Northern blot analysis를 이용한 유전자 발현확인 및 고발현 세포주의 선발

(5) 식물체 재분화 및 농업형질 조사

Northern blot analysis를 통하여 선발된 TEV endopeptidase 고생산 line인 pJK44-1, pJK44-2, pJK44-8, pJK44-13, pJK44-14, pJK44-17번 세포주를 대상으로 식물체를 재분화 하였음. 먼저 TEV endopeptidase 고생산 캘러스를 재분화 배지인 MS-Re배지에 치상하였으며, 치상한 달 이후부터 녹색의 그린 spotdl 형성 되면서 이후에 순조롭게 식물체의 재분화가 이루어졌음. 재분화된 식물체가 약 1 cm 정도 성장한 시점에 배양 병으로 옮겨주었으며 이후 5-10 cm 정도 생육한 식물체는 순화과정을 거쳐 포토에 이식하였다 (그림 7).

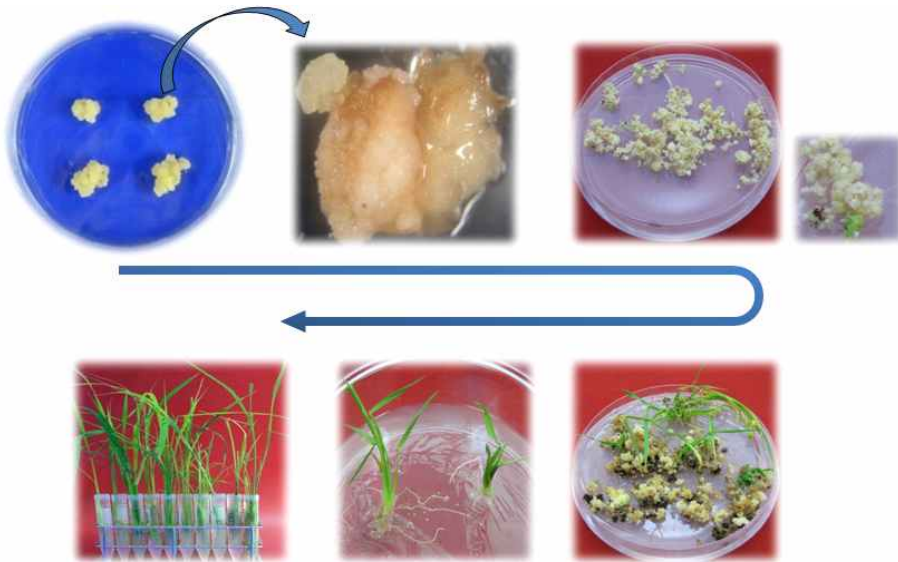


그림 7. TEV endopeptidase 형질전환체로부터 재분화 유도

상기의 TEV endopeptidase 고생산 개체들인 pJK44-1, pJK44-2, pJK44-8, pJK44-13, pJK44-14, pJK44-17번 세포주로부터 식물체를 재분화 시킨 결과 모든 세포주로부터 10 개체 이상의 식물체를 성공적으로 확보할 수 있었음. 그러나 각각의 세포주로부터의 식물체 재분화 시기가 일정하지 않고 최대 40일 이상의 차이가 발생하였다 (그림 8). 모든 식물체에서 화아분화가 이루어져 pJK44-1, pJK44-13 형질전환 식물체에서는 정상적으로 종자가 결실하였다 (그림 9). 그러나 형질전환체 개체별로 차이는 있으나 전체적으로 임신율이 높지 않았음. 모든 개체에서 정상적인 종자를 확보하였으며 이를 이용하여 TEV endopeptidase 고생산 형질전환체에 대한 농업형질의 조사를 수행하였다.



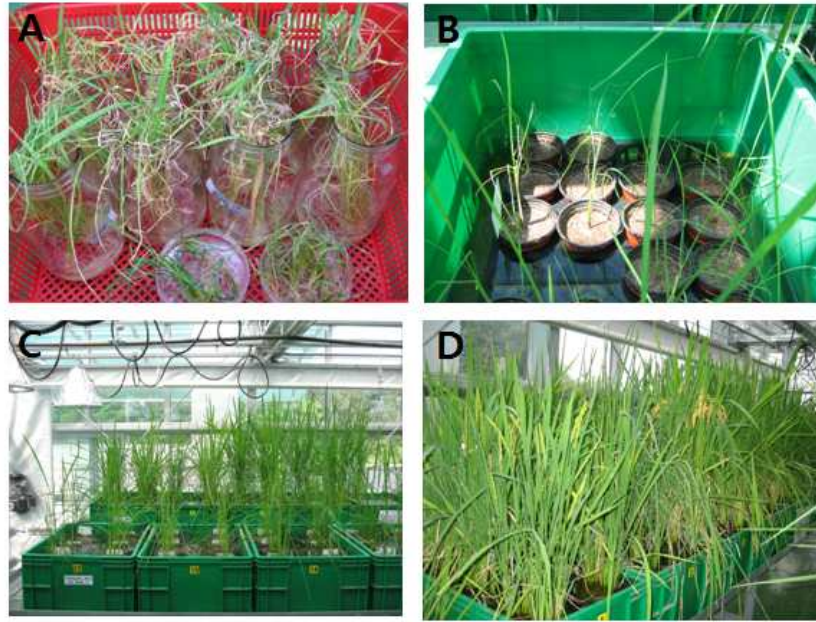


그림 8. TEV endopeptidase 형질전환체로부터 재분화 유도



그림 9. TEV endopeptidase 형질전환체로부터 재분화 유도

#### 나. TEV endopeptidase 활성 측정을 위한 substrate 단백질 발현

식물 유래 TEV endopeptidase의 활성을 측정하기 위한 substrate 단백질 확보를 위하여 아래 그림과 같은 fusion 단백질을 제작하였다 (그림 10). Substrate fusion 단백질은 형광을 통하여 확인이 용이한EGFP와 사이즈가 작아 식별이 용이하고 Western blot analysis에서 항체와의 결합력이 우수하여 식별이 용이한 TNF- $\alpha$  사이에 TEV endopeptidase 인식 부위인 ENLYFQG부위를 삽입한 융합단백질 형태로 이루어져 있다.



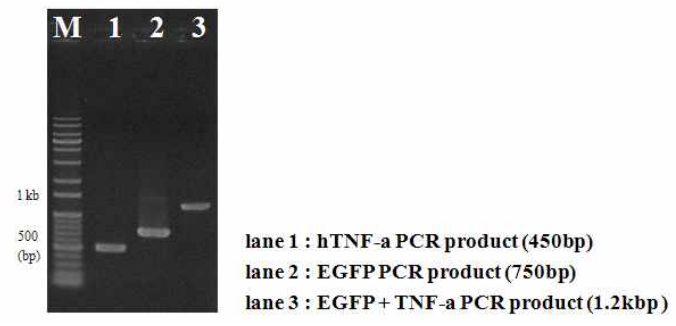
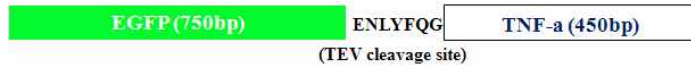


그림 10. Substrate로 사용할 fusion 단백질 제작

이렇게 제작된 fusion 유전자를 박테리아 발현 vector인 pColdIII vector에 cloning하였다 (그림 11). pColdIII 벡터의 경우, 15°C에서 30분간 cold shock을 가한 후, 1mM IPTG를 첨가하여 목적 유전자의 대량 발현을 유도하게 됨. 또한, His-tag이 목적 단백질의 N-terminal 부분에 결합되어 발현하게 되는 시스템이므로, affinity chromatography를 이용한 단백질의 분리·정제를 용이하게 수행할 수 있는 장점이 있다.

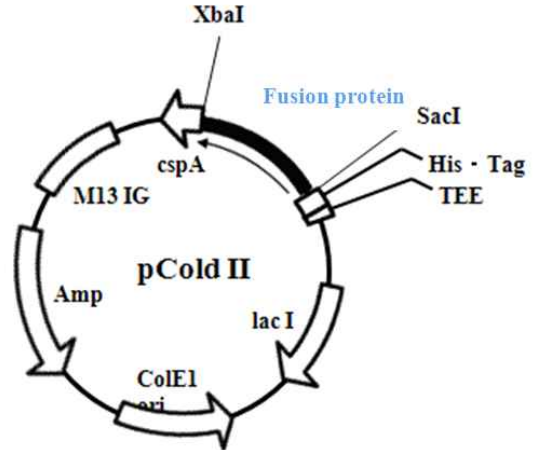


그림 11. 박테리아 발현용으로 제작된 벡터 구조

상기 벡터를 BL21(DE3)과 BL21 codonplus 시리즈(RP, RIL, RILP), KRX, 총 5가지 발현 host에 형질전환 하여 각각의 형질전환 세포주를 제작하였다. 가장 높은 발현을 보이는 host 세포주를 선발하기 위하여, 각각의 세포주를 cold shock 후에 1mM IPTG를 이용하여 24시간 동안 fusion 단백질 발현을 유도하였다. 그 결과, BL21과 KRX에서 발현량이 높음을 확인 할 수 있었다 (그림 12).

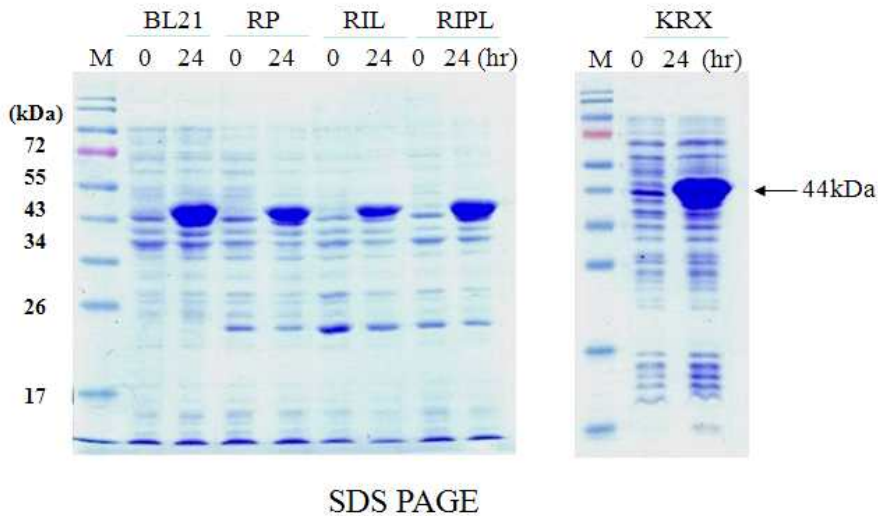


그림 12. Substrate fusion 단백질 발현 확인

발현량이 높은 BL21과 KRX host의 단백질 발현을 유도한 후, cell extract를 이용하여 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 수행한 결과 예상 분자량에 해당되는 44 kDa 밴드에서 substrate fusion 단백질이 발현됨을 확인할 수 있었다 (그림 13).

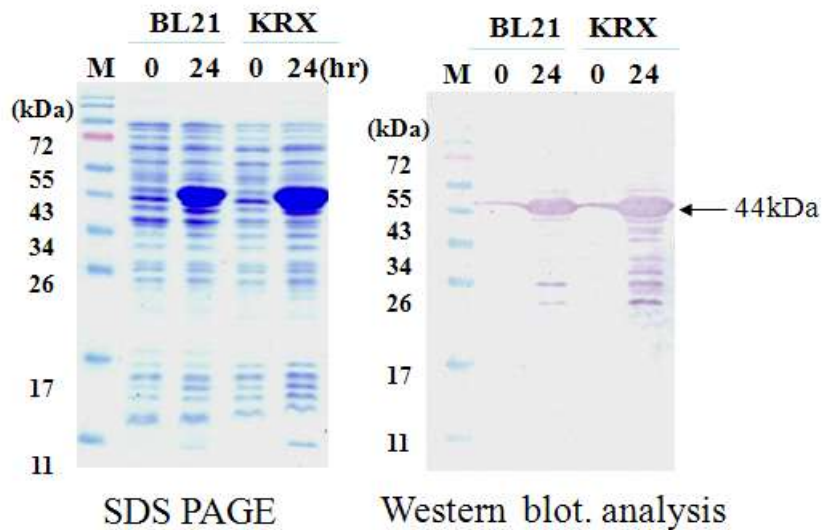


그림 13. Substrate fusion 단백질의 Western blot. 분석

위의 결과로 발현량이 가장 높은 KRX host를 선발하였으며, 이를 이용하여 substrate fusion 단백질의 solubility를 측정하였고, 그 결과 대부분의 단백질이 insoluble 한 것으로 판단되었음. Insoluble한 형태의 fusion 단백질을 분리·정제하기 위하여 먼저 균주를 100 mL의 LB 배지에 접종한 후, 37°C에서 O.D 0.4 ~ 0.5값이 될 때까지 배양하였다. 그 후 15°C에서 30분간 cold shock을 가하였고, 1mM IPTG를 첨가하여 24시간 동안 fusion 단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 단백질을 Ni-NTA agarose로 분리·정제 하였고, SDS PAGE를 통하여 분석한 결과, elution fraction E1-E4 에서 44kDa의 순수 분리된 fusion 단백질을 확인 하였다 (그림 14).

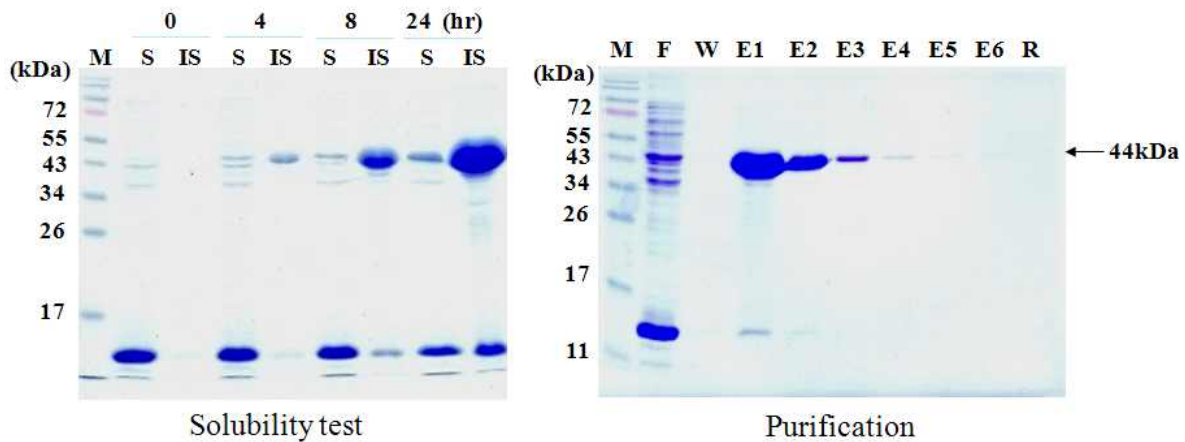


그림 14. Substrate fusion 단백질의 solubility 확인과 정제

다. 박테리아 발현 system을 이용한 TEV endopeptidase 단백질 발현

Substrate fusion 단백질의 활성을 알아보기 위하여 TEV endopeptidase를 박테리아에서 발현시키는 작업을 수행하였다. 기존 대장균의 다른 발현 시스템에서의 선행 연구들을 살펴본 결과, amino acid 17번의 threonine을 serine으로 (T17S), 68번의 asparagine을 aspartic acid로 (N68D) 그리고 77번 isoleucine을 valine으로 (I77V)으로 mutation 시켰을 경우 효소의 solubility가 증가 되었으며, autolysis resistance를 위한 amino acid 219번의 serine을 valine로 (S219V) 치환하여 TEV endopeptidase의 안정성을 확보 하였다는 결과를 확인하였다. 이 선행 연구들을 바탕으로, TEV endopeptidase를 대장균에서 발현하고자 대장균의 codon으로 최적화하는 작업을 수행하는 동시에, T17S, N68D, I77V 그리고 S219V로의 변이를 유도 하였다. 대장균에서 사용되어지는 codon양상은 <http://www.kazusa.or.jp/codon/>의 database를 활용하여 분석하였고 DNASIS 프로그램을 이용하여 다음과 같은 염기서열을 디자인하였다 (그림 15).

```

10      20      30      40      50      60
GGAGAGAGCT TGTTC AAGGG ACCAAGGAT TACAACCCAA TTAGCTCTCT TATTTGCCAT
70      80      90      100     110     120
TTGACAAACG AGTCTGATGG ACATACCACA TCTCTGTACG GAATGGATT CGGACCTTTT
130     140     150     160     170     180
ATTATTACCA ACAAGCATCT GTTCAGAAGA AATAAGGTA CACTCTCTGT GCAATCTTTG
190     200     210     220     230     240
CATGCTGTGT TCAAGTCAA GGATACAAC TCACTTCAAC AACATCTTGT TGATGGTAGA
250     260     270     280     290     300
GACATGATCA TCATTAGAAT GCCAAGGAT TTCOCACCTT TTCCTCAGAA GTTGAATTTC
310     320     330     340     350     360
AGAGAGCCAC AAAGAGAAGA GACAATCTGC CTTGTGACAA CCAACTCCA AACTAAGTCT
370     380     390     400     410     420
ATGTCTAGCA TGGTGTCABA CACTTCATGC ACATTCCTTT CATCTGATGG TATCTCTGCG
430     440     450     460     470     480
AAGCATTGGA TTCAAACAAA GGATGTCAA TGTGGATCAC CACTGTGTGC TACAAGAGAT
490     500     510     520     530     540
GGTTTTATCG TTGGTATCCA TTCAGCTTCT AATTTCCAAA ATACAACAA TTACTTCACA
550     560     570     580     590     600
AGCGTGCCAA AGAACTTCAT GGAGCTGCTC ACAAAATCAG ABGCCTCAAC ATGGGTTTCT
610     620     630     640     650     660
GGATGGAGAC TTAATGCTGA TTCAGTGTG TGGGGAGTC ATAAGGTTT CATGTTAAG
670     680     690     700     710     720
CCTGAGAAC CTTTCCACC AGTTAAGGAG GCTACCAAC TTATGAATGA GTTGGTTTAC
730     740     750     760     770     780
TCTCAA

```

✓ TEV endopeptidase 유전자 최적화

- 대장균 codon으로 최적화
- Solubility : T17S, N68D, I77V
- Autolysis resistance : S219D
- 33/726 (5%)

그림 15. 박테리아 codon으로 최적화된 TEV endopeptidase 유전자의 염기서열

최적화된 coding sequence를 바탕으로 80 mer의 oligonucleotide를 합성하고 overlap-extension PCR방법을 이용하여 합성 유전자를 제작하였으며, 합성된 유전자의 염기서열 분석을 통하여 유전자를 특성화하였다 (그림 16).

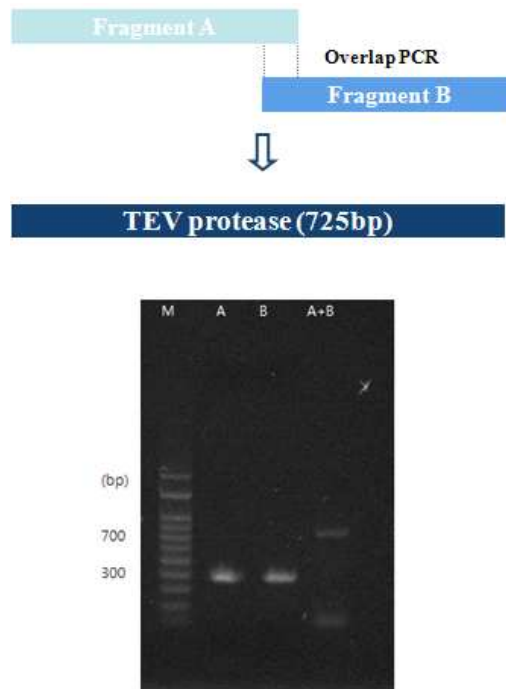


그림 16. Overlap-extension PCR 방법을 이용한 TEV endopeptidase 유전자 합성

이렇게 합성된 TEV endopeptidase 유전자를 박테리아 발현 벡터인 pColdII 벡터에 cloning하였다 (그림 17). pColdII 벡터의 경우, 15°C에서 30분간 cold shock을 가한 후, 1mM IPTG를 첨가하여 목적 유전자의 대량 발현을 유도하게 됨. 또한, His-taq이 목적 단백질의 N-terminal 부분에 결합되어 발현하게 되는 시스템이므로, affinity chromatography를 이용한 단백질의 분리·정제를 용이하게 수행할 수 있는 장점이 있다.

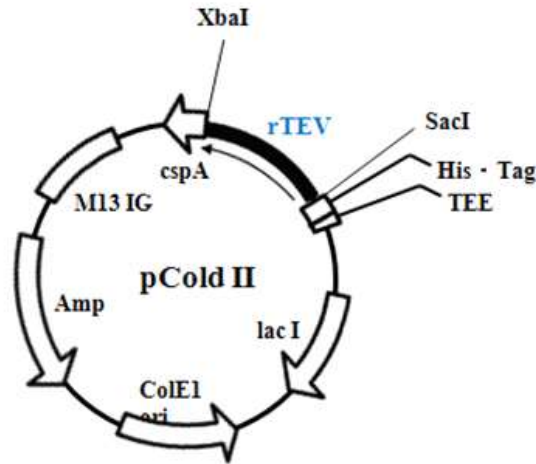


그림 17. 박테리아 발현용으로 제작된 벡터 구조

상기 벡터를 BL21(DE3)과 BL21 codonplus 시리즈(RP, RIL, RILP), KRX, 총 5가지의 박테리아 발현 host에 형질전환하여, BL21-TEV, RP-TEV, RIL-TEV, RIPL-TEV, KRX-TEV 형질전환 세포주를 제작하였다. 가장 높은 발현을 보이는 host 세포주를 선발하기 위하여, 각각의 세포주를 cold shock 후에 1mM IPTG를 이용하여 24시간동안 TEV endopeptidase 단백질 발현을 유도하였다. 그 결과, RP-TEV, RIL-TEV, RIPL-TEV에서 예상 분자량에 해당되는 26.5 kDa의 밴드가 높게 나타남을 확인하였다 (그림 18).

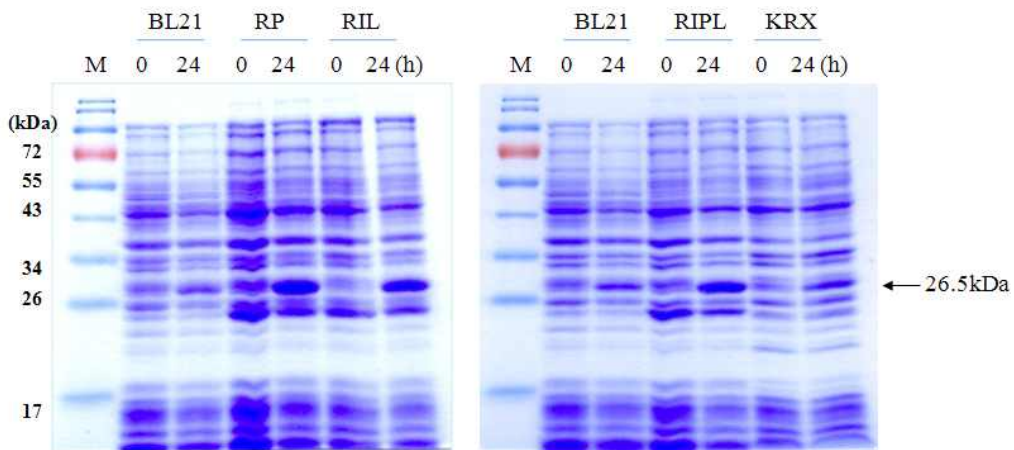


그림 18. TEV endopeptidase 단백질 발현 확인

고 발현을 보인 RP-TEV, RIL-TEV, RIPL-TEV 세포주를 이용하여 TEV endopeptidase 단백질 발현을 8시간 동안 유도하고, 단백질의 solubility를 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 통하여 확인한 결과, soluble과 insoluble 형태로 모두 존재하는 것을 볼 수 있었으며, soluble fraction에서의 TEV endopeptidase 단백질의 분자량이 insoluble fraction 보다 약간 높게 나타남이 확인되었다 (그림 19)

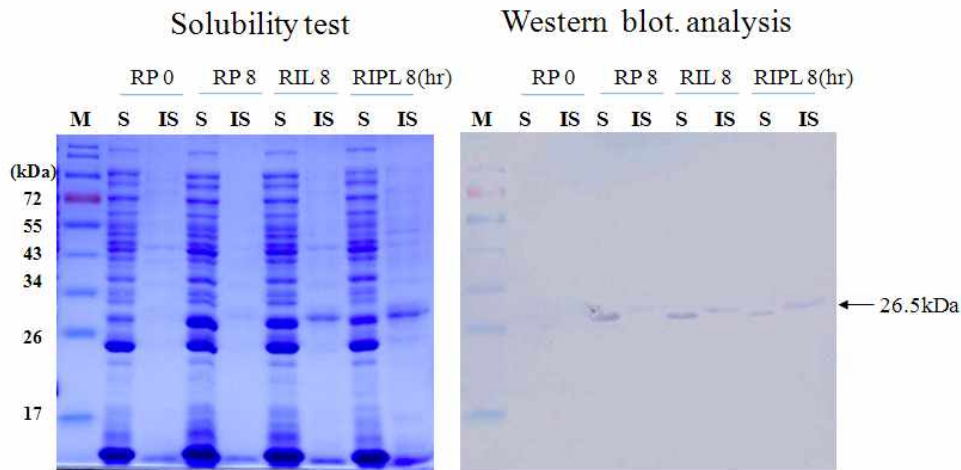


그림 19. TEV endopeptidase 단백질의 solubility 확인을 위한 SDS-PAGE와 Western blot 분석

TEV endopeptidase의 분리·정제를 위하여 RIL-TEV 균주를 100 mL의 LB배지에 접종한 후, 37°C에서 O.D 0.4 ~ 0.5값이 될 때까지 배양하였음. 그 후 15°C에서 30분간 cold shock을 가하였고, 1mM IPTG를 첨가하여 7시간 동안 TEV endopeptidase의 발현을 유도하였다. 발현된 단백질을 Ni-NTA agarose로 분리·정제하였고, SDS PAGE를 통하여 분석한 결과, elution fraction E1-E4에서 26.5 kDa의 순수 분리된 TEV endopeptidase 단백질을 확인하였다 (그림 20).

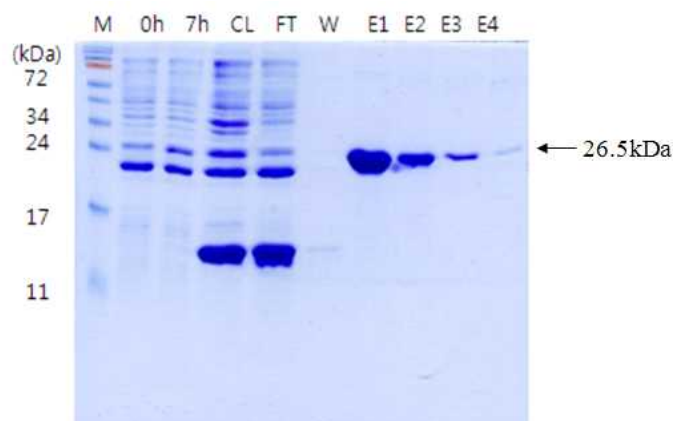


그림 21. TEV endopeptidase 단백질의 정제



라. 대장균 유래 TEV endopeptidase를 이용하여 substrate fusion 단백질의 활성 측정

본 실험을 통하여 식물 유래 TEV endopeptidase 활성 측정을 위한 substrate fusion 단백질을 확보하였고, 실제로 TEV endopeptidase에 의해 잘려지는지에 대한 확인이 필요하다고 판단되어, 대장균에서 발현 시킨 TEV endopeptidase를 이용하여 substrate fusion 단백질 테스트를 하였다. 1ug의 substrate 단백질에 1.2ug의 TEV endopeptidase를 30°C에서 0 ~ 24시간 처리한 후, SDS-PAGE 분석을 통해 substrate 단백질이 잘려지는 정도를 확인하였음. 반응시간이 지남에 따라 substrate 단백질이 EGFP와 TNF- $\alpha$ 로 분리되는 정도가 높아짐으로 보아, 본 연구를 통해 만들어진 대장균 유래 TEV endopeptidase가 활성을 가지고 있으며 substrate fusion 단백질도사용이 가능함을 확인 할 수 있었다 (그림 22).

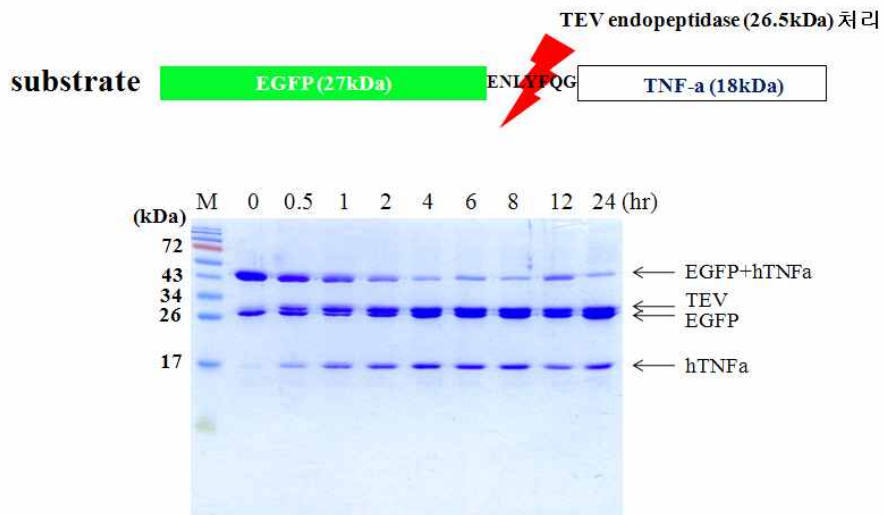


그림 22. TEV endopeptidase 단백질의 활성 측정 1

또한, 0.6 ug의 substrate 단백질에 TEV endopeptidase 단백질 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2ug의 농도로 8시간 동안 반응시킨 후, non-reducing gel에서 전기영동 하여, substrate 단백질에 포함되어진 EGFP 단백질의 발광 정도를 UV하에서 확인하였으며, 그림 23에서 보듯이 반응 전에는 substrate fusion 단백질의 분자량인 약 44 kDa에서만 EGFP가 발광 하였지만, 0.3 ug의 TEV endopeptidase 처리구 부터는 substrate fusion 단백질에서 분리되어진 18 kDa의 EGFP가 나타나기 시작하여, substrate fusion 단백질의 농도가 높아질수록 18 kDa의 EGFP 발광 정도가 높아지는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 23).



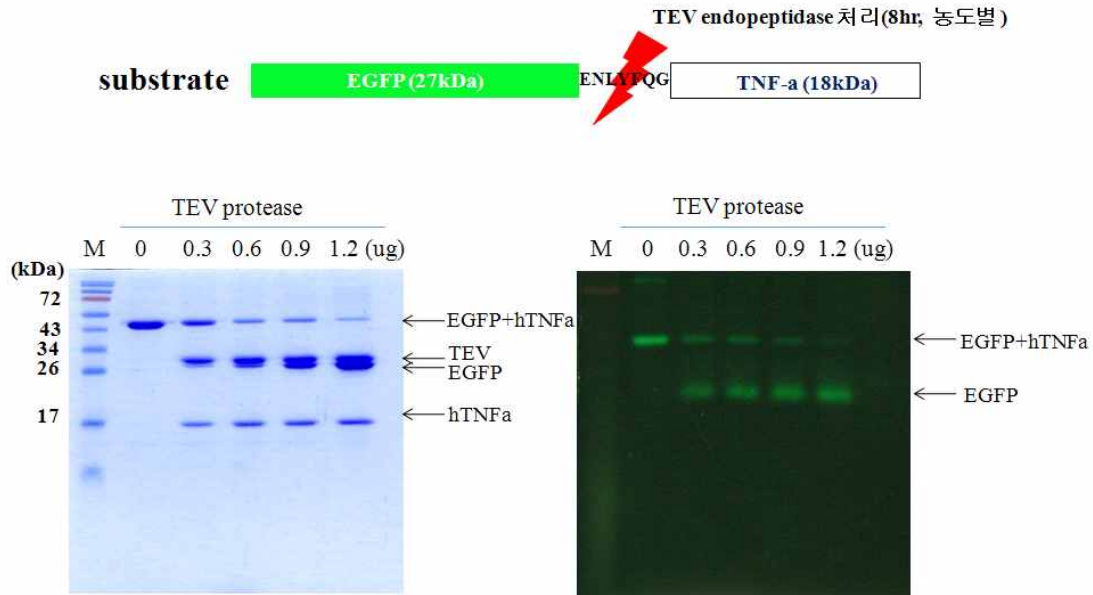


그림 23. TEV endopeptidase 단백질의 활성 측정 2

이 결과를 통하여 substrate fusion 단백질이 대장균 유래의 TEV endopeptidase에 의해서 매우 잘 잘려짐을 확인 할 수 있었고, 이 substrate fusion 단백질을 이용하여 식물유래 TEV endopeptidase 단백질의 활성 측정에도 적용이 가능하다고 판단 하였다.

#### 마. TEV endopeptidase 항체개발

재조합 TEV protease 단백질에 특이적인 항체를 만들기 위하여 다클론 항체 및 단클론 항체의 제조를 수행하였다. 먼저 항원으로 사용 할 TEV endopeptidase의 생산을 위하여 본과제의 1차년도에 제작하여 확보하고 있던 RIL-TEV 균주를 100 mL 의 LB배지에 접종한 후, 37°C 에서 O.D 0.4 ~ 0.5 값이 될 때까지 배양하였으며, 이후 15°C 에서 30분간 cold shock을 가하였고, 1mM IPTG를 첨가하여 7시간 동안 TEV endopeptidase의 발현을 유도하였다. 발현된 단백질을 Ni-NTA agarose로 분리·정제 하였고, SDS PAGE를 통하여 분석한 결과, elution fraction E1-E4 에서 26.5 kDa의 TEV endopeptidase 단백질이 순수 분리됨을 확인 하였으며, 효소활성을 확인함으로써 TEV endopeptidase가 정상적으로 생산되었음을 확인하였다 (그림 24).

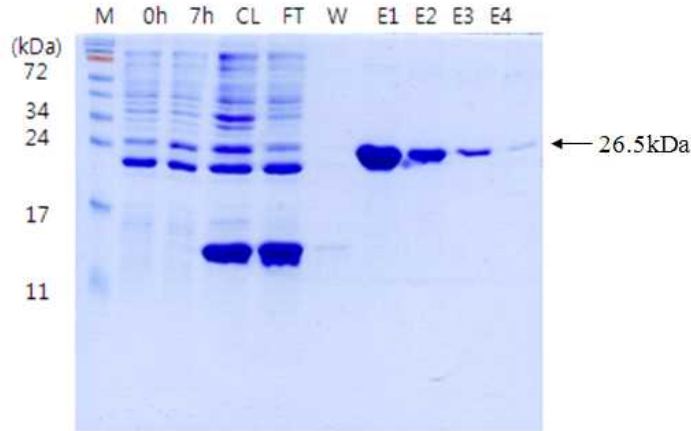


그림 24. TEV endopeptidase 단백질의 생산

TEV endopeptidase에 대한 다클론 항체를 얻기 위해 대장균에서 생산된 TEV endopeptidase 항원 단백질을 mouse에 주사하였다. 항원 단백질은 재조합 TEV protease 단백질로 항원 단백질 특성상 mouse에 주사 시, 생체 내에서 damage를 유도 할 수도 있어서 protease 활성을 유지 하는 native form과 100℃에서 20분간 끓여 protease 활성을 제거한 denature form 100ug을 CFA (adjuvant)와 1:1로 섞어 mouse에 각각 주사 하였고, 10일 후에 IFA (adjuvant)와 섞은 동일한 조건으로 boost immunization을 시행하였음. 같은 방법으로 추가 boost immunization을 시행하고 (그림 25), 각 immunization 후 3일째 마다 eye bleeding 방법으로 취한 혈청을 이용하여 Western blot analysis를 수행하여 항원 단백질에 특이적인 다클론 항체의 생성을 확인하였다.



그림 25. 항체제작 프로그램

Western blot analysis: mouse immunization에 이용한 재조합 TEV protease 단백질과 TEV protease 단백질 발현에 이용한 형질전환 균주의 lysate (induction 전·후), 비형질전환 callus culture soup과 비형질전환 callus protein extract 를 각각 12% SDS PAGE를 수행한 후 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Inc., Keene, NH, U.S.A) 에 transfer하고 5% skim milk로 2 시간 동안 blocking한 다음, mouse로부터 얻은 혈청을 TBST (100 mM TrisCl pH7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween20)에 1:1000로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시켰음. TBST로 10분씩 3회 세척 후 alkaline phosphate가 결합되어진 anti-mouse IgG (Sigma)를 TBST에 1:30000로 희석하여 1시간동안 실온에서 반응 시킨 후 다시 TBST로 10분씩 3회 세척하고 TNM (100 mM Tris pH9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 5-bromo-4-chloro-3-indol phosphate (BCIP:Bio-rad)와 nitro blue tetrazol (NBT:Bio-rad)를 넣어 발색시켰다.

다클론 항체 제조: protease 활성을 유지 하는 native form의 재조합 TEV protease 단백질과 100°C 에서 20분간 끓여 protease 활성을 제거한 denature form의 재조합 TEV protease 단백질을 각각 mouse에 주사하여 다클론 항체의 생산을 유도 한 결과 native form재조합 TEV protease 단백질을 주사 한 mouse에서는 항원에 대한 항체가 형성 되었지만, 항원 비특이적인 항체도 같이 생성 되었다. 그에 반해 denature form의 재조합 TEV protease 단백질을 주사 한 mouse에서는 signal은 상대적으로 약하지만, 항원 특이적인 항체가 형성됨을 확인 하였다 (그림 26). denature form의 재조합 TEV protease 단백질을 주사 한 mouse에 추가 immunization을 수행 하여 항원 특이적 이고 항원에 대한 감수성이 높은 다클론 항체가 생성됨을 확인 하였다 (그림 27).

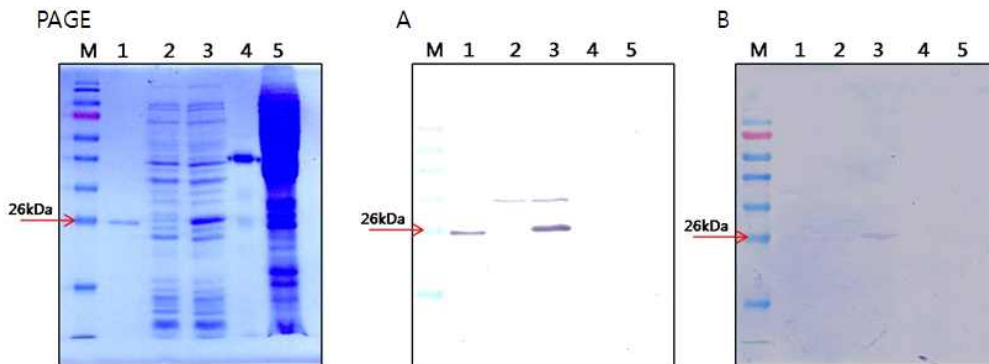


그림 26. Western blot analysis를 이용한 TEV protease 다클론 항체의 확인. M부터 5까지 각각 size marker, recombinant TEV protease, 대조구, 형질전환체 현탁세포, 형질전환체 현탁세포 배양액. (A) Native form antigen injected mouse serum (B) Denature form antigen injected mouse serum

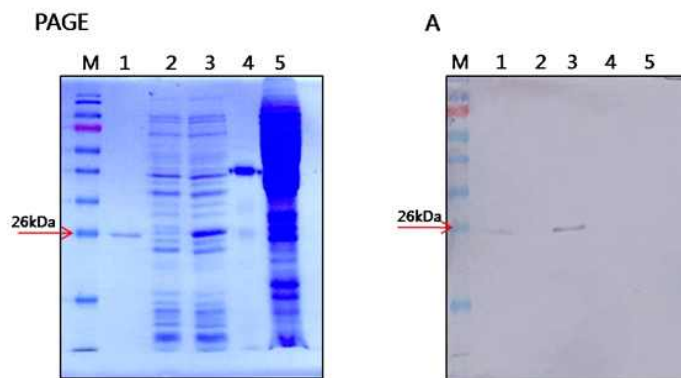


그림 27. Western blot analysis를 이용한 TEV protease 다클론 항체의 확인. M부터 5까지 각각 size marker, recombinant TEV protease, 대조구, 형질전환체 현탁세포, 형질전환체 현탁세포 배양액. (A) Denature form antigen injected (4<sup>th</sup>) mouse serum

단클론 항체 제조: 항원특이적인 항체의 안정적 공급 및 다양한 실험에 이용하기 위해 단클론 항체 제조를 수행하였음. denature form의 재조합 TEV protease 단백질을 5차 immunization 하여 얻은 mouse 혈청을 Western blot을 수행하여 항원에 대한 항체의 생성여부

를 확인하고, 항원 단백질인 재조합 TEV protease 단백질에 대한 항체의 생성이 확인된 mouse의 비장을 적출하여 결합조직과 지방조직을 제거한 다음 FBS가 없는 DMEM 배지에 2~3회 세척 후 syringe를 이용하여 단일세포로 유리하였다. 미리 준비된 mouse myeloma 세포인 SP2/0-Ag14를 FBS가 없는 DMEM 배지로 2~3회 세척한 후 비장세포와 SP2/0-Ag14 세포의 비율을 1:1로 하여 하나의 원심관에 혼합하고, 원심분리 하여 다시 FBS가 없는 DMEM 배지로 2~3회 세척하였다. 마지막 세척 후 원심분리 하여 얻은 비장세포-SP2/0-Ag14세포 혼합물에 37°C로 데워진 polyethylene glycol (PEG)용액 500 $\mu$ l을 천천히 1분에 걸쳐 첨가하여 비장세포와 SP2/0-Ag14세포를 융합하였다. 이후, FBS가 없는 DMEM 배지를 이용하여 서서히 희석시킨 후 원심 분리하여 PEG를 제거하고 2회 더 세척한 후, 18% FBS가 첨가된 DMEM-HAT (100 $\mu$ M sodium hypoxanthine, 400nM aminopterin, 16 $\mu$ M thymidine in DMEM) 배지에 현탁한 다음 96 well plate에 200 $\mu$ l씩 분주하였다. 이를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10~14일 동안 배양하여 하이브리도마 세포의 증식을 확인하고, 배양액을 취하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 항원 특이적인 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별하였다.

재조합 TEV protease 단백질을 주사하여 면역반응을 유도한 mouse의 비장세포와 mouse myeloma 세포인 SP2/0-Ag14를 1:1으로 섞은 다음 PEG를 이용하여 하이브리도마 세포를 만들었음. 2주 정도 경과 후 증식하여 군집을 형성한 39개의 하이브리도마 세포를 확인하였고, 이 39개의 하이브리도마 세포가 재조합 TEV protease 단백질에 특이적인 항체를 생산하는지 확인하기 위해 ELISA를 수행하였음. ELISA 반응은 항원 단백질인 재조합 TEV protease 단백질을 0.05M carbonate-bicarbonate coating buffer (pH 9.6)에 0.1 $\mu$ g/100 $\mu$ l가 되게 희석하여 ELISA plate에 well당 100 $\mu$ l씩 넣고 4°C에서 overnight 반응 시켰음. PBS를 이용하여 각 well을 3회 세척한 후 1% skim milk를 이용하여 37°C에서 2시간 동안 blocking 하였음. PBS로 3회 세척 후 하이브리도마 세포의 배양액을 각 well당 100 $\mu$ l씩 넣고, overnight 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척 후 alkaline phosphate가 결합되어 있는 anti-mouse IgG (Sigma)를 1:30000로 PBS에 희석시켜 well당 100 $\mu$ l씩 넣고, 37°C에서 2시간 반응시켰음. 마지막으로 PBS 3회 세척 후 5mL의 alkaline phosphate substrate buffer (pH 9.8)에 p-nitrophenyl phosphate disodium 50mg을 녹인 후 well당 100 $\mu$ l씩을 넣고 발색 시켰다. 발색 정도는 ELISA reader로 405nm 파장에서 흡광도 측정을 하였음. mouse 혈청으로부터 얻은 다클론 항체는 PBS에 1:1000로 희석하여 positive control로 사용하였고, negative control은 항원 없이 동일 과정을 수행하였다. ELISA 수행 결과 positive control과 negative control과 비교 시, 항원 단백질에 특이적인 항체를 생산하는 하이브리도마 세포는 찾을 수 없었다 (그림 28). 이는 denature form의 항원을 이용하여 immunization 함으로써, 단클론 상태에서 native form의 재조합 TEV protease 단백질을 인식하는 항체가 형성 되지 않은 것으로 생각된다.

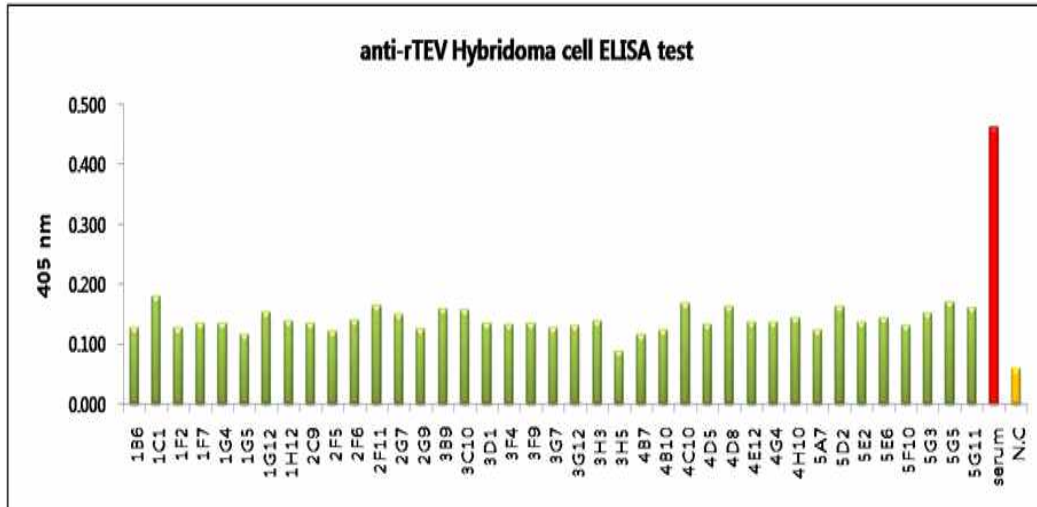


그림 28. 재조합 TEV protease에 대한 IgG 수준

바. 벼 현탁세포 유도과 대량 배양 시스템 구축

Western blot analysis와 Northern blot analysis를 통하여 TEV endopeptidase 유전자의 발현을 확인하고 TEV endopeptidase 고생산 세포주로 선발된 pJK44-1, pJK44-2, pJK44-8, pJK44-13, pJK44-14, pJK44-17번 세포주를 대상으로 현탁세포를 유도하고 현탁배양을 실시하였다. 현탁배양은 TEV endopeptidase 고생산 세포주의 캘러스를 한천이 첨가되지 않은 N6 selection 배지에 치상하여 2~3주 성장시킨 후 1mm x 1mm 스텐레스 망을 이용하여 미세한 세포만을 확보하였으며 1주 간격으로 250 ml 플라스크를 이용하여 50 ml 규모로 배양온도 25±2℃, 90 rpm으로 조절한 진탕배양기를 사용하여 계대배양 하였다 (그림 29). 이를 2L 규모의 플라스크에서 배양 한 후에 air bubble type 10 L bioreactor를 이용하여 scale up을 확립하였다.



그림 29. 벼 현탁세포 대량 배양 시스템 구축

사. 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인

벼 현탁세포로부터 TEV endopeptidase의 활성여부를 확인하기위하여 Negative control

인 N75와 TEV endopeptidase 고생산 세포주로 선발된 pJK44-1, pJK44-2, pJK44-8, pJK44-13, pJK44-14, pJK44-17번 세포주 현탁배양세포 5g을 무균상태에서 harvest하여 sucrose가 제거된 50ml의 N6 배지에(N6-S) 접종하여 5일간 배양하였음. 5일 후에 1ml의 배양액을 취하여 4℃, 12,000 rpm으로 10분간 centrifuge를 수행한 후, 상등액을 취하여 TEV protease 활성 측정에 사용하였다. TEV protease의 활성 측정을 위하여 각각의 배 현탁세포 배양액 40μl에 본 연구 과제를 통하여 확보한 대장균 유래 EGFP-TNFα 융합단백질 1μg의 단백질을 첨가하였고, positive control의 경우 시판되고 있는 대장균 유래 TEV protease를 1 unit의 농도로 사용하였으며, 500mM Tris-HCl (Ph8.0), 5mM EDTA 그리고 10mM DTT가 포함되도록 제조하여 이를 30℃에서 16시간 동안 반응시켰음. TEV protease의 활성을 확인하기 위하여, 위 반응액을 12%의 non-reducing SDS-PAGE(no boiling and no reducing agent)를 이용하여 분리하여 활성을 확인하였다. 1차로 수행한 활성 확인 실험에서는 TEV endopeptidase 고생산 세포주로 선발된 pJK44-1, pJK44-2, pJK44-8, pJK44-13, pJK44-14, pJK44-17번 세포주 모든 처리구에서 TEV endopeptidase의 활성을 확인 할 수 없었다 (그림 30).

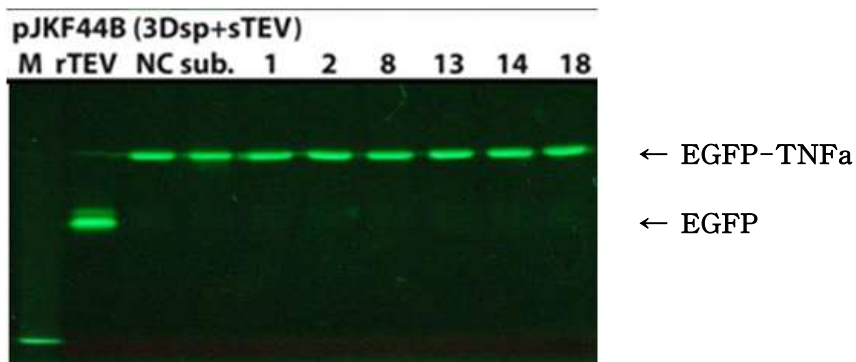


그림 30. 배 현탁세포 대량 배양 시스템 구축

이러한 연구결과를 바탕으로 TEV endopeptidase의 활성과 관련한 자료를 분석한 결과 TEV endopeptidase는 금속이온에 의하여 강하게 활성이 저해되는 특징을 지니고 있음을 확인하였고 TEV endopeptidase 고생산 세포주의 현탁배양시 사용한 액체배지의 조성을 확인한 결과 Na `K, Ca, Mg `Zn `Cd `Fe `Co `Ni의 금속이온이 포함되어있음을 확인하였다. 금속이온에 의한 TEV endopeptidase의 활성저해를 피하기 위하여 Negative control인 N75와 TEV endopeptidase 고생산 세포주인 pJK44-1, pJK44-2, pJK44-8, pJK44-13, pJK44-14, pJK44-17번 세포주 현탁배양세포 5g을 무균상태에서 harvest하여 초순수를 이용하여 5일간 배양 한 후에 상기와 동일한 방법으로 활성을 확인한 결과 약한 효소활성을 확인하였다 (그림 31).



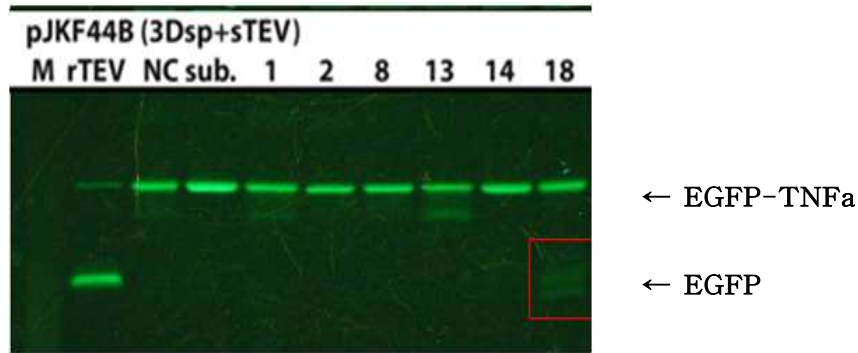


그림 31. 벼 현탁세포 대량 배양 시스템 구축

배양액을 50배 농축하여 효소활성을 확인한결과 모든 세포주에서 TEV endopeptidase의 활성을 확인 하였다 (그림 32). 일반적으로 TEV endopeptidase는 2mM의 Zn에 의하여 완전하게 활성이 억제되며, 각각의 금속이온 종류와 농도에 따라서 억제 정도가 다른 것으로 알려져 있음. TEV endopeptidase 고생산 세포주를 DDW에 배양 할 경우 당결핍조건이므로 본 과제에서 사용한 당결핍 현탁세포 특이적 발현 프로모터인 RAmy3D 프로모터는 작동하게 되어 TEV endopeptidase가 생산되었으나 세포배양에 직접적인 영향을 주는 각종 이온들의 부재로 인하여 세포활성과 유전자 발현 정도가 매우 낮은 수준으로 이루어지고 있는 것으로 판단됨. 이 결과를 바탕으로 고순도로 분리정제 한 TEV endopeptidase의 활성 및 생화학적 분석을 실시하였으며 이의 결과는 이후에 기술하였다.

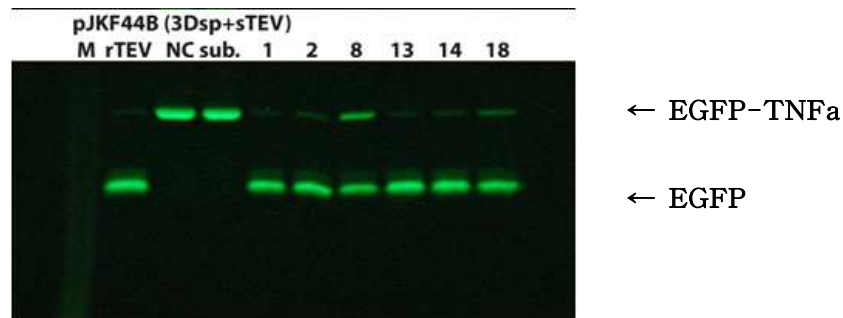


그림 32. 벼 현탁세포 대량 배양 시스템 구축

#### 아. 식물유래 TEV endopeptidase의 대량생산

##### (1) TEV endopeptidase 고생산 세포주의 대량배양

TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 생산된 TEV endopeptidase의 90% 이상 분리 정제 기술을 확립하기 위하여 pJKF45/17b cell line의 현탁세포를 이용하여 수행하였다.

pJKF45/17b cell line의 rice callus를 1L 삼각플라스크에 250mL의 N6 배지와 3% sucrose를 넣고 약 10~15g 접종 후 26°C에서 7일간 배양 한 후 10L air-lift 배양기에 2L의 N6 배지와 3%의 sucrose를 넣고 약 30g의 pJKF45/17b cell line의 rice callus를 접종한 후 25 °C에



서 분당 5 vvm 공기를 주입하면서 약 7일간 배양하였다. 배양 7일 후 vacume을 이용하여 배양액을 완전히 제거하고 2L의 N6배지에 sucrose가 제외된 발현유도 배지를 첨가하여 7일간 배양한 후 약 1.8L의 배양액을 각각 회수하였다 (그림 33).



그림 33. TEV endopeptidase 고 생산 세포주의 대량배양

자. 식물유래 TEV endopeptidase의 분리정제 체계 확립

(1) Rice callus로부터 recombinant TEV가 발현된 배양액의 농축

TEV endopeptidase를 분리정제 하기 위해 TEV endopeptidase를 포함하는 1.8L의 pJKF45/ 17b의 현탁배양액을 Quixstand benchtop system(GE healthcare)을 사용하여 농축하였다.

농축조건은 배양액 1.8L를 microfiltration hollow fiber cartridges (CFP-4-E-4MA, GE healthcare)를 사용해 필터한 후 30 kDa sampler hollow fiber cartridges(UFP-30-C-4MA, GE healthcare)를 사용해 약 80 mL로 농축하였다. 농축단계별로 TEV 활성을 조사하기 위해 농축액의 각각의 fraction을 12% acrylamide gel에 loading 하여 SDS-PAGE를 수행하여 결과를 그림 34에 나타내었다. Quixstand benchtop system을 사용하여 농축 할 때에 30kDa xampler hollow fiber cartridges(UFP-30-C-4MA, GE healthcare)를 사용하였을 때 목적 단백질이 정상적으로 농축되는 것을 확인하였다.

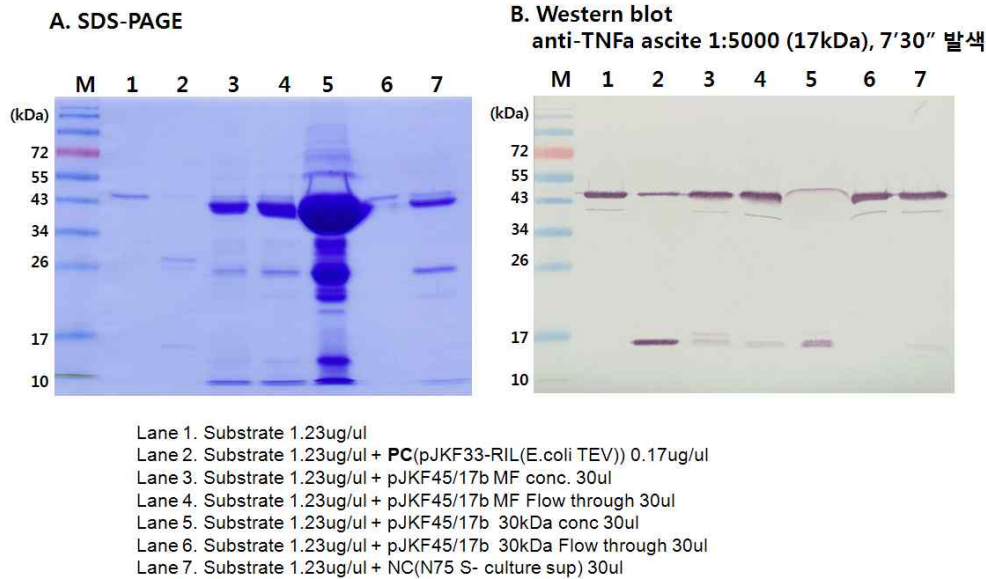


그림 34. Quixstand benchtop system을 사용한 배양액의 농축 후의 TEV endopeptidase의 활성 조사 (A : SDS-PAGE 결과 B : western blot 결과)

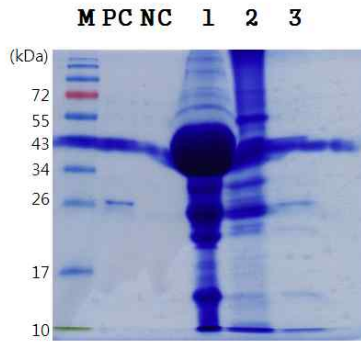
## (2). Ammonium sulphate 침전법을 이용한 TEV 정제

TEV endopeptidase를 정제하기 위해 ammonium sulphate 침전법을 이용해 농축하였다.

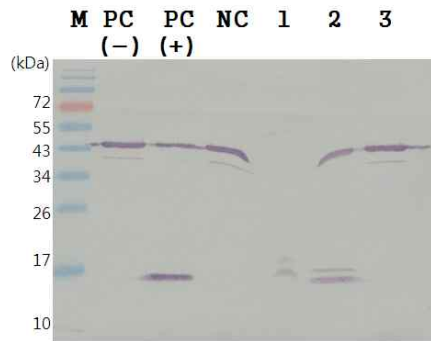
Ammonium sulphate 침전: pJKF45/17b cell line의 culture sup. 약 1.8L를 30kDa cut-off 농축하여 약 80 mL을 회수 하고 이것을 50%, 90% ammonium sulphate 침전을 함. 50% ammonium sulphate를 첨가한 후 4h, 4°C에서 stir 한 후 원심분리하여 침전된 시료를 50% 이하로 하고, 이때 sup.에 90% ammonium sulphate가 되게 첨가하여 동일한 방법으로 원심분리한 후 침전된 시료를 50%~90%로 명하였으며, 또한 이때의 sup.을 90%이상이라 명하여 각각의 시료의 TEV 활성을 측정하였다.

TEV 활성 측정: pJKF45/17b cell line의 ammonium sulphate 침전 후 각각의 sample을 사용해 TEV protease 활성을 조사하였다. 기질로 GFP와 TNF  $\alpha$  사이에 TEV 인식부위를 삽입한 fusion protein을 사용하였고 반응조건은 아래 표처럼 reaction mixture를 만든 후 30°C, 15시간 반응시킨 후 Native gel에서 GFP를 형광으로 확인 하였고, SDS-PAGE와 TNF  $\alpha$  antibody를 사용해 western blot을 수행하여 확인하였다. Western blot에 사용한 primary antibody, hTNF  $\alpha$  ascite(mouse)는 1:5000으로 사용하였고, secondary antibody는 alkaline phosphatase가 conjugation된 anti-mouse IgG (Goat)(Sigma A2429)를 사용하였음. 발색은 BCIP/NBT로 5분 발색 하였음. pJKF45/16b, 17b, 2a cell line 각각의 sample의 ion-exchange chromatography 수행 후 각각의 fraction을 사용해 TEV protease 활성을 측정한 결과 TEV 활성은 50%-90% 이내 시료에서 나타내었다 (그림 35).

**A. SDS-PAGE**



**B. TEV Activity test : pJKF45/17b 농축 sample**



PC(-) : substrate(1.24ug/ul)  
 PC(+) : substrate(1.24ug/ul) + pJKF33-RIL(*E coli*) 0.17ug/ul  
 NC : substrate(1.24ug/ul) + P15 콜레라 CM sepharose (pH9.78) 30ul  
 Lane 1 : substrate(1.24ug/ul)  
 + pJKF45/17b conc. ≤50% Ammonium sulfate 침전 30ul  
 Lane 2 : substrate(1.24ug/ul)  
 + pJKF45/17b conc. ≤ 90% Ammonium sulfate 침전 30ul  
 Lane 3 : substrate(1.24ug/ul)  
 + pJKF45/17b F.T. ≤ 90% Ammonium sulfate 침전 30ul  
 → 30°C, 15.5h standing

그림 35. Ammonium sulphate 침전 후 TEV 활성 측정

(3) Ion-exchange chromatography를 이용한 분리정제

TEV endopeptidase의 theoretical pI 및 MW를 확인한 결과 theoretical pI 8.67 및 theoretical MW 약 28kDa임을 확인하였음(Expasy site(www. expasy.org)). 각각의 cell line으로부터 TEV protease를 정제하여 TEV 활성을 측정하고 cell line을 선발하여 FPLC를 사용해 분리정제 하였다.

pJKF45/17b cell line으로부터 TEV protease를 정제하기 위한 sample 준비: pJKF45/16b, 17b, 2a 배양액을 30kDa xampler hollow fiber cartridges(UFP-30-C-4MA, GE healthcare)를 사용하여 농축한 약 80 mL의 농축액을 CM-sepharose resin을 사용하여 ion-exchange chromatography를 수행하였다. 약 80 mL의 농축액에 1.2mL의 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8.8mL의 0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 1mL의 1M NaCl을 넣고 3차수를 넣어 100mL (pH 6.18)로 맞춘 후 4°C에서 2시간 동안 stir 하였다. 0.45 um로 필터 한 후 약 100 mL의 sample을 준비 했다.

CM sepharose column 준비 : 15 cm x 1.5 cm Glass Econo-Column (비엔비, Cat #. 737-4156)에 CM sepharose Fast flow (GE, 17-0719-01) resin 10 mL을 넣고 3차수로 약 50 mL 세척한 후 50 mM sodium phosphate에 10 mM NaCl이 첨가된 equilibration buffer (pH 6.0), 약 100 mL로 equilibration 하였다.

pJKF45/ 16b, 17b, 2a sample의 ion-exchange chromatography 수행: 필터 후 상층액 약 100 mL을 CM sepharose resin이 packing 된 column에 loading 한 후 flow through(FT)를 회수 했다. Wash buffer 20 mL로 세척하고, Elution buffer I-IV로 각각 10 mL씩 elution 하였다 (그림 36).

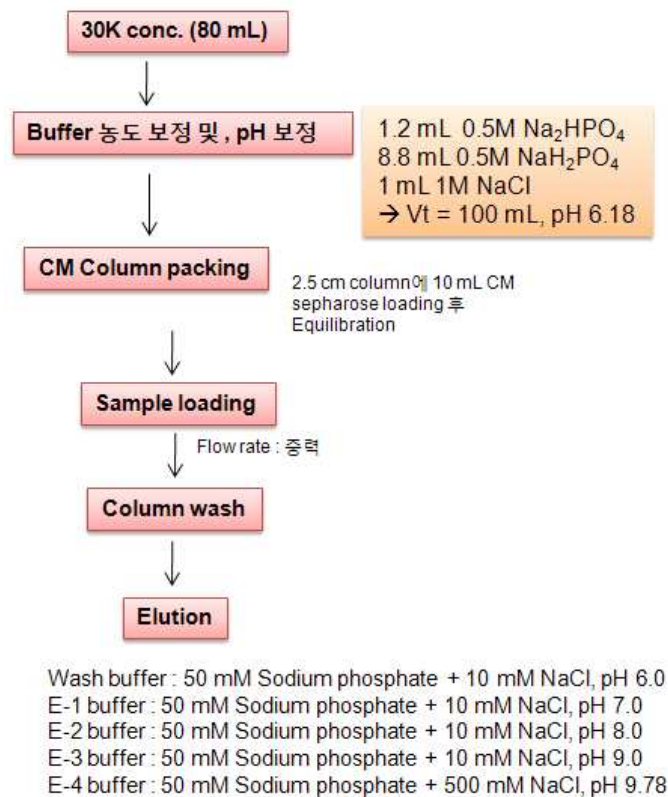


그림 36. pJKF45/17b Ion-exchange chromatography 수행 모식도

Ion-exchange chromatography를 통한 rice callus로부터 recombinant TEV protease의 분리정제 및 활성조사: pJKF45/16b, 17b, 2a cell line 각각의 sample의 ion-exchange chromatography 후 각각의 fraction을 사용해 TEV protease 활성을 조사하였음. 기질로 GFP와 TNF  $\alpha$  사이에 TEV 인식부위를 삽입한 fusion protein을 사용하였고 반응조건은 아래 표처럼 reaction mixture를 만든 후 30°C, 15시간 반응시킨 후 Native gel에서 GFP를 형광으로 확인하였고, SDS-PAGE와 TNF  $\alpha$  antibody를 사용해 western blot을 수행하여 확인하였다. Western blot에 사용한 primary antibody, hTNF  $\alpha$  ascite(mouse)는 1:5000으로 사용하였고, secondary antibody는 alkaline phosphatase가 conjugation된 anti-mouse IgG (Goat)(Sigma A2429)를 사용하였다. 발색은 BCIP/NBT로 5분 발색하였음. pJKF45/16b, 17b, 2a cell line 각각의 sample의 ion-exchange chromatography 수행 후 각각의 fraction을 사용해 TEV protease 활성을 측정한 결과 pJKF45/17b cell line에서 pH 9.0이상에서 TEV protease가 CM sepharose resin에서 elution 되어 활성이 나타나는 것을 확인하였다 (그림 37).

표 4. TEV protease의 활성 조사를 위한 조성표

	PC		pJKF45/17b 각각의 fraction
	TEV protease + substrate	Only substrate	
Substrate(1.24ug/ul)	1 ul	1 ul	1 ul
10X reaction buffer	4 ul	4 ul	4 ul
TEV protease (1unit/ul)	1 ul	-	-
F45/17b 각각의 fraction	-	-	30 uL
3차 증류수	34 ul	35 ul	5 ul
Final volume	40 ul	40 ul	40 ul

· 10X TEV reaction buffer: 250mM Tris-HCl(pH 7.5), 5mM EDTA, 750mM NaCl, 10mM DTT  
 · TEV protease : AcTEV™ protease (Invitrogen / Cat. 12575-015)

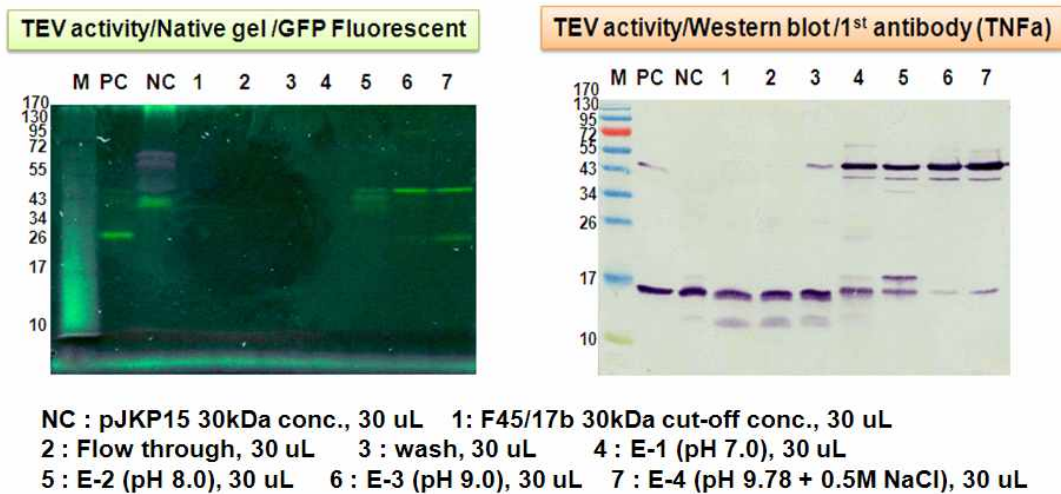


그림 37. pJKF45/17b Ion-exchange chromatography 후 TEV protease의 활성 조사

AKTA prime FPLC를 이용한 pJKF45/ 17b sample의 ion-exchange chromatography 수행: 필터 후 상층액 약 100 mL을 HiTrap CM-FF column 1mL x 2ea에 loading 한 후 Wash buffer (50 mM sodium phosphate buffer + 10 mM NaCl, pH 6.0) 40 mL로 세척하고, pH gradient 로 Elution 하여 각각의 fraction을 1 mL씩 회수 하였다. Equilibration buffer(50 mM sodium phosphate buffer + 10 mM NaCl, pH 6.0) 와 Elution 3 buffer (50 mM sodium phosphate buffer + 10 mM NaCl, pH 9.0)을 gradient 하여 elution 했다 (그림 38).



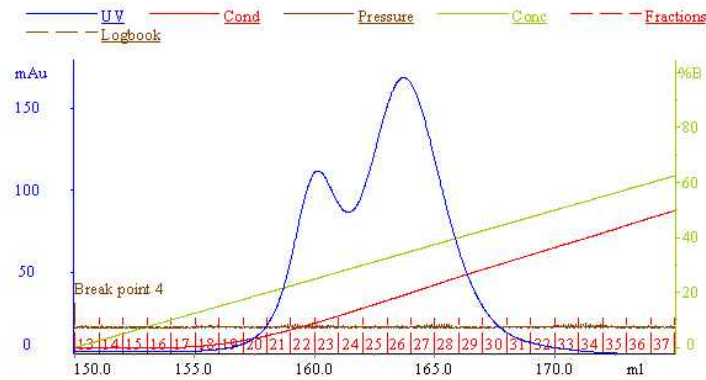
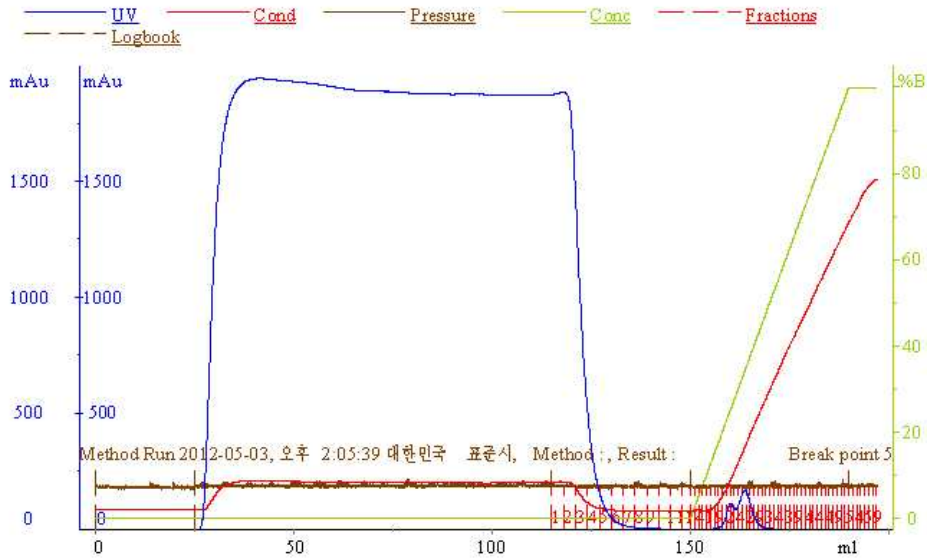


그림 38. FPLC를 이용한 pJKF45/17b의 Ion-exchange chromatography

FPLC를 이용한 Ion-exchange chromatography 수행후 TEV protease의 활성: pJKF45/17b sample의 ion-exchange chromatography 후 각각의 fraction을 사용해 TEV protease 활성을 조사하였다. 기질로 GFP와 TNF  $\alpha$  사이에 TEV 인식부위를 삽입한 fusion protein을 사용하였고 반응조건은 위의 표처럼 reaction mixture를 만든 후 30°C, 15시간 반응시킨 후 SDS-PAGE와 TNF  $\alpha$  antibody를 사용해 western blot을 수행하여 확인하였다. Western blot에 사용한 primary antibody, hTNF  $\alpha$  ascite(mouse)는 1:5000으로 사용하였고, secondary antibody는 alkaline phosphatase가 conjugation된 anti-mouse IgG (Goat)(Sigma A2429)를 사용하였다. 발색은 BCIP/NBT로 5분 발색하였음. pJKF45/17b sample의 ion-exchange chromatography 수행 후 각각의 fraction을 사용해 TEV protease 활성을 측정한 결과 fraction #20~30에서 TEV protease 활성을 나타냈다 (그림 39). fraction #20-30을 회수하여 Dialysis 한 후 동결건조 하고 이를 이용해 생화학적인 특성을 조사하였다.

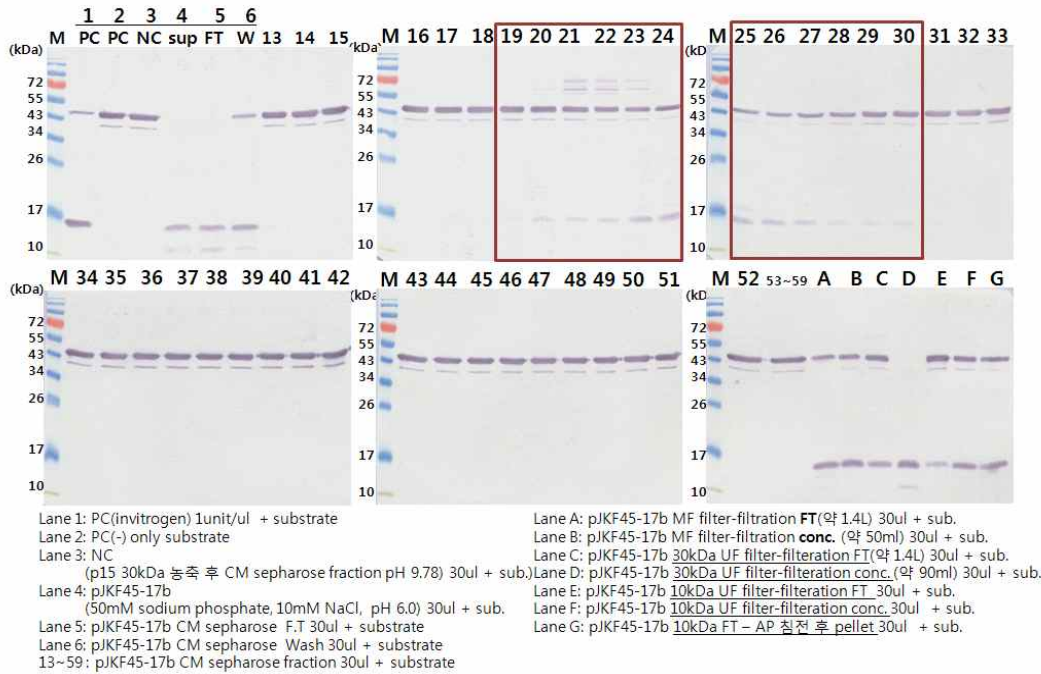


그림 39. FPLC를 이용한 pJKF45/17b의 Ion-exchange chromatography 후 TEV activity 조사

차. 분리 정제한 고순도 TEV(pJKF33-RIL)의 1unit 결정

(1). 고순도 TEV(pJKF33-RIL)의 농도에 따른 활성 조사

His-tag 정제한 JKF33-RIL 세포유래 TEV endopeptidase를 농도(0ug, 0.1ug, 0.2ug, 0.4ug, 0.5ug, 0.6ug, 0.8ug, 1ug)에 따른 활성을 측정하였다.

Enzyme reaction mixture: His-tag 정제한 TEV endopeptidase의 활성을 조사하기 위해 EGFP-hFXa TEV-TNFa substrate protein을 이용함. 아래 표와 같이 enzyme reaction mixture 를 만든 후 30°C, 12h 동안 반응시켰다.

TEV endopeptidase 활성 분석: Native PAGE, SDS-PAGE analysis 및 western blot으로 분석하였다. EGFP 형광을 보기위해 Native PAGE gel(12%, SDS 제외)을 만들었으며, reaction sample 30ul 과 5X non-reduce sample buffer(merceptoethanol 제외) 6ul 를 혼합하여 36ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, Gel doc에서 UV아래 EGFP band를 확인하였다. SDS-PAGE(12%), western blot analysis은 reaction sample 30ul 과 5X reduce sample buffer 6ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 36ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, western blot을 통해 잘린 band를 확인하였다. 정제한 TEV 0.8 ug 이상 사용하였을 때 invitrogen에서 판매하는 recombinant TEV (1 unit)와 동일한 활성을 나타냈다 (그림 40). 따라서 1 unit은 EGFP-hFXa-TEV recognition sequence-TNFa substrate protein, 1.24 ug을 30°C 에서 12시간 동안 90%이상 cleavage 할 때에 필요한 TEV endopeptidase의 양으로 나타났다.



표 5. TEV protease의 활성 조사를 위한 조성표

	stock 농도	Working 농도	PC	TEV(pJKF33-RIL) 농도								단위	
			TEV protease (Invitrogen)	0	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1	ug	
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24 ug	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ul
10X reaction buffer			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	ul
TEV protease (Invitrogen)	1 unit/ul	1 unit	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ul
pJKF33-RIL 유래 TEV protease			-	-	0.59	1.18	2.4	2.9	3.5	4.7	5.9		ul
DW	-	-	25	26	25.4	24.8	23.7	23.1	22.5	21.3	20.1		ul
Final volume			30		30	30	30	30	30	30	30		ul

· 10X reaction buffer : 250mM Tris-HCl(pH7.5), 750mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM DTT  
 · Positive control : AcTEV™ protease ( invitrogen / cat. 12575-015)

표 6. Western blot에 사용한 antibody

	1차 antibody	2차 antibody
Name	anti-hTNFa ascite fluid	anti-mouse IgG (Whole molecule) alkaline phosphatase conjugated polyclonal antibody
Working concentration	1: 5000	1:10,000
제조회사	전주생물소재연구소	Sigma/Cat. A3562

발색 : BCIP/NBT solution (발색 4min)

카. 분리 정제한 고순도의 TEV(pJKF33-RIL)의 저장 및 포장기술 확립

- (1) 분리 정제한 고순도의 TEV endopeptidase(pJKF33-RIL)의 최적 제형 및 효소 활성을 통한 최적 저장 조건 확립(저장온도, 저장기간 등)

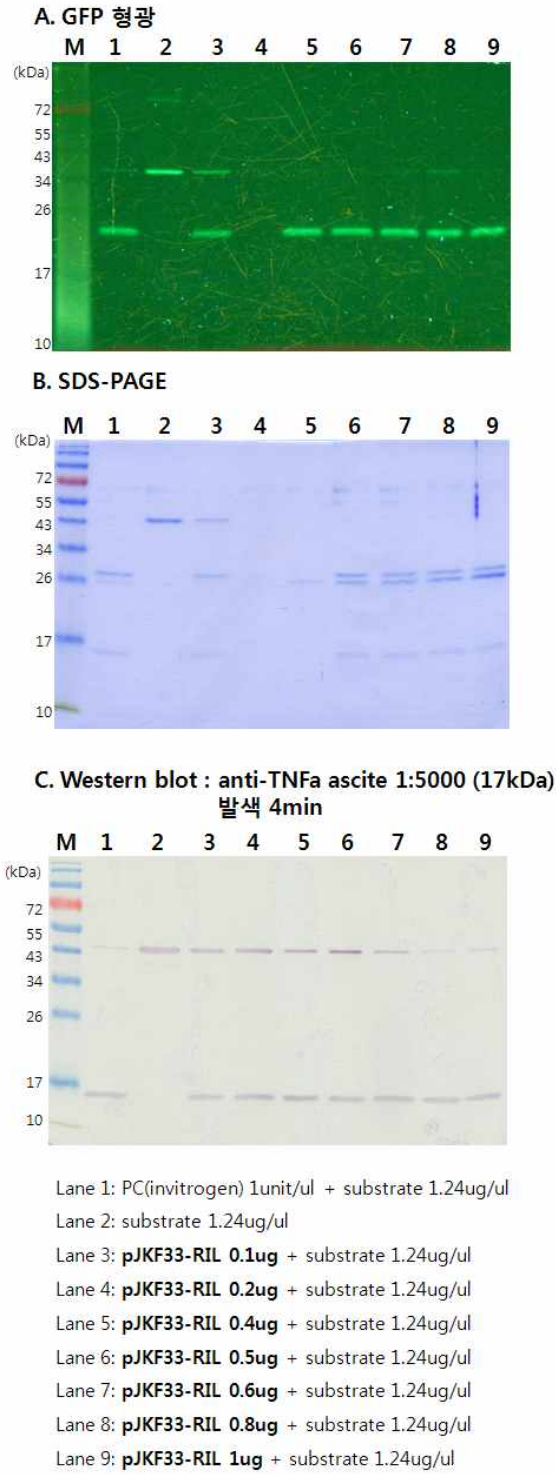


그림 40. TEV endopeptidase 농도에 따른 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)

현재 판매되고 있는 TEV의 제형은 액상 또는 동결건조된 형태로 판매됨. TEV endopeptidase의 최적 활성을 나타내는 buffer 조성에 glycerol을 첨가하여 액상 형태의 제형을 만들어 저장온도 (4°C, -20°C, -70°C)와 보관 기간에 따라 TEV endopeptidase의 활성을 조사하였다.

정제한 TEV endopeptidase의 분주 및 보관: His-tag 정제한 TEV endopeptidase (pJKF33-RIL)를 50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7.5)에 glycerol을 50%가 되게 첨가한 후 mix 해서 0.068 ug과 0.17 ug이 되게 분주해서 각각 15개씩 4°C, -20°C, -70°C에 보관하고, 0일, 1일, 7일, 1개월부터 12개월이 각각 되었을 때 시료를 꺼내어 TEV 활성을 측정 하였다.

Enzyme reaction mixture: His-tag 정제한 TEV endopeptidase의 활성을 조사하기 위해 EGFP-hFXa TEV-TNFa substrate protein을 이용함. 아래 표와 같이 enzyme reaction mixture 를 만든 후 30°C, 16h 동안 반응시킴. TEV endopeptidase는 각각 4°C, -20°C, -70°C에서 1일, 7일, 1개월에서부터 10개월까지 보관한 sample들로서 매달 정해진 시간이 되었을 때에 반응시켜 활성을 측정하였다.

표 7. TEV protease의 활성 조사를 위한 조성표

	stock 농도	사용 농도	NC	PC	4°C		-20°C		-70°C		단위
			substrate	TEV protease (Invitrogen)	0.068ug	0.17g	0.068ug	0.17g	0.068ug	0.17g	
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24 ug	1	1	1	1	1	1	1	1	ul
10X reaction buffer			3	3	3	3	3	3	3	3	ul
TEV protease (Invitrogen)	1unit /ul	1unit	-	1	-	-	-	-	-	-	ul
pJKF33-RIL 유래 TEV protease			-	-	0.4	1	0.4	1	0.4	1	ul
DW	-	-	26	25	5	5	5	5	5	5	ul
Final volume			30	30	30	30	30	30	30	30	ul
· 10X reaction buffer : 250mM Tris-HCl(pH7.5), 750mM NaCl, 5mM CaCl <sub>2</sub> , 10mM DTT · Positive control : AcTEV™ protease ( invitrogen / cat. 12575-015)											

TEV endopeptidase 활성 분석: Native PAGE, SDS-PAGE analysis 및 western blot으로 분석하였다. EGFP 형광을 보기위해 Native PAGE gel(12%, SDS 제외)을 만들었으며, reaction sample 30ul 과 5X non-reduce sample buffer(merceptoethanol 제외) 6ul 를 혼합하여 36ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, Gel doc에서 UV아래 EGFP band를 확인하였다. SDS-PAGE(12%), western blot analysis은 reaction sample 30ul 과 5X reduce sample buffer 6ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 36ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, western blot을 통해 잘린 band를 확인하였다.

TEV endopeptidase의 저장온도와 보관기간에 따른 활성을 조사한 결과 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.5)에 50% glycerol을 첨가하여 액상 제형으로 만들어 4°C에 보관했을 경우 보관기간 1개월 이후부터는 효소 활성이 감소하기 시작함. 반면 -20°C와 -70°C에 보

관했을 경우 24개월이 지나도 효소 활성에 차이가 없는 것으로 사료 된다 (그림 41-47). 따라서 TEV endopeptidase의 최적 액상 제형은 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.5)에 50% glycerol로 하고 보관은 -70°C에서 보관하는 것이 최적 조건임을 확인 하였다.

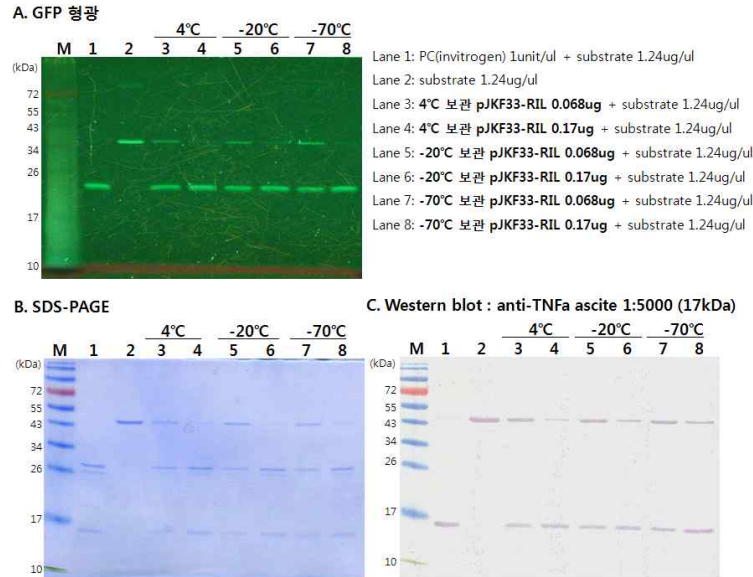


그림 41. TEV endopeptidase의 각각의 저장온도에서 저장기간 1일째 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)

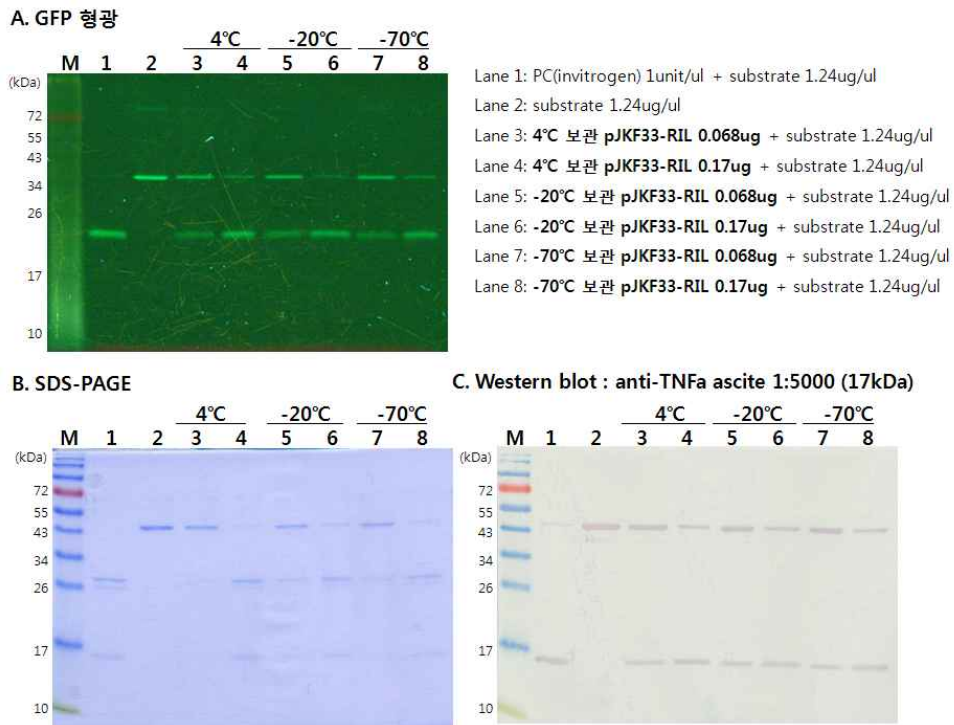


그림 42. TEV endopeptidase의 각각의 저장온도에서 저장기간 7일째 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)

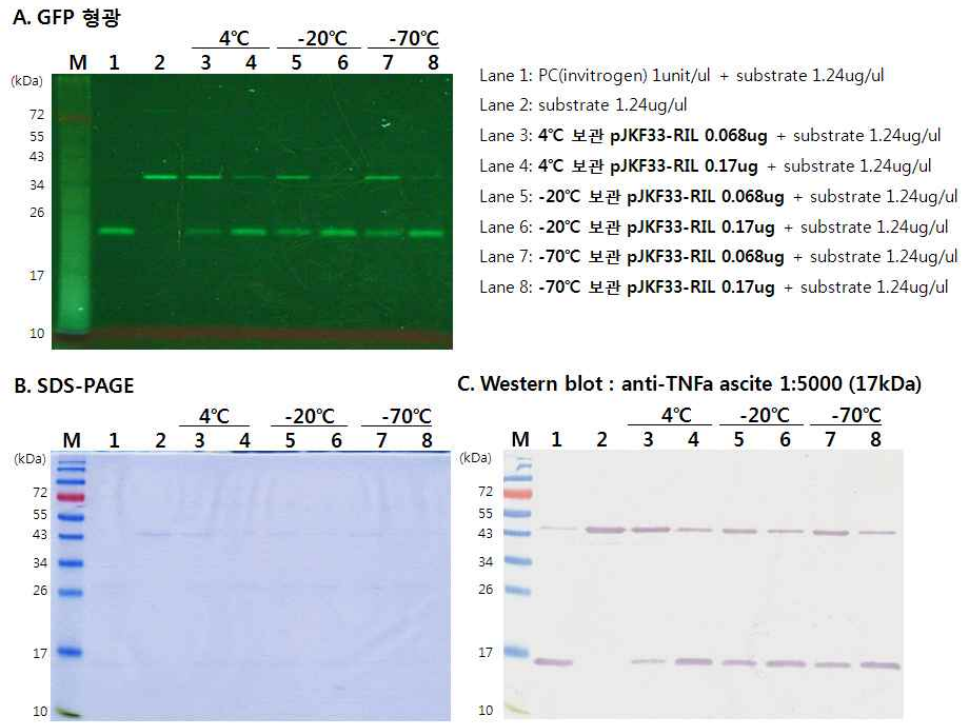


그림 43. TEV endopeptidase의 각각의 저장온도에서 저장기간 1개월째 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)

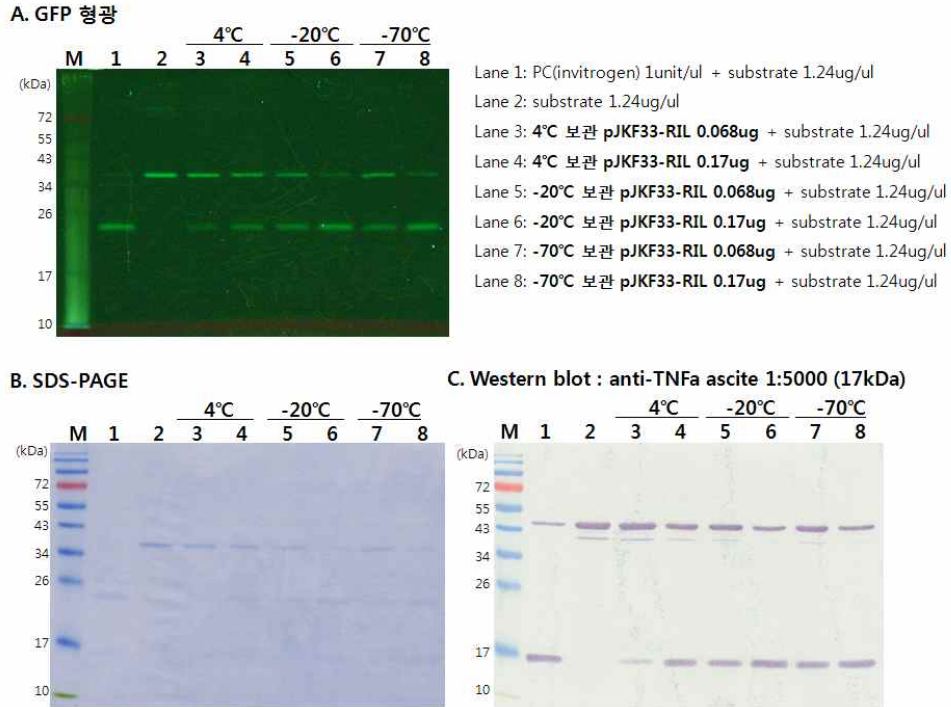


그림 44. TEV endopeptidase의 각각의 저장온도에서 저장기간 5개월째 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)

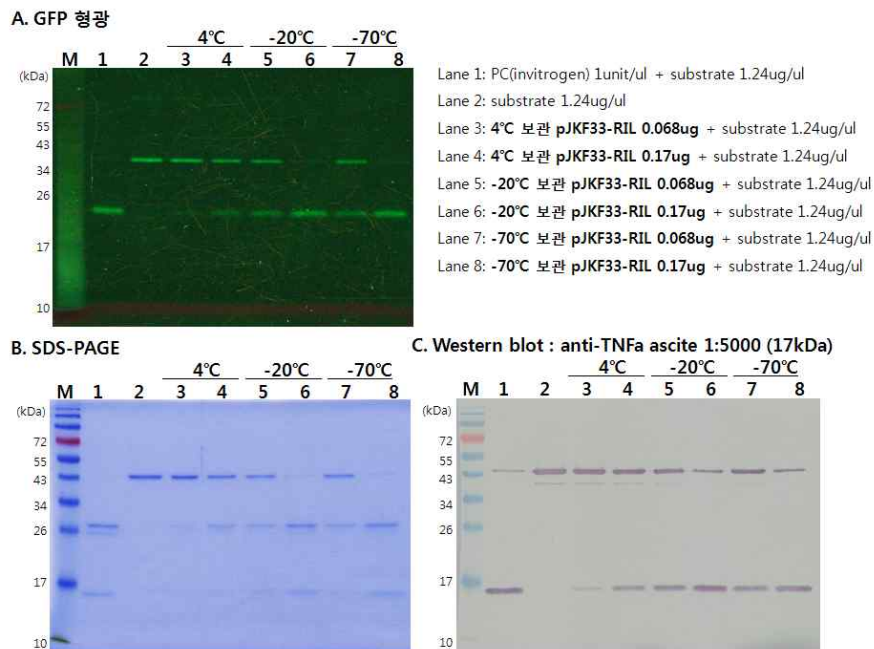
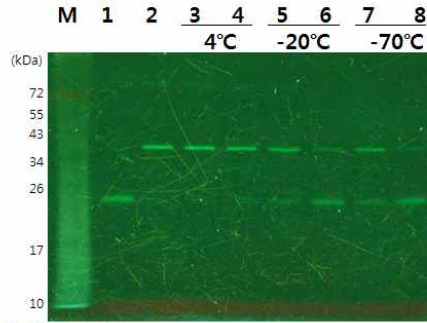


그림 45. TEV endopeptidase의 각각의 저장온도에서 저장기간 10개월째 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)



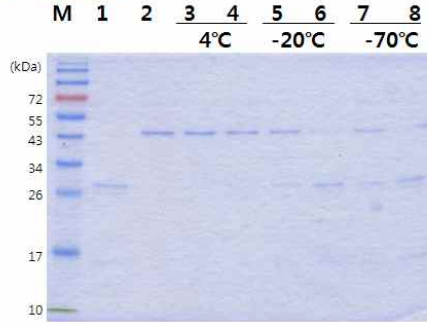
**His-tag 정제한 *E. coli* TEV(pJKF33/RIL) - 저장온도 및 기간에 따른 Activity test(21month)**

**A. GFP 형광**



Lane 1: PC(invitrogen) 1unit/ul + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 2: substrate 1.24ug/ul  
 Lane 3: 4°C 보관 pJKF33-RIL 0.068ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 4: 4°C 보관 pJKF33-RIL 0.17ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 5: -20°C 보관 pJKF33-RIL 0.068ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 6: -20°C 보관 pJKF33-RIL 0.17ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 7: -70°C 보관 pJKF33-RIL 0.068ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 8: -70°C 보관 pJKF33-RIL 0.17ug + substrate 1.24ug/ul

**B. SDS-PAGE**



**C. Western blot : anti-TNFa ascite 1:5000 (17kDa) -3'30"**

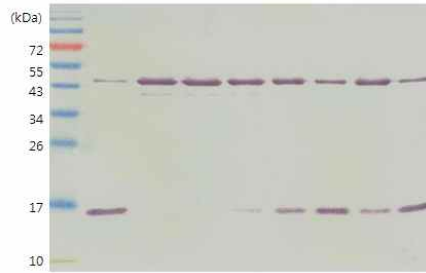
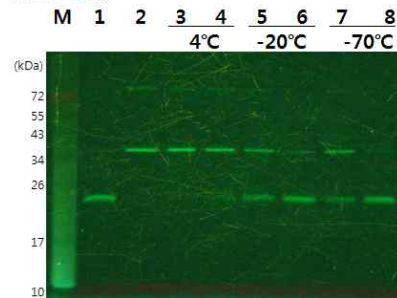


그림 46. TEV endopeptidase의 각각의 저장온도에서 저장기간 21개월째 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)

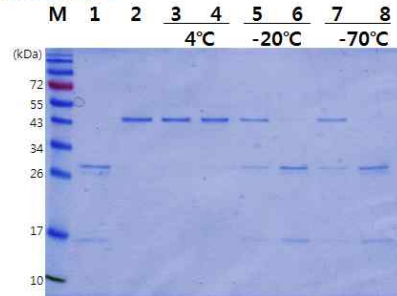
**His-tag 정제한 *E. coli* TEV(pJKF33/RIL) - 저장온도 및 기간에 따른 Activity test(24month)**

**A. GFP 형광**



Lane 1: PC(invitrogen) 1unit/ul + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 2: substrate 1.24ug/ul  
 Lane 3: 4°C 보관 pJKF33-RIL 0.068ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 4: 4°C 보관 pJKF33-RIL 0.17ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 5: -20°C 보관 pJKF33-RIL 0.068ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 6: -20°C 보관 pJKF33-RIL 0.17ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 7: -70°C 보관 pJKF33-RIL 0.068ug + substrate 1.24ug/ul  
 Lane 8: -70°C 보관 pJKF33-RIL 0.17ug + substrate 1.24ug/ul

**B. SDS-PAGE**



**C. Western blot : anti-TNFa ascite 1:5000 (17kDa) -3'30"**



그림 47. TEV endopeptidase의 각각의 저장온도에서 저장기간 24개월째 TEV 활성 조사 (A: native gel, B: SDS-PAGE, C: western blot)



과. 식물세포 유래 TEV endopeptidase의 생화학적 특성 규명

(1) TEV endopeptidase 농도에 따른 활성 조사

정제한 TEV endopeptidase의 농도에 따른 효소 활성을 측정 하였다. 정제한 EGFP-hFXa TEV-TNFa substrate protein을 이용하여 recombinant TEV 활성을 측정 하였다. 아래와 같이 enzyme reaction mixture를 만든 후 30°C, 16h 동안 반응시켰다. SDS-PAGE(12%), western blot analysis은 reaction sample 40ul 과 5X reduce sample buffer 8ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 48ul를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, western blot analysis를 수행 하였다.

표 8. TEV protease의 활성 조사를 위한 조성표

	stock 농도	사용 농도	기질	PC	TEV pJKF45-17b volume							단위 ul	
				TEV protease (Invitrogen)	5	10	15	20	25	30	35		
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24 ug	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ul
10X reaction buffer			4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	ul
TEV protease (Invitrogen)	1 unit/ul	1 unit	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	ul
pJKF45/17b			-	-	5	10	15	20	25	30	35	ul	
DW	-	-	35	34	35	30	25	20	15	10	5	ul	
Final volume			40	40	40	40	40	40	40	40	40	ul	

· 10X reaction buffer  
: 250mM Tris-HCl(pH7.5), 750mM NaCl, 10mM DTT, 5mM EDTA  
· Positive control : AcTEV™ protease ( invitrogen / cat. 12575-015)

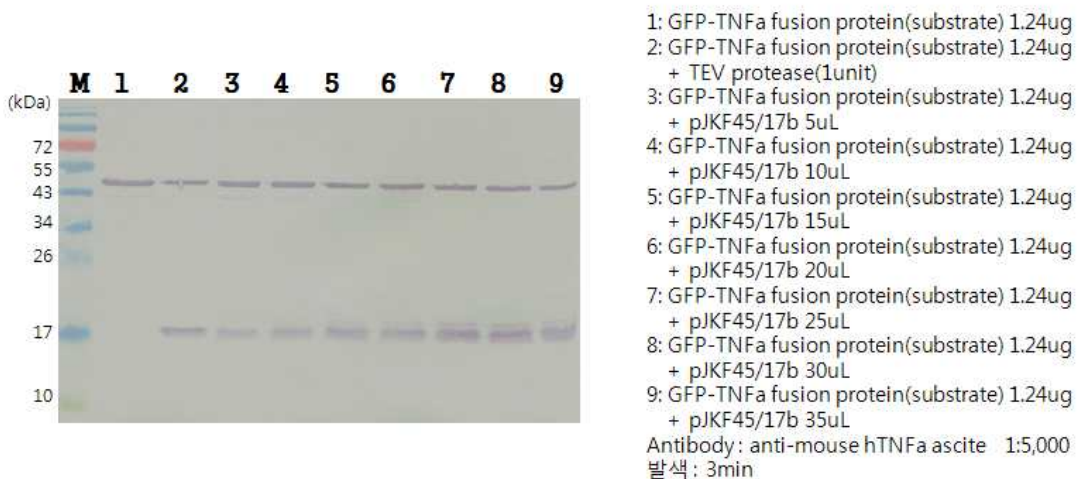


그림 47. 정제한 TEV endopeptidase (pJKF45/17b, 50-90%)의 농도에 따른 효소 활성 조사

(2) 반응온도에 따른 정제된 TEV endopeptidase (pJKF45/17b, 50%-90%)의 활성 조사

정제한 TEV endopeptidase(pJKF45/17b, 50%-90%)의 반응온도에 따른 효소 활성을 조사하기 위해 10°C, 20°C, 30°C, 40°C 각각에서 아래 reaction mixture를 16h 동안 반응 시킨 후 SDS-PAGE(12%), western blot을 통해 활성을 분석하였다.

정제한 TEV endopeptidase(pJKF45/17b, 50%-90%)의 반응온도에 따른 효소 활성을 조사한 결과 30°C와 40°C에서 최적의 활성을 나타내었으며, 20°C 이하에서는 endopeptidase 활성이 감소하는 것을 확인 하였다 (그림 48).



그림 48. 정제한 TEV endopeptidase (pJKF45/17b, 50-90%)의 반응온도에 따른 효소 활성 조사

(3) pH에 따른 정제된 TEV endopeptidase(pJKF45/17b, 50%-90%)의 활성 조사

정제한 TEV endopeptidase (pJKF45/17b, 50%-90%)의 pH에 따른 효소 활성을 조사하기 위해 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 buffer 각각에서 각에서 아래 reaction mixture를 만든 후 16h 동안 반응 시킨 뒤 SDS-PAGE(12%), western blot을 통해 활성을 분석하였다.

정제한 TEV endopeptidase (pJKF45/17b, 50%-90%)의 pH에 따른 효소 활성을 조사한 결과 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 buffer 각각에서 endopeptidase의 활성의 차이는 거의 없었다 (그림 49).

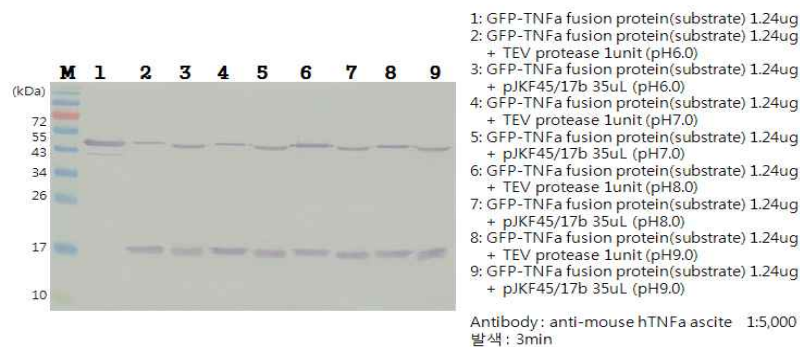


그림 49. 정제한 TEV endopeptidase (pJKF45/17b, 50-90%)의 pH에 따른 효소 활성 조사

## 2. 식물유래 Enterokinase 생산기술 개발 및 산업화

### 가. 식물유래 Enterokinase의 대량생산 및 분리정제 체계 확립

#### (1) Enterokinase 고생산 세포주의 대량배양

Enterokinase 고생산 세포주로부터 생산된 Enterokinase의 분리정제 기술을 확립하기 위하여 Enterokinase 고생산 세포주인 pJKF40/b4 cell line의 현탁세포를 이용하여 수행하였다. 각각의 세포주를 1L 삼각플라스크에 250mL의 N6 배지와 3% sucrose를 넣고 pJKF40/b4 cell line의 rice callus를 약 10~15g 접종 후 26°C에서 7일간 배양 한 후 10L air-lift 배양기에 2L의 N6배지와 3%의 sucrose를 넣고 약 30g의 pJKF40/b4 cell line의 rice callus를 접종한 후 25 °C에서 분당 5 vvm 공기를 주입하면서 약 7일간 배양하였다. 배양 7일 후 배양액을 제거하고 2L의 N6배지에 sucrose가 제외된 발현유도 배지를 첨가하여 7일간 배양한 후 약 1.8L의 배양액을 각각 회수하였다.

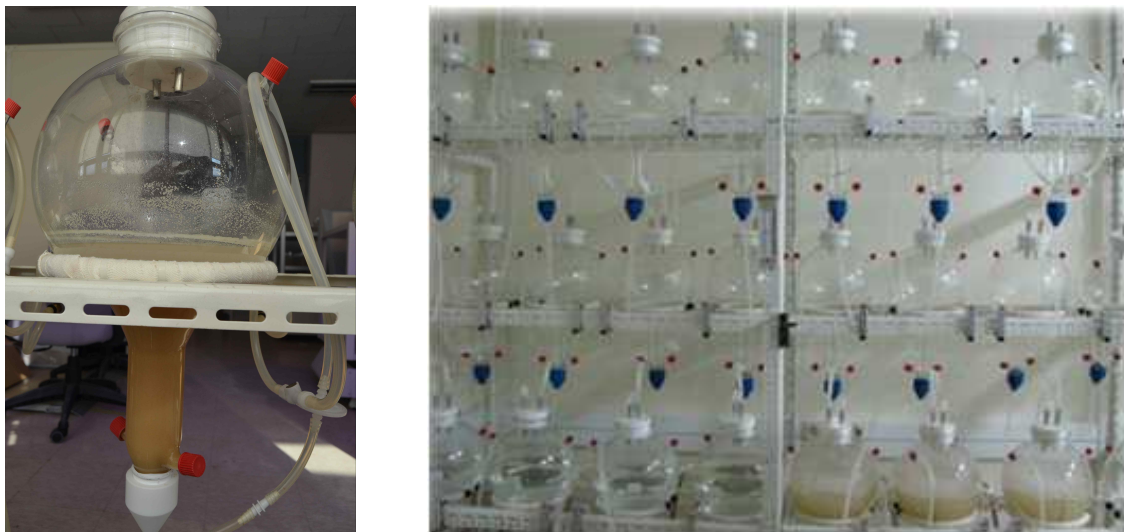


그림 50. Recombinant human enterokinase 고생산 세포주의 대량배양

### 나. 식물유래 Enterokinase의 분리정제 체계 확립

#### (1) Rice callus로부터 recombinant human enterokinase, light chain이 발현된 배양액의 농축

Enterokinase를 분리정제 하기 위해 Enterokinase를 포함하는 1.8L의 pJKF40/b4 cell line의 현탁배양액을 Quixstand benchtop system(GE healthcare)을 사용하여 농축하였다.

농축조건은 배양액 1.8L를 microfiltration hollow fiber cartridges (CFP-4-E-4MA, GE healthcare)를 사용해 필터한 후 30 kDa sampler hollow fiber cartridges(UFP-30-C-4MA, GE healthcare)를 사용해 약 80 mL로 농축하였다. 농축단계별로 enterokinase의 band를 조사하기 위해 농축액의 각각의 fraction을 12% acrylamide gel에 loading 하여 SDS-PAGE 및 western blot을 수행하여 결과를 그림 51에 나타내었다. Quixstand benchtop system을 사용하여 농축 할 때에 30kDa xampler hollow fiber cartridges(UFP-30-C-4MA, GE healthcare)를 사용 할 경우 목적 단백질인 enterokinase가 정상적으로 농축되는 것을 확인하였다.

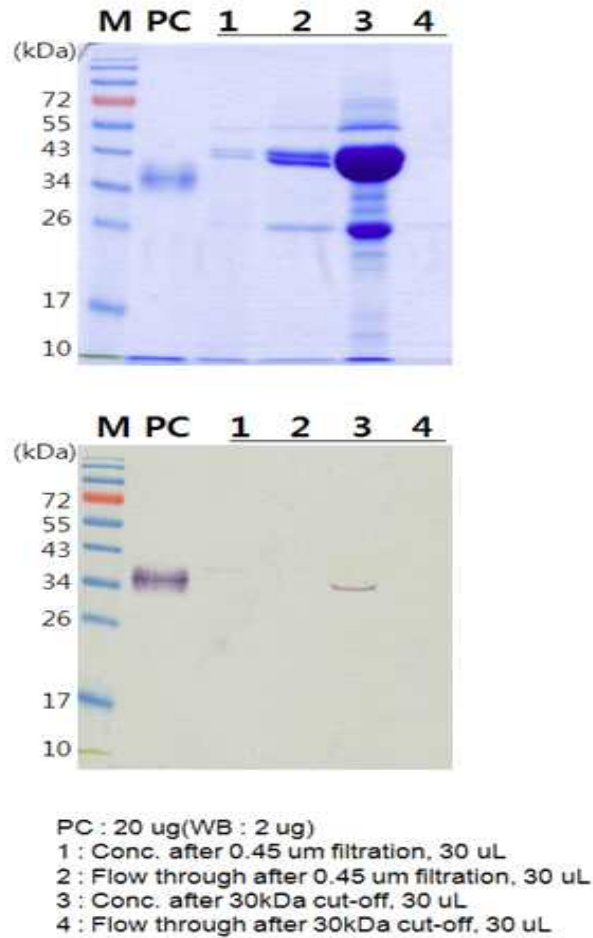


그림 51. Quixstand benchtop system을 사용한 배양액 농축 후의 enterokinase의 band 확인 (A : SDS-PAGE 결과 B : western blot 결과)

(2) Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 AKTA prime FPLC를 이용한 His-tag 정제 수행

고순도로 분리정제할 시료는 30kDa cut-off 한 후 농축 된 약 70 mL에 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.74 mL과 0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.26 mL을 넣고 NaCl, 2.92g을 넣어 0.5M이 되게 한 후 imidazole 농도가 final 10 mM이 되게 0.068g을 첨가한 후 혼합하였다. 이후 pH 7.4로 맞추고 total volume을 약 100 mL로 만들고 4°C에서 2h 동안 stir 함. 시료의 필터 후 상층액 약 70 mL을 HisTrap FF, 5 mL column에 loading 한 후 wash buffer I (50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4)로 30 mL 세척하고, wash buffer II (50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4)로 85 mL 세척 한 후 imidazole의 gradient로 elution 하였다. 각각의 fraction을 SDS-PAGE와 western blot을 수행하여 enterokinase의 band를 확인하고 purity 확인 하였다 (그림 52, 53). Recombinant human enterokinase, light chain은 elute fraction 11과 12 (lane 8과 9)에서 band를 확인 하였고 SDS-PAGE 상에서 90% 이상의 purity를 확인하였다.

Purification of human enterokinase by Histrap FF (5 mL)

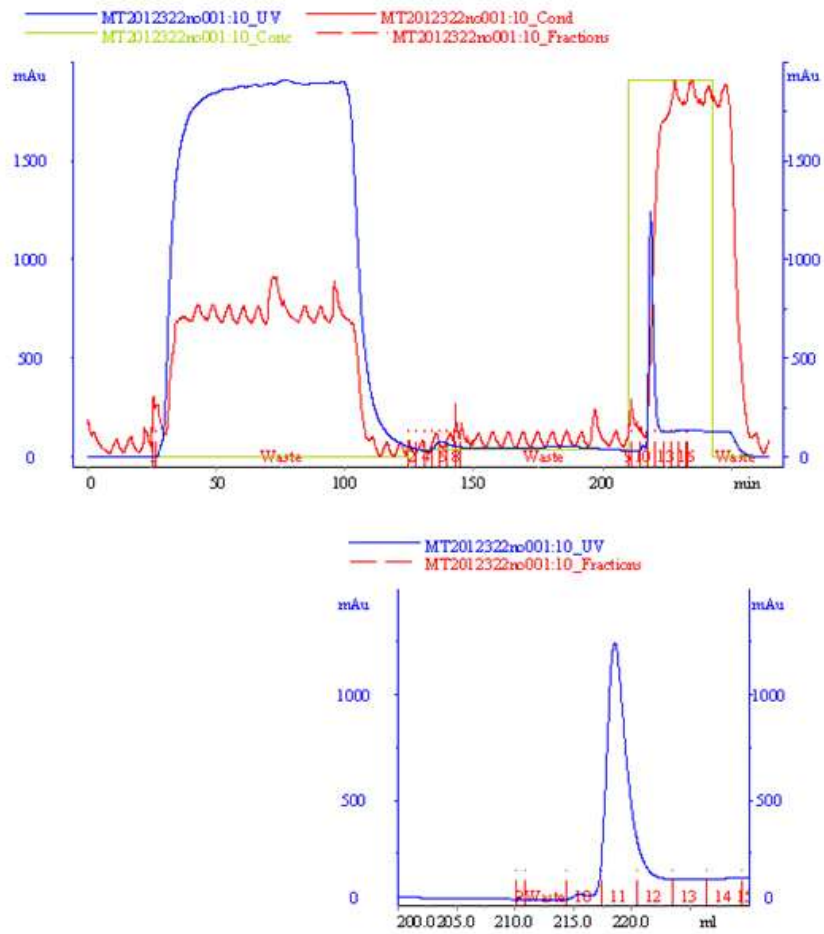
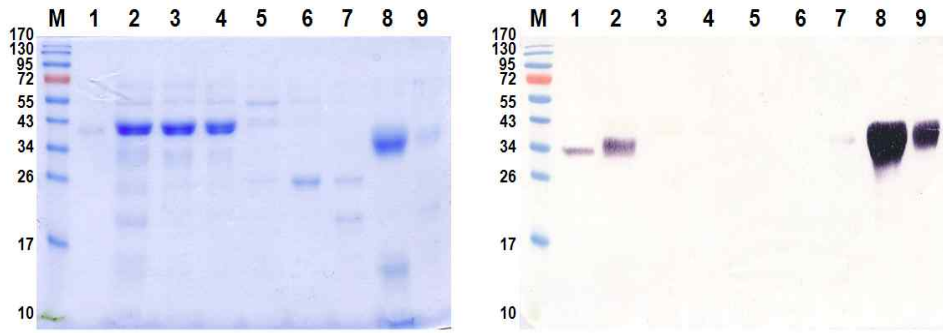


그림 52. Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 AKTA prime FPLC를 이용한 His-tag 정제수행





- 1 : PC
- 2 : F40/b4 농축 후 50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 10 mM imidazole (pH 7.4)  
→ 0.45 um filter 한 Culture sup.
- 3 : Flow through → 30 uL loading
- 4 : Wash I (50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) 30 mL → 30 uL loading
- 5 : Wash II (50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4), 5,6,7,8 fraction → 30 uL loading
- 6 : Wash III (50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4), 65 mL → 30 uL loading
- 7 : Elute, fraction 10, 3 mL → 30 uL loading
- 8 : Elute, fraction 11, 3 mL → 30 uL loading
- 9 : Elute, fraction 12, 3 mL → 30 uL loading

그림 53. Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 AKTA prime FPLC를 이용한 His-tag 정제수행 후 SDS-PAGE와 western blot

(3) 95%이상 고순도의 Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 분리정제 기술 확립

고순도로 분리정제할 시료는 30kDa cut-off 한 후 농축 된 약 70 mL에 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.74 mL과 0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.26 mL을 넣고 NaCl, 2.92g을 넣어 0.5M이 되게 한 후 imidazole 농도가 final 10 mM이 되게 0.068g을 첨가한 후 혼합하였다. 이후 pH 7.4로 맞추고 total volume 을 약 100 mL로 만들고 4°C에서 2h 동안 stir 하였다. 시료의 필터 후 상층액 약 70 mL을 HisTrap FF, 5 mL column에 loading 한 후 wash buffer I (50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4)로 30 mL 세척하고, wash buffer II (50 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4)로 85 mL 세척 한 후 imidazole의 gradient로 elution 하였다. 각각의 fraction을 SDS-PAGE와 western blot을 수행하여 enterokinase의 band를 확인하고 purity 확인 하였다 (그림 54, 55, 56). Recombinant human enterokinase, light chain은 elute fraction 8-11에서 band를 확인 하였고 SDS-PAGE 상에서 95% 이상의 purity를 확인하였다.

Column : Ni-sepharose column  
 Flow rate : 1 mL/min  
 Buffer->  
 Equilibration buffer : 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)  
                           0.5 M NaCl  
                           20 mM imidazole  
 Wash buffer II : 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)  
                           0.5 M NaCl  
                           30 mM imidazole  
 Wash buffer III : 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)  
                           0.5 M NaCl  
                           40 mM imidazole  
 Wash buffer IV : 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)  
                           0.5 M NaCl  
                           50 mM imidazole  
 Elution buffer : 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)  
                           0.5 M NaCl  
                           500 mM imidazole

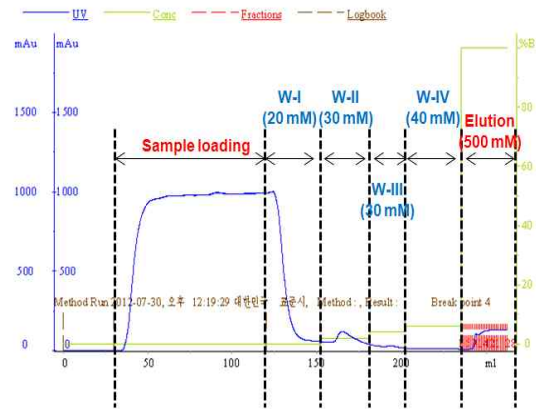


그림 54. 95%이상 고순도의 Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 분리 정제하기 위한 모식도 및 사용된 buffer

**Purification of rEK by Histrap FF (5mL)**

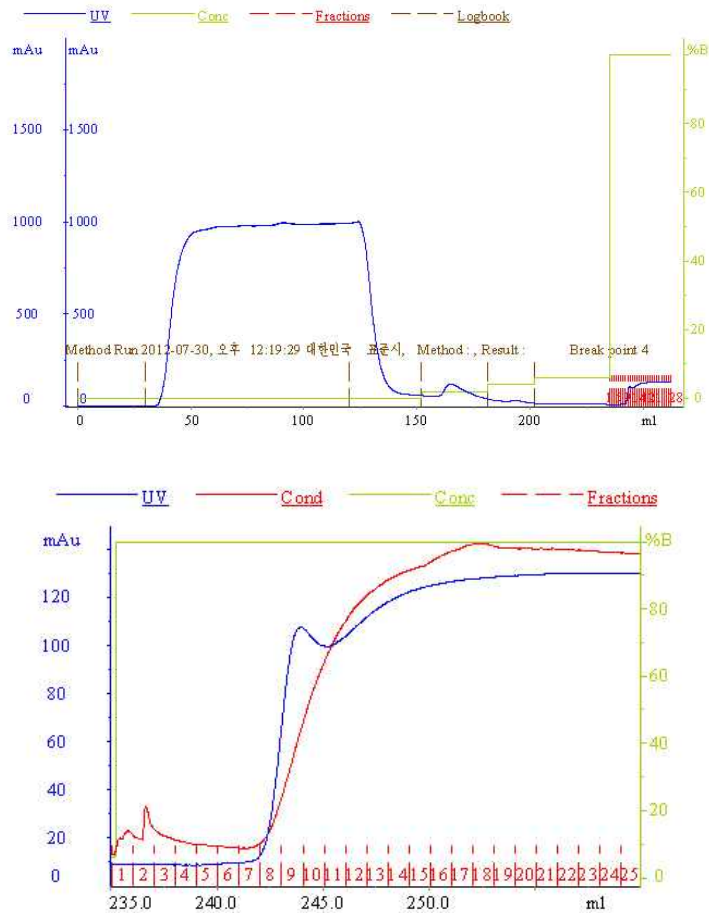


그림 55. 95%이상 고순도의 Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 분리 정제



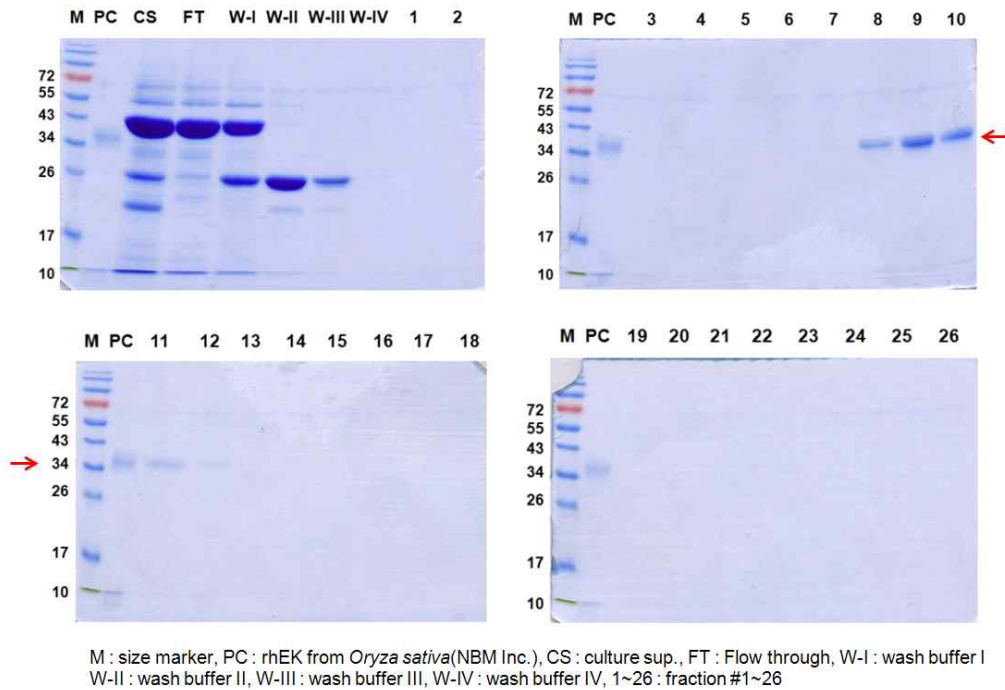


그림 56. 95%이상 고순도의 Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 분리 정제 후 SDS-PAGE

### (3) 분리정제한 Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 순도 확인

각각의 정제방법으로 분리정제한 recombinant human enterokinase의 purity를 조사하기 위해 SDS-PAGE 이후 silver staining을 하였다. 정제방법으로는 크게 4가지로 wash step에서 10 mM imidazole로 wash 한 후 500 mM imidazole로 elution 한 method 1과 50 mM imidazole로 wash 한 후 100 mM imidazole로 elution한 method 2, 20 mM imidazole로 wash 한 후 20-500 mM imidazole의 gradient로 elution한 method 3, 50 mM imidazole로 wash 한 후 500 mM imidazole로 elution한 method 4 이다. 각각의 elute fraction을 dialysis 하고 각각 10 ug씩 loading 하여 SDS-PAGE와 silver staining을 하였다. silver staining 결과를 image J program을 사용해 band의 density를 이용해 purity를 계산 하였다. 그결과 20 mM imidazole로 wash 후 20-500 mM imidazole의 gradient로 elution한 method 3과 50 mM imidazole로 wash 후 500 mM imidazole로 elution한 method 4 방법에서 97%의 이상의 purity를 확인 하였다 (그림 57, 58).

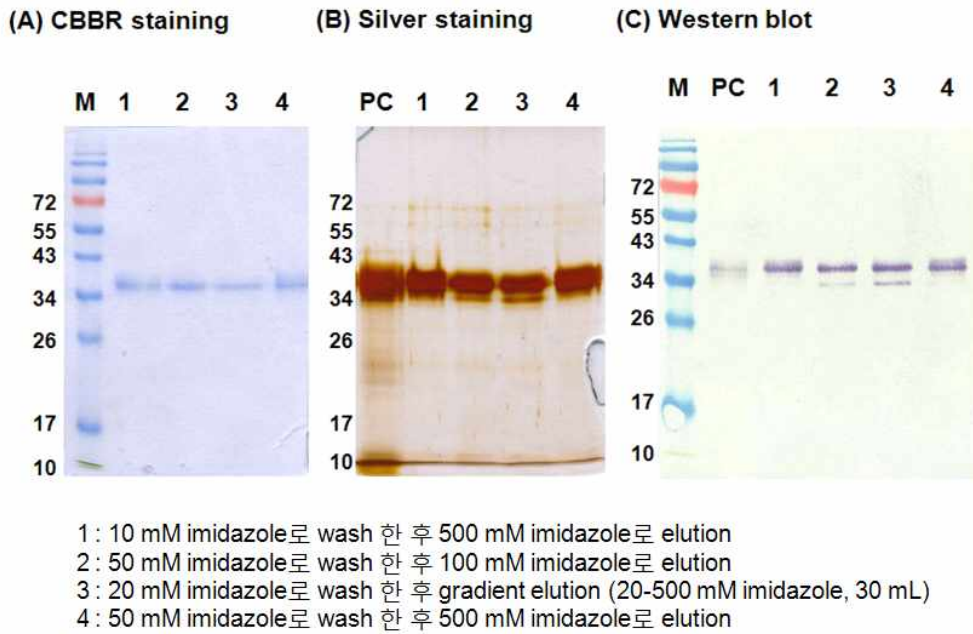


그림 57. Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 분리 정제 후 purity 조사 (A: SDS-PAGE, B: silver staining, C: western blot)

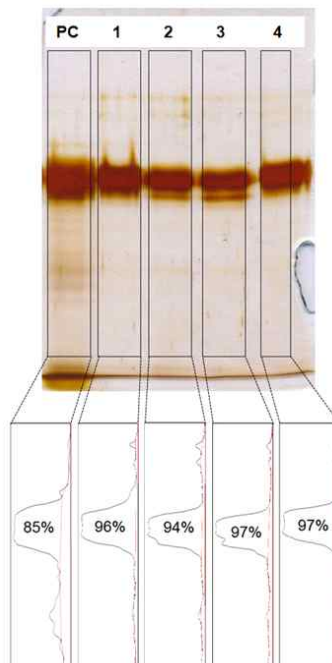


그림 58. Recombinant human enterokinase (pJKF40/b4)의 분리 정제 후 Image J program을 사용한 purity 조사

(5) 정제방법에 대한 recombinant human enterokinase의 purification yield

각각의 정제방법으로 분리 정제한 recombinant human enterokinase의 yield를 r계산하기 위해 단백질농도 정량을 실시하였다. BCA 단백질 정량법을 사용하여 각각의 정제 단계에서 단백질 농도를 정량하였다. 그 결과 50 mM imidazole로 wash 후 500 mM imidazole로 elution한 method 4 방법에서 yield가 125%로 가장 높고 이때의 purity 또한 97%로 최적의 정제 방법으로 확립하였다.

표 8. 정제 방법에 따른 recombinant human enterokinase의 purification yield

Purification step	Method1	Method 2	Method 3	Method 4
rhEK in culture sup. (mg/L)	0.5 mg/L	2.5 mg/L	3.6 mg/L	0.6 mg/L
Fraction vol. (mL) before dialysis	5 mL	15 mL	8 mL	4 mL
Total vol. (mL) after 1 <sup>st</sup> dialysis	5.8 mL	18.5 mL	10.5 mL	5 mL
<b>Lyophilization</b>				
Total vol. (mL) after 2 <sup>nd</sup> dialysis	0.79 mL	0.89 mL	0.84 mL	0.82 mL
Total vol. (mL) after formulation	1.5 mL	1.7 mL	1.6 mL	1.6 mL
rhEK (mg/mL)	0.33 mg/mL	0.8 mg/mL	1.63 mg/mL	0.47 mg/mL
rhEK (mg/total vol. (mL))	0.5 mg	1.36 mg	2.6 mg	0.75 mg
Purity (%)	96%	94%	97%	97%
Yield (%)	100%	54%	72%	125%

다. 분리 정제한 고순도 recombinant human enterokinase의 lunit 결정

(1) 효소활성 결정

(가) 기질

Human enterokinase, light chain의 효소활성을 분광학적인 방법으로 조사하기 위해 GD4K 2-naphthylamine과 새롭게 합성한 GD4K-7-amino-4-methylcoumarin을 사용하였다.

GD4K-2-naphthylamine: Sigma-aldrich, G5261 Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-β-naphthylamide (≥95%, HPLC), 10 mg을 구입하여 기질로 사용하였다.

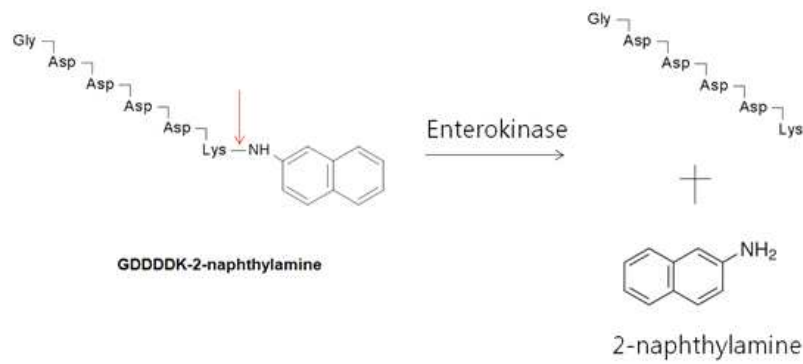


그림 59. Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-β-naphthylamide의 구조 및 반응 모식도

GD4K-7-amino-4-methylcoumarin: 본 연구를 위하여 펩트론(주)에 의뢰하여 30 mg을 주문 합성하였음. 분자량은 820.41g 이고 10 mg/mL 까지 물에 녹였다.

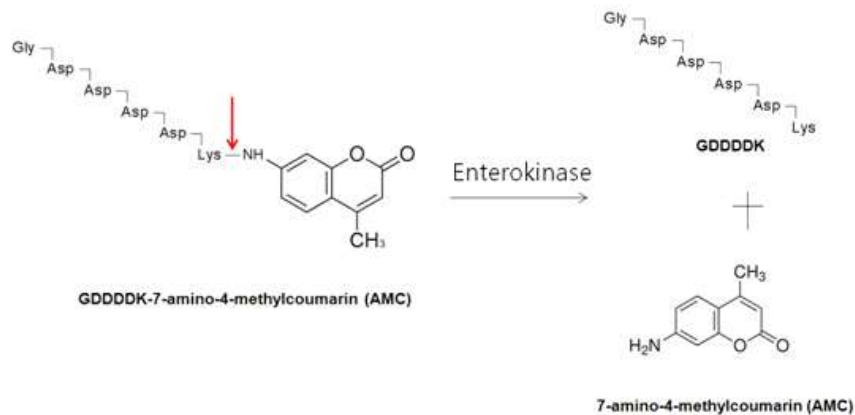


그림 60. GD4K-7-amino-4-methylcoumarin의 구조 및 반응 모식도

(나) GD4K-2-naphthylamine에 대한 recombinant human enterokinase의 kinetic parameter 및 1 unit 결정

100 mM GD4K-2-naphthylamine stock: GD4K-β-NA(Sigma, G5261, Mw=788.76g)의 100 mM stock을 만들기 위해 약 7.89g을 칭량하여 0.1 mL의 20 mM Tris-HCl, pH 7.5로 녹였다.

Reaction buffer: Enterokinase의 protease 활성을 조사하기 위한 reaction buffer로 20 mM Tris-HCl, pH 7.5와 2 mM CaCl<sub>2</sub>를 사용하였다.

Enzyme: Rice 유래 recombinant enterokinase, light chain은 1.7 mg/mL stock을 10배 dilution 하여 사용하였으며, positive control로 Novagen EK(69066-3)을 사용하였다.

2-naphthylamine의 ε 값 결정: 2-naphthylamine은 흡광도 340nm에서 최대 흡광을 나타냈다 (그림 61). 2-naphthylamine의 ε 값을 결정하기 위해 300nm에서 600nm까지 흡광도를 측정 한 후 최대 파장에서 A=εcl에 의해 ε<sub>340</sub>값을 결정하였음. 2-naphthylamine의 ε<sub>340</sub>은 1640 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (ref. Bachem). GD4K-2-naphthylamine의 UV-spectrum은 300nm 근처에서 나타나지만

enterokinase에 의해 2-naphthylamine이 생성되면 340nm에서 최대 파장을 나타냈다 (그림 61)

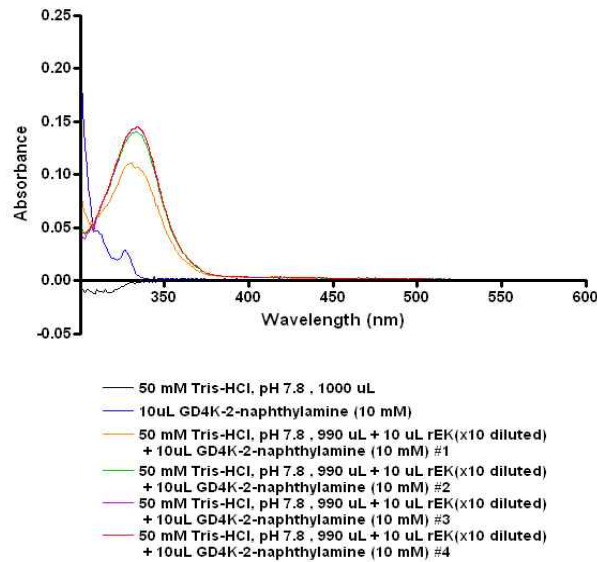


그림 61. GD4K-2-naphthylamine과 2-naphthylamine의 UV-spectrum

Recombinant human enterokinase, light chain의 kinetic parameter( $K_m$ 값과  $k_{cat}$  값) 결정: Enterokinase의 반응이 빨리 일어나기 때문에 time course로 enterokinase의 활성을 측정하였다.

모든 실험은 2번 반복하였으며, 상온에서 실시함. enterokinase의 kinetic parameter를 결정하기 위해 기질은 200  $\mu$ M에서 2  $\mu$ M까지 사용하였으며, recombinant human enterokinase는 0.17 mg/mL을 2  $\mu$ L (340 ng)을 사용 하였다. 반응은 1 mL 큐벳에 buffer를 넣고 기질을 넣은 다음 mix 한 후 blank를 누르고 enzyme 340 ng을 넣고 mix 한 후 흡광도 340nm에서 1초 간격으로 흡광을 측정하였다. 각각의 흡광 값을 엑셀파일로 작업하여 1차함수의 직선 그래프를 그린 후 기울기 값을 결정하고  $\mu$ mol  $\beta$ -NA production/min/mL =  $(\Delta A_{340nm}/\text{min}/\text{mL})/1.64$ 에 따라  $\beta$ -naphthylamine의 생산량( $\mu$ mol)을 계산 하였고, 이 값을 이용해 hyperbolic graph를 그린 후  $K_m$ 값과  $k_{cat}$  값을 결정하였다.

그 결과 recombinant human enterokinase (from *Oryza sativa*)의  $K_m$ 값은 64.01  $\mu$ M 이며,  $k_{cat}$  값은 17.8  $\mu$ mol/min/mL을 얻었다 (그림 62).

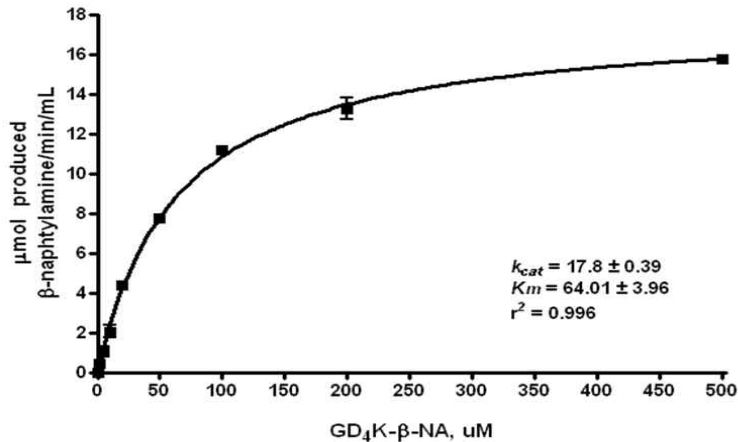


그림 62. GD4K-2-naphthylamine에 대한 recombinant human enterokinase의 kinetic parameter 결정 ( $K_m$ 값과  $k_{cat}$ )

Recombinant human enterokinase, light chain의 1 unit 결정: Enterokinase의 1 unit을 결정하기 위해 GD4K-2-naphthylamine을 기질로 사용하여 시판되고 있는 novozyme의 enterokinase와 비교하였다.

모든 실험은 2번 반복하였으며, 상온에서 실시하였다. recombinant human enterokinase의 1 unit을 결정하기 위해 기질은 200 uM을 사용하였고 recombinant human enterokinase는 0.17 mg/mL을 2 uL (340 ng)을 사용 하였으며, positive control은 1 unit과 2 unit을 각각 사용하여 측정 하였다. 반응은 1 mL 큐벳에 buffer를 넣고 기질을 넣은 다음 mix 한 후 blank를 누르고 enzyme 340 ng을 넣고 mix 한 후 흡광도 340nm에서 1초 간격으로 흡광을 측정하였다. 각각의 흡광 값을 엑셀파일로 작업하여 1차함수의 직선 그래프를 그린 후 기울기 값을 결정하고  $\mu\text{mol } \beta\text{-NA production/min/mL} = (\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min/mL})/1.64$ 에 따라  $\beta\text{-naphthylamin}$ 의 생산량 ( $\mu\text{mol}$ )을 계산 하였다.

그 결과 rice 유래 recombinant human enterokinase는 340 ng의 enzyme으로 12.8  $\mu\text{mol/min/mL}$ , positive control의 2 unit을 사용했을 경우 1.85  $\mu\text{mol/min/mL}$ 의 값을 각각 얻었다 (그림 63). 따라서 rice 유래 recombinant human enterokinase, light chain의 1 unit은 reaction volume 1 mL에서 GD4K-2-naphthylamine으로부터 1분에 1  $\mu\text{mol}$ 의 2-naphthylamine을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의 함. 이때의 rice 유래 recombinant human enterokinase의 양은 약 37.6 pg 이다.

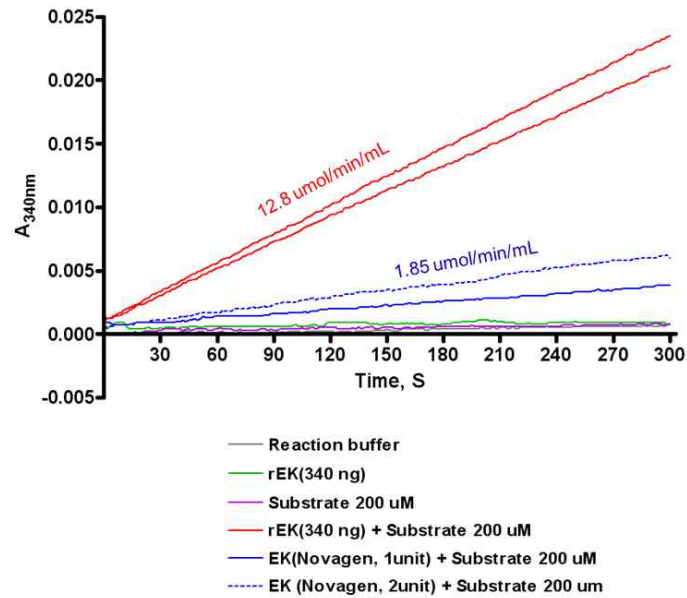


그림 63. Rice 유래 recombinant human enterokinase의 GD4K-2-naphthylamine에 대한 1 unit 결정

(다) GD4K-7-amino-4-methylcoumarin에 대한 recombinant human enterokinase의 kinetic parameter 및 1 unit 결정

10 mM GD4K-7-amino-4-methylcoumarin과 standard stock solution: GD4K-7-amino-4-methylcoumarin (펩트론 합성, Mw=820.41g)의 10 mM stock을 만들기 위해 약 0.0029g을 칭량하여 353.5 uL의 1x EK reaction buffer를 넣고 녹임. standard stock solution은 7-amino-4-methylcoumarin (Sigma, A9891-250 mg, Mw 175.18g)을 사용하였음. 물에 녹지 않기 때문에 12 mg을 칭량하여 40% 에탄올 45 mL을 넣어 1.52 mM stock solution 만들었다.

Reaction buffer(1X EK reaction buffer): Enterokinase의 protease 활성을 조사하기 위한 reaction buffer로 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl과 2 mM CaCl<sub>2</sub>를 사용하였다.

Enzyme: Rice 유래 recombinant enterokinase, light chain은 1.7 mg/mL stock을 10배 dilution 하여 사용하였으며, positive control로 Novagen EK(69066-3)을 사용하였다.

7-amino-4-methylcoumarin의 ε 값 결정: 7-amino-4-methylcoumarin은 흡광도 340nm에서 최대 흡광을 나타내었다 (그림 64). 7-amino-4-methylcoumarin의 ε 값을 결정하기 위해 300nm에서 700nm까지 흡광도를 측정 한 후 최대 파장에서  $A = \epsilon cl$ 에 의해  $\epsilon_{340}$  값을 결정하였다. 7-amino-4-methylcoumarin의  $\epsilon_{340}$ 은  $14970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  로 계산 산출됨 (그림 64). GD4K-7-amino-4-methylcoumarin의 UV-spectrum은 325nm 근처에서 나타나지만 enterokinase에 의해 7-amino-4-methylcoumarin이 생성되면 340nm에서 최대 파장을 나타내었다 (그림 65, 66).



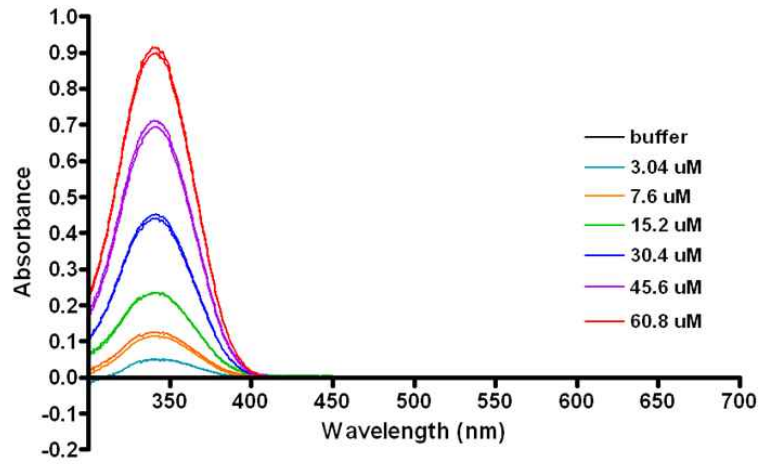


그림 64. 7-amino-4-methylcoumarin의 UV-spectrum

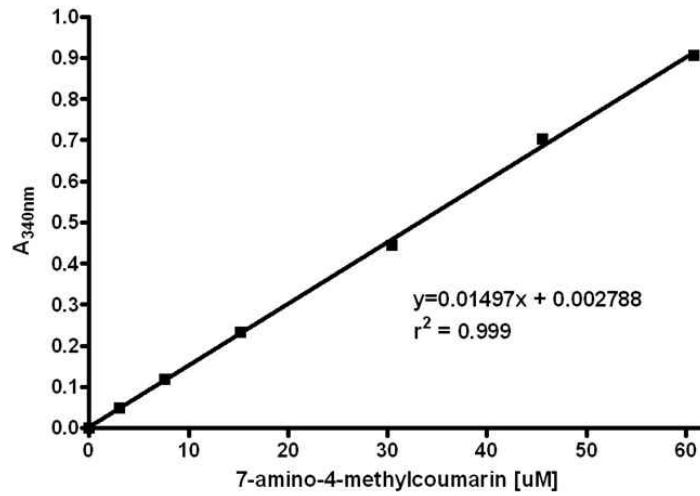


그림 65. 7-amino-4-methylcoumarin의 Extinction coefficient

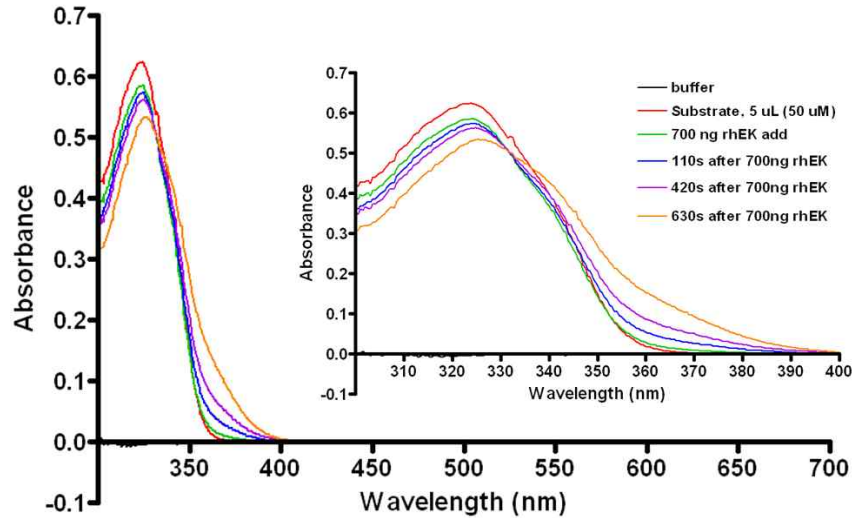


그림 66. GD4K-7-amino-4-methylcoumarin의 UV-spectrum

GD4K-7-amino-4-methylcoumarin에 대한 Recombinant human enterokinase, light chain의 kinetic parameter( $K_m$ 값과  $k_{cat}$  값) 결정: Enterokinase의 반응이 빨리 일어나기 때문에 time course로 enterokinase의 활성을 측정하였다.

모든 실험은 2번 반복하였으며, 상온에서 실시함. enterokinase의 kinetic parameter를 결정하기 위해 기질은 50  $\mu\text{M}$ 에서 2  $\mu\text{M}$ 까지 사용하였으며, recombinant human enterokinase는 350 ng을 사용 하였다. 반응은 1 mL 큐벳에 buffer를 넣고 기질을 넣은 다음 mix 한 후 blank를 누르고 enzyme 350 ng을 넣고 mix 한 후 흡광도 340nm에서 1초 간격으로 흡광을 측정하였다. 각각의 흡광 값을 엑셀파일로 작업하여 1차함수의 직선 그래프를 그린 후 기울기 값을 결정하고  $\text{umol 7-amino-4-methylcoumarin(7AMC) production/min/mL} = (\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min/mL})/14.97$ 에 따라 7AMC의 생산량(umol)을 계산 하였고, 이 값을 이용해 hyperbolic graph를 그린 후  $K_m$  값과  $k_{cat}$  값을 결정하였다.

그 결과 recombinant human enterokinase (from *Oryza sativa*)의 GD4K-7-amino-4-methylcoumarin에 대한  $K_m$ 값은 192.8  $\mu\text{M}$  이며,  $k_{cat}$  값은 3.34  $\text{umol/min/mL}$ 을 얻었다 (그림 67, 68).

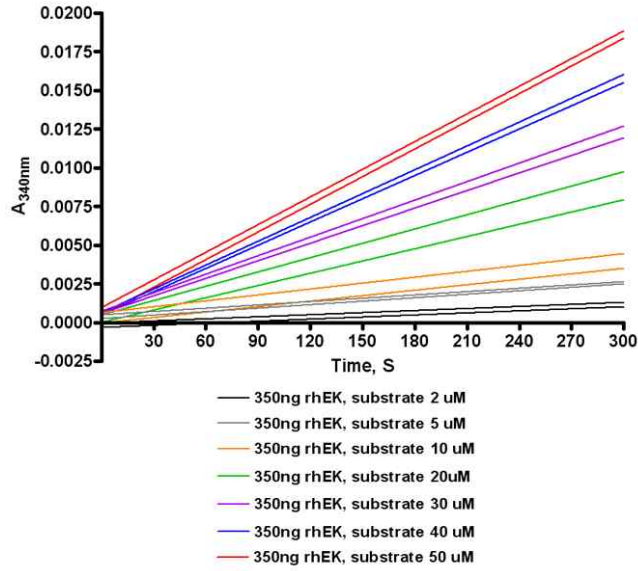


그림 67. Time course에 의한 GD4K-7-amino-4-methylcoumarin에 대한 enterokinase의 활성 측정

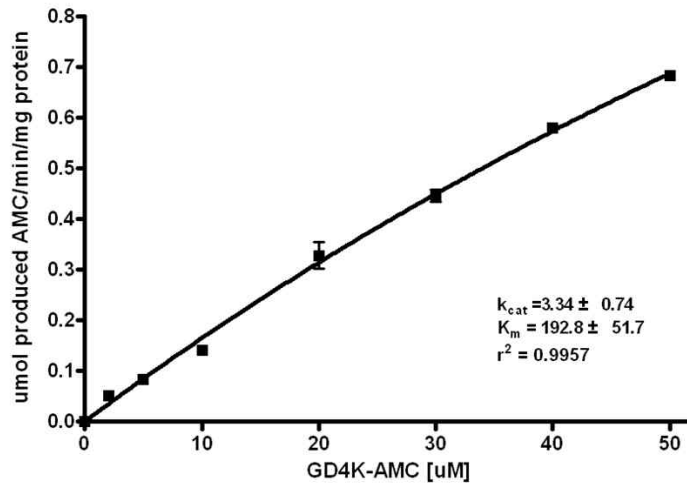


그림 68. GD4K-7-amino-4-methylcoumarin에 대한 recombinant human enterokinase의 kinetic parameter 결정 ( $K_m$ 값과  $k_{cat}$ )

GD4K-7-amino-4-methylcoumarin에 대한 recombinant human enterokinase, light chain의 1 unit 결정: Enterokinase의 1 unit을 결정하기 위해 GD4K-7-amino-4-methylcoumarin을 기질로 사용하여 시판되고 있는 novozyme의 enterokinase와 비교하였다.

모든 실험은 2번 반복하였으며, 상온에서 실시함. recombinant human enterokinase의 1 unit을 결정하기 위해 기질은 50 uM을 사용하였고 recombinant human enterokinase는 70ng과 350 ng을 각각 사용 하였으며, positive control은 1 unit을 각각 사용 하여 측정 하였다. 반응은 1 mL 큐벳에 buffer를 넣고 기질을 넣은 다음 mix 한 후 blank를 누르고 enzyme 70ng 과 350

ng을 각각 넣고 mix 한 후 흡광도 340nm에서 1초 간격으로 흡광을 측정하였다. 각각의 흡광 값을 엑셀파일로 작업하여 1차함수의 직선 그래프를 그린 후 기울기 값을 결정하고  $\text{umol 7AMC production/min/mL} = (\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min/mL})/14.97$ 에 따라 7AMC의 생산량(umol)을 계산 하였다.

그 결과 rice 유래 recombinant human enterokinase는 70 ng의 enzyme으로 0.06 umol/min/mL, positive control의 1 unit을 사용했을 경우 0.04 umol/min/mL의 값을 각각 얻었다 (그림 69).

따라서 rice 유래 recombinant human enterokinase, light chain의 1 unit은 reaction volume 1 mL에서 GD4K-7-amino-4-methylcoumarin으로부터 1분에 50 nmol의 7-amino-4-methylcoumarin을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의 함. 이때의 rice 유래 recombinant human enterokinase의 양은 약 70 ng 이다.

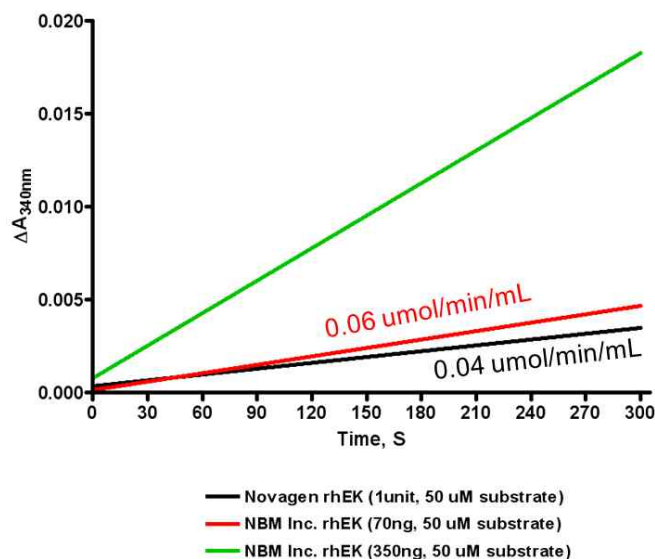


그림 69. Rice 유래 recombinant human enterokinase의 GD4K-7-amino-4-methylcoumarin에 대한 1 unit 결정

라. 분리 정제한 고순도( $\geq 95\%$ )의 rice 유래 recombinant human enterokinase의 저장 및 포장 기술 확립

(1). 분리 정제한 고순도( $\geq 95\%$ )의 rice 유래 recombinant human enterokinase의 최적 제형 및 효소 활성을 통한 최적 저장 조건 확립(저장온도, 저장기간 등)

현재 판매되고 있는 enterokinase(Novagen사)의 제형은 액상형태로 판매됨. enterokinase의 최적 활성을 나타내는 buffer 조성에 glycerol을 첨가하여 액상 형태의 제형을 만들어 저장온도 (4°C, -20°C, -70°C)와 보관 기간에 따라 enterokinase의 활성을 조사하였다.

Rice 유래 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ )의 분주 및 보관: His-tag 정제한 rice 유래 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ )를 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4로 dialysis 한 시료에 glycerol을 50%가 되게 첨가한 후 mix 해서 100 ng이 되게 분주해서 각각 15개씩 4°C, -20°C, -70°C에 보관하고, freeze-thaw recycle의 활성을 조사하기 위해 각각의 온도별로 약 240 ug 씩 보관해서, 0일, 1일, 1개월부터 12개월이 각각 되었을 때 시료를 꺼내어 enterokinase의 활성을 측정 하였다.

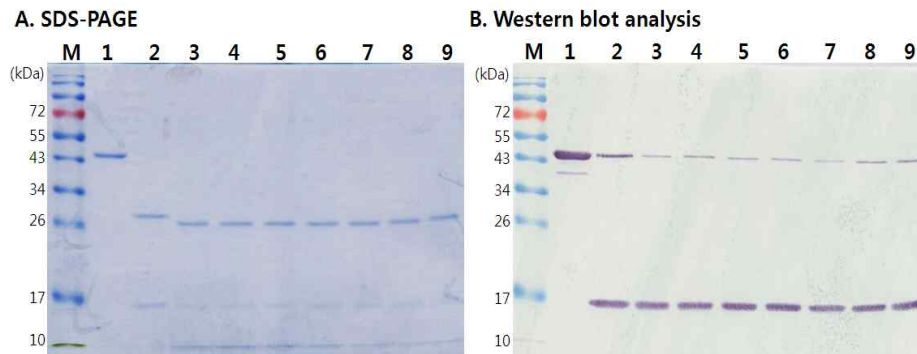
Enzyme reaction mixture: rice 유래 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ )의 활성을 조사하기 위해 EGFP-ENCS-TNF $\alpha$  substrate protein을 이용함. 아래 표와 같이 enzyme reaction mixture를 만든 후 23°C, 3h 동안 반응시킴. enterokinase는 각각 4°C, -20°C, -70°C에서 1일, 1개월에서부터 5개월까지 보관한 sample들로서 매달 정해진 시간이 되었을 때에 반응시켜 활성을 측정하였다.

표 10. EK 효소활성 분석을 위한 반응 조건

	stock 농도	사용농도	NC	PC	보관온도별			Freeze-thaw recycle			단위	
			기질	Novagen	RT	4°C	-20°C	-70°C	RT	4°C		-20°C
기질	1.28 ug/ul	2 ug	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	ul
10X buffer			3	3	3	3	3	3	3	3	3	ul
PC	0.1 unit/ul	1 unit	-	10	-	-	-	-	-	-	-	ul
rhEK	80 ng/ul	100 ng	-	-	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	ul
DW	-	-	25.4	15.4	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	ul
Final volume			30	30	30	30	30	30	30	30	30	ul
<ul style="list-style-type: none"> <li>· 10X reaction buffer : 200mM Tris-HCl(pH7.5), 500mM NaCl, 20mM CaCl<sub>2</sub></li> <li>· Dilution buffer : 20mM Tris-HCl(pH7.5), 50mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 50%(v/v) glycerol</li> <li>· Positive control : recombinant human Enterokinase (Novagen / Cat. 69066-3)</li> </ul>												

Enterokinase 활성 분석: SDS-PAGE 와 western blot으로 분석함. SDS-PAGE(12%), western blot analysis은 reaction sample 30ul 과 5X reduce sample buffer 6ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 36ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, western blot을 통해 잘린 band를 확인하였다.

Enterokinase의 저장온도와 보관기간에 따른 활성을 조사한 결과 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, pH 7.4에 50% glycerol을 첨가하여 액상 제형으로 만들어 상온에 보관했을 경우 보관기간 1개월 이후부터는 효소 활성이 감소하기 시작하였다 (그림 70-75). 4°C에 보관하면서 freeze-thaw recycle을 반복했을 때 2개월 이후부터 enterokinase의 활성이 감소한 반면 -20°C와 -70°C에 보관했을 경우 5개월이 지나도 효소 활성에 차이가 없는 것으로 확인됨. 따라서 enterokinase의 최적 액상 제형은 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, pH 7.4에 50% glycerol로 하고 보관은 -70°C에서 보관하는 것이 최적 조건임을 확인 하였다.



- Lane 1: substrate 2ug
- Lane 2: PC(Novagen) 1unit + substrate 2ug
- Lane 3: RT(23°C) 보관 pJKF40/b4 EK 100ng + substrate 2ug
- Lane 4: 4°C 보관 pJKF40/b4 EK 100ng + substrate 2ug
- Lane 5: -20°C 보관 pJKF40/b4 EK 100ng + substrate 2ug
- Lane 6: -70°C 보관 pJKF40/b4 EK 100ng + substrate 2ug
- Lane 7: 4°C 보관(freeze-thaw cycle) pJKF40/b4 EK 100ng + substrate 2ug
- Lane 8: -20°C 보관(freeze-thaw cycle) pJKF40/b4 EK 100ng + substrate 2ug
- Lane 9: -70°C 보관(freeze-thaw cycle) pJKF40/b4 EK 100ng + substrate 2ug

그림 70. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ )의 저장온도 및 보관기간에 따른 활성 조사(1일 후)

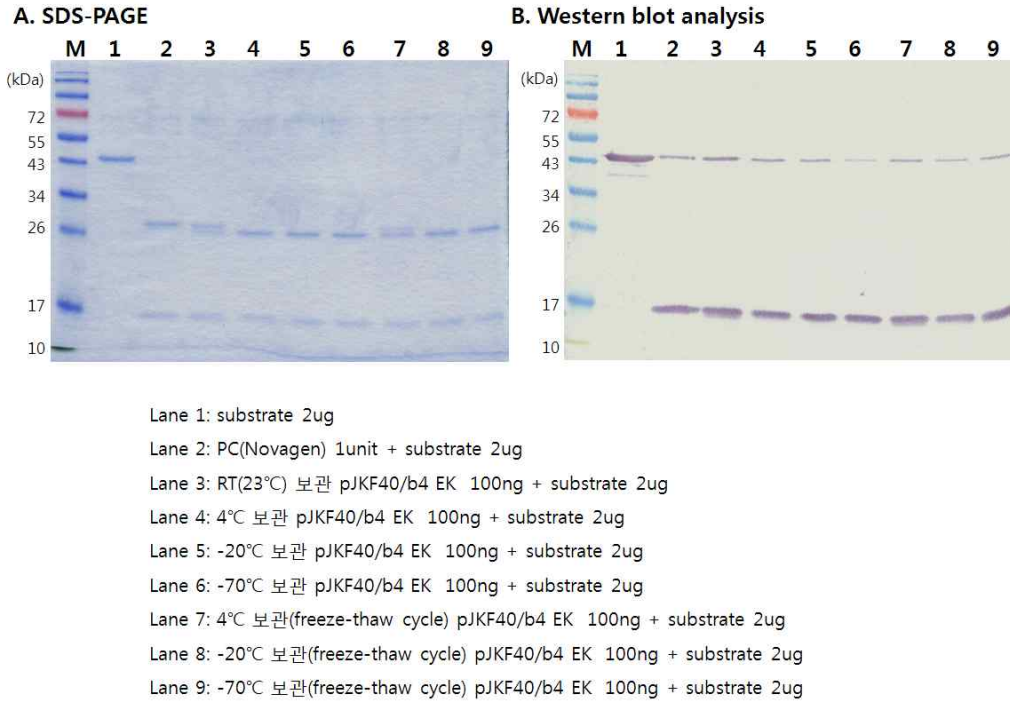


그림 71. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ )의 저장온도 및 보관기간에 따른 활성 조사(1 개월 후)

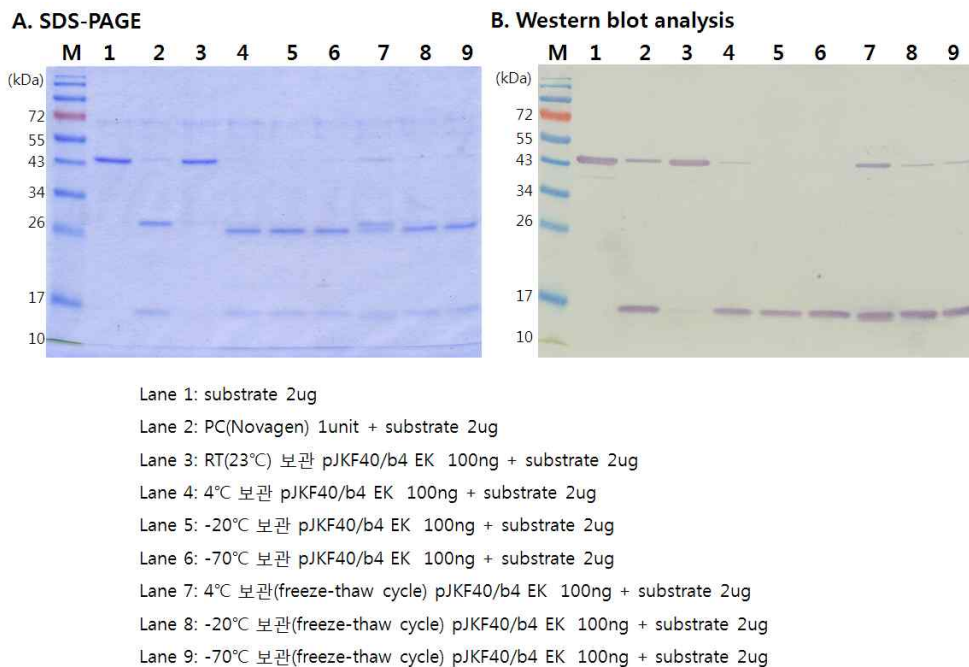


그림 72. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ )의 저장온도 및 보관기간에 따른 활성 조사(2 개월 후)



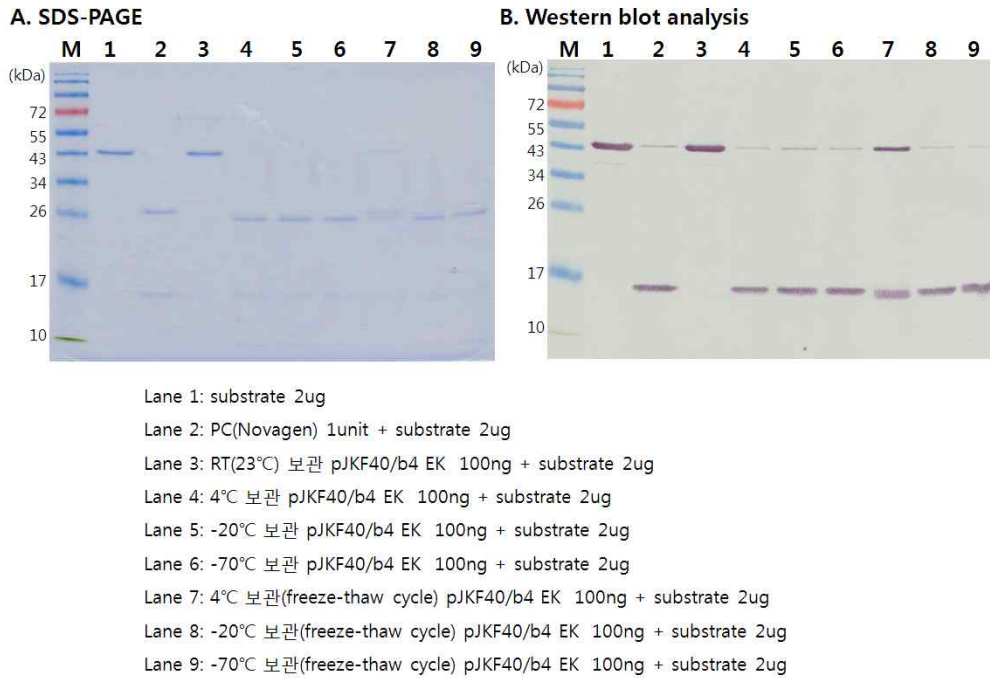


그림 73. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ ) 의 저장온도 및 보관기간에 따른 활성 조사(3 개월 후)

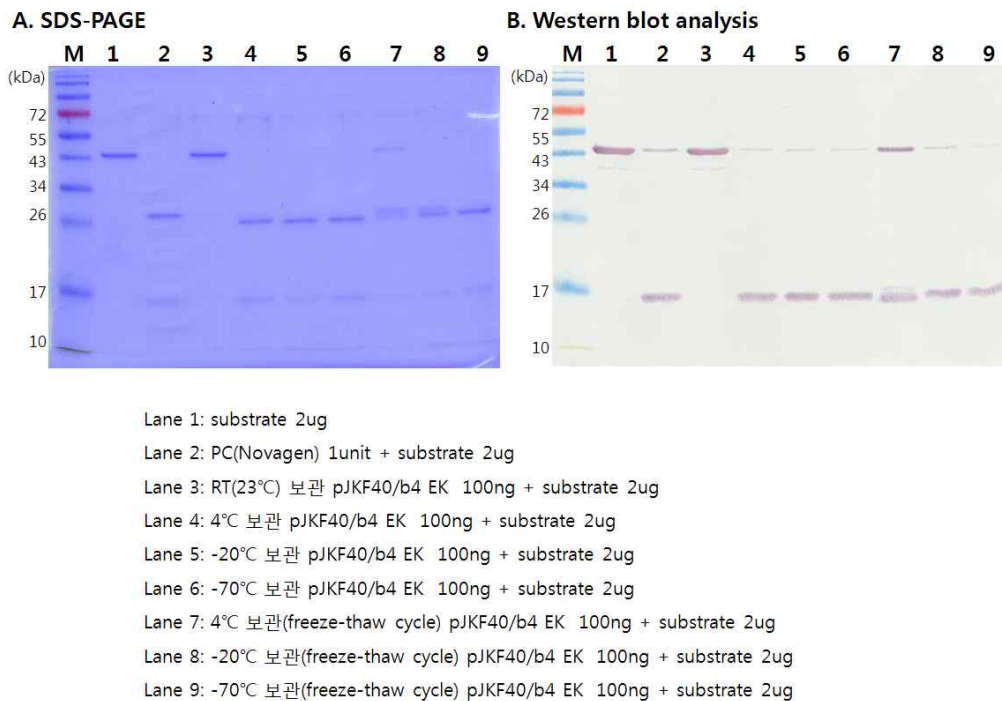


그림 74. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ ) 의 저장온도 및 보관기간에 따른 활성 조사(4 개월 후)

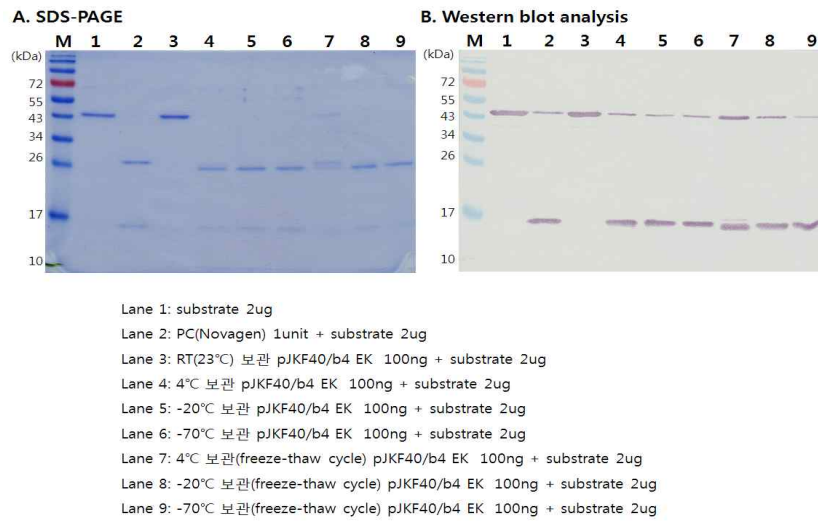


그림 75. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ ) 의 저장온도 및 보관기간에 따른 활성 조사(5 개월 후)

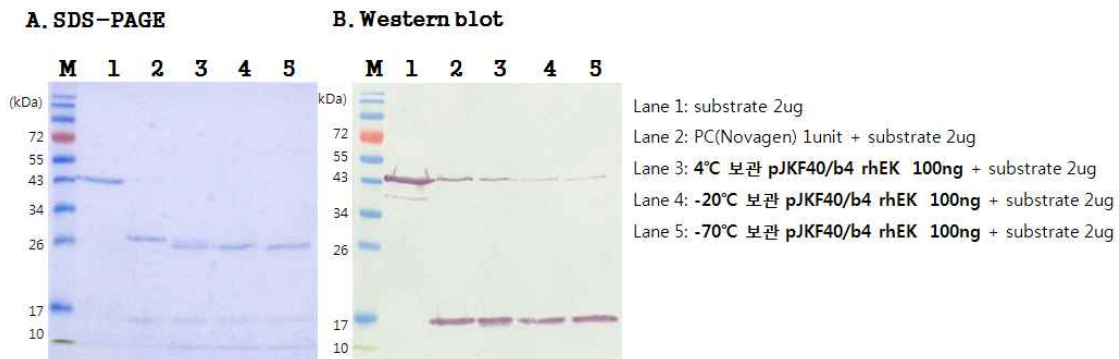


그림 76. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ ) 의 저장온도 및 보관 기간에 따른 활성 조사(12 개월 후)

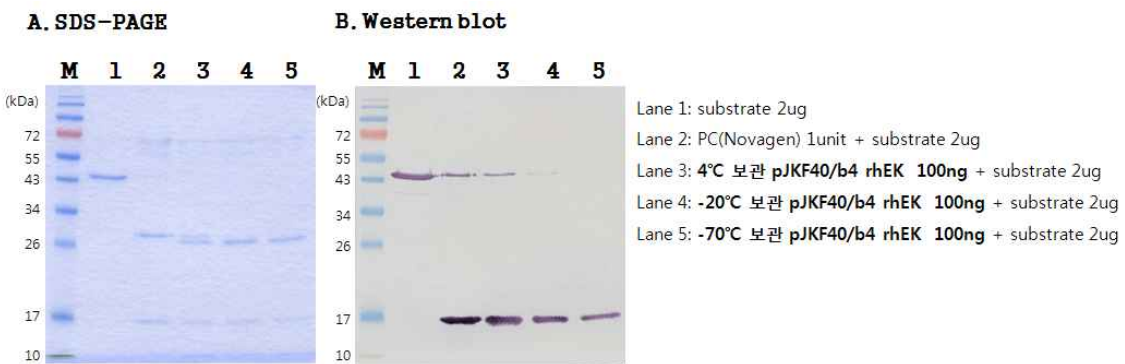


그림 77. Rice 유래 고순도의 recombinant human enterokinase( $\geq 95\%$ ) 의 저장온도 및 보관 기간에 따른 활성 조사(15 개월 후) >

(2) Rice 유래 recombinant human enterokinase(95% 이상)의 생화학적 특성 규명

(가) Rice 유래 recombinant human enterokinase (95% 이상)의 농도에 따른 활성 조사

정제한 rice 유래 recombinant human enterokinase(95%이상)의 농도에 따른 효소 활성을 측정하였다. 정제한 EGFP-ENCS-TNF $\alpha$  substrate protein을 이용하여 EK의 농도에 따라 아래와 같이 enzyme reaction mixture를 만든 후 23°C 에서 1h, 2h, 3h, 4h 동안 반응시켜 SDS-PAGE(12%)와 western blot을 통해 분석 하였다. 그 결과 60 ng 이상에서 3시간 이상 자르면 90% 이상의 기질이 절단되는 것을 확인 하였다 (그림 78).

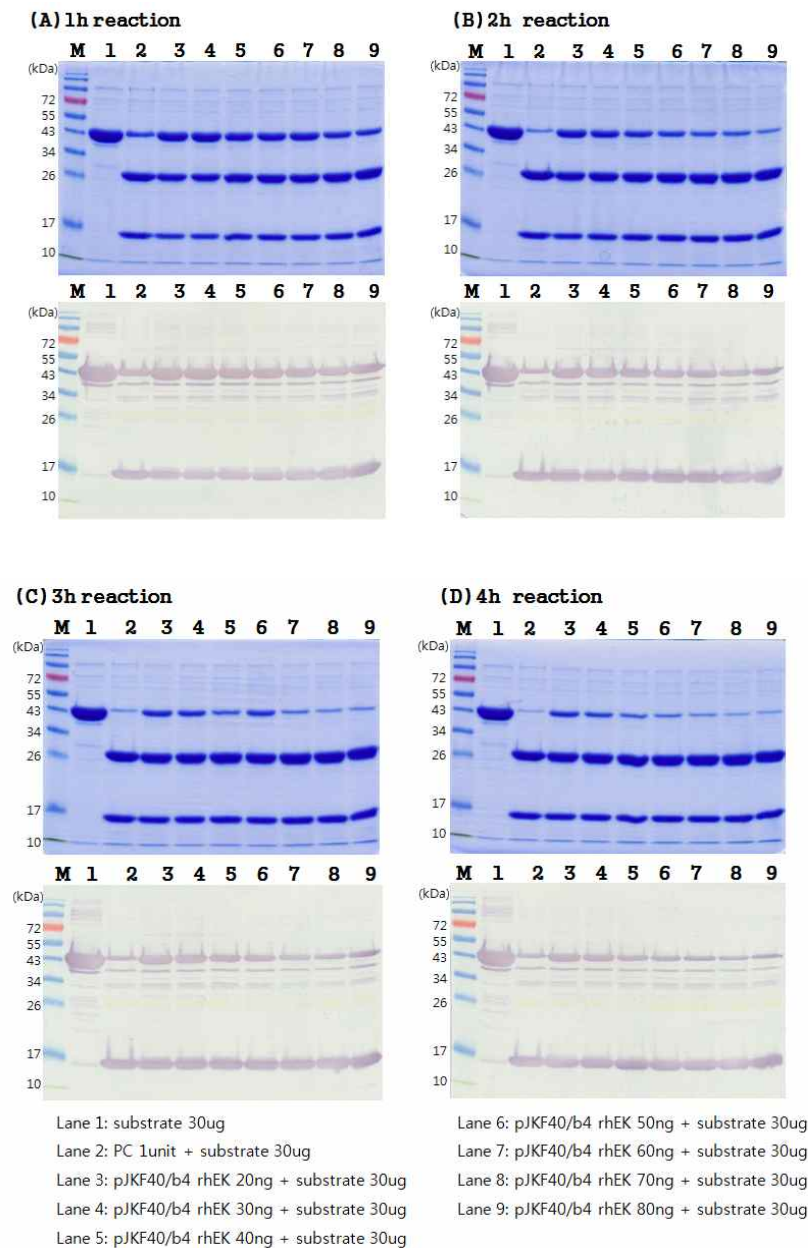


그림 78. Rice 유래 recombinant human enterokinase의 농도와 반응시간에 따른 활성 조사

(나) rice 유래 recombinant human enterokinase (95% 이상)의 반응 온도에 따른 활성 조사

고순도의 recombinant human enterokinase (purity ≥ 95%)의 반응온도에 따른 효소 활성을 조사 하기 위해 10°C, 20°C, 30°C, 40°C 각각에서 아래 reaction mixture를 3h 동안 반응 시킨 후 SDS-PAGE와 western blot을 통해 활성을 분석하였다.

고순도의 recombinant human enterokinase (purity ≥ 95%)의 반응온도에 따른 효소 활성을 조사한 결과 30°C와 40°C에서 최적의 활성을 나타내었으며, 20°C 이하에서는 endopeptidase 활성이 감소하는 하는 것을 확인 하였다 (그림 79).

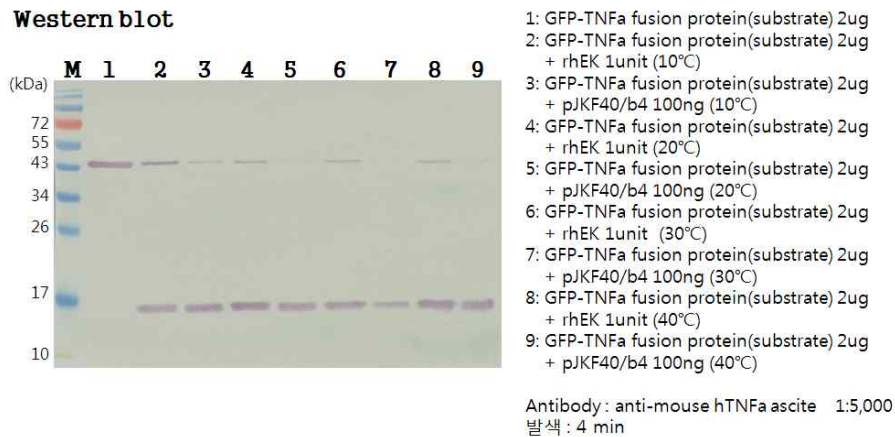


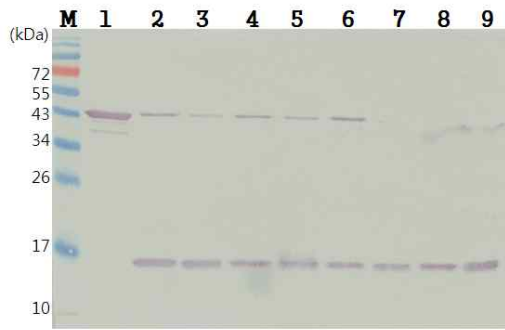
그림 79. Rice 유래 recombinant human enterokinase의 반응온도에 따른 활성

(다) Rice 유래 recombinant human enterokinase (95% 이상)의 pH에 따른 활성 조사

고순도의 recombinant human enterokinase (purity ≥ 95%)의 pH에 따른 효소 활성을 조사 하기 위해 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 buffer 각각에서 각에서 아래 reaction mixture를 만든 후 16h 동안 반응 시킨 뒤 SDS-PAGE(12%)와 western blot을 통해 활성을 분석하였다.

고순도의 recombinant human enterokinase (purity ≥ 95%)의 pH에 따른 효소 활성을 조사 한 결과 pH 8.0, 9.0 buffer에서 endopeptidase의 활성의 높았고 pH 7.0 이하에서는 활성이 감소하였다 (그림 80).

**Western blot**



- 1: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug
- 2: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + rhEK 1unit (pH6.0)
- 3: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + pJKF40/b4 100ng (pH6.0)
- 4: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + rhEK 1unit (pH7.0)
- 5: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + pJKF40/b4 100ng (pH7.0)
- 6: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + rhEK 1unit (pH8.0)
- 7: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + pJKF40/b4 100ng (pH8.0)
- 8: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + rhEK 1unit (pH9.0)
- 9: GFP-TNF $\alpha$  fusion protein(substrate) 2ug + pJKF40/b4 100ng (pH9.0)

Antibody : anti-mouse hTNF $\alpha$  ascite 1:5,000  
 발색 : 4min

그림 80. Rice 유래 recombinant human enterokinase의 pH에 따른 활성

(라) Rice 유래 recombinant human enterokinase (95% 이상)의 N-terminal 아미노산 서열 확인  
 Rice 유래 recombinant human enterokinase (95% 이상)를 100 ng을 12% SDS-PAGE 하여 PVDF membrane으로 transfer 한 후 CBBR staining 하였다. 이후 enterokinase band를 잘라서 에스아이에스에 N-terminal sequencing 의뢰함. N-terminal sequencing 결과 I-V-G-G-S 서열로 판독 되었고 human enterokinase의 light chain의 N-말단에서부터 동일한 sequence 임을 확인 하였다 (그림 81).

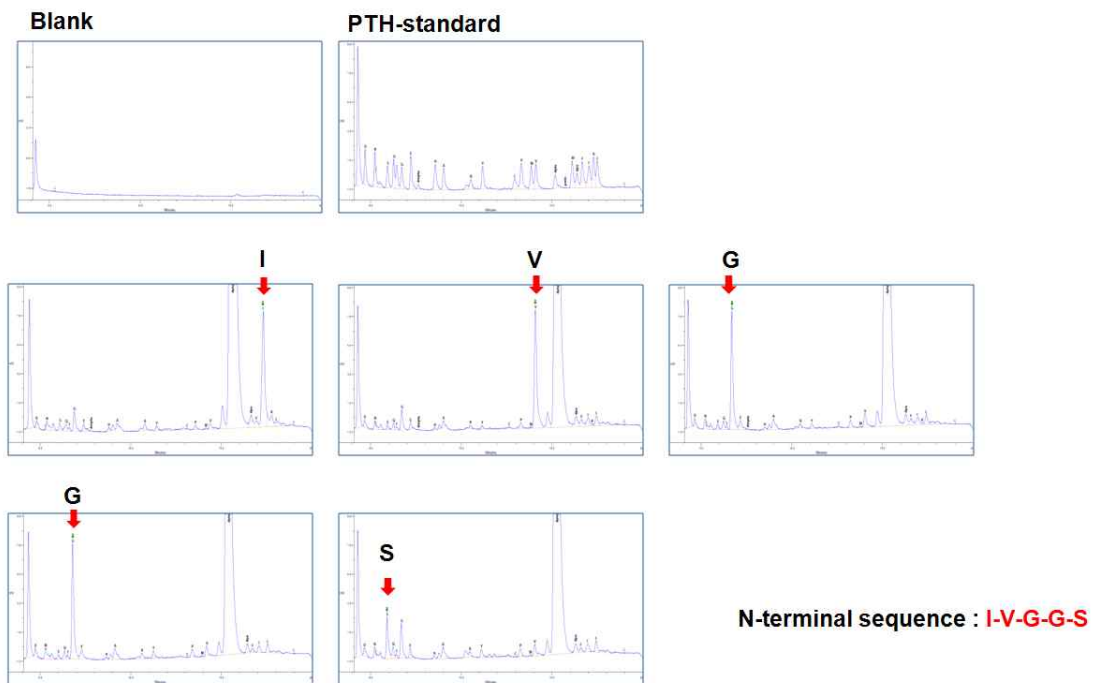


그림 81. Rice 유래 recombinant human enterokinase(purity  $\geq$  95% 이상)의 N-terminal 서열 분석

(라) Rice 유래 recombinant human enterokinase (purity  $\geq 95\%$  이상)에 의해 절단된 기질의 N-terminal 아미노산 서열 확인

Rice 유래 recombinant human enterokinase (purity  $\geq 95\%$  이상)를 100 ng을 사용하여 기질 30 ug과 4시간 반응 시킨 후 12% SDS-PAGE 하여 PVDF membrane으로 transfer 하고 CBBR staining 함. 이후 기질의 N-terminal 절편의 band를 잘라서 에스아이에스에 N-terminal sequencing 의뢰하였다. N-terminal sequencing 결과 V-R-S-S-S 서열로 판독 되었고 이것은 기질의 TNF  $\alpha$  의 N-terminal 서열과 동일함을 확인 하였다 (그림 82).

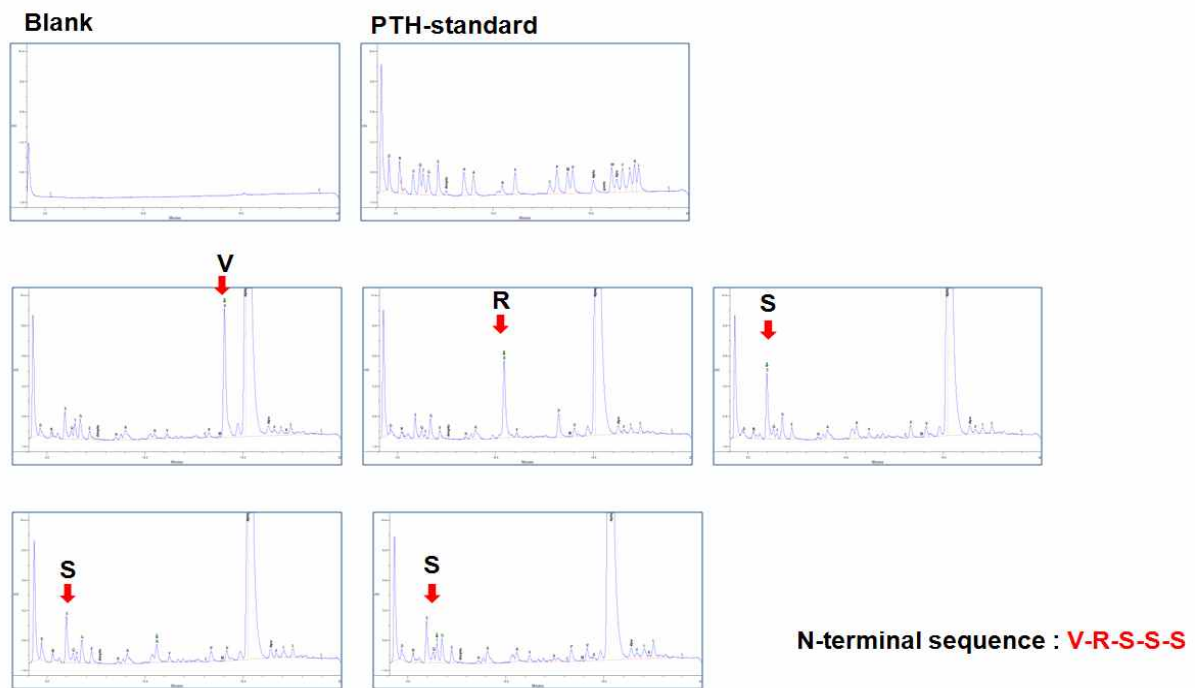


그림 82. Rice 유래 recombinant human enterokinase(purity  $\geq 95\%$  이상)에 의해 잘린 기질의 N-terminal 서열 분석



## 2. 벼 유래 당단백질 패턴 규명 및 인간화 기술개발

### 가. 벼 현탁세포 유래 단백질 당패턴 규명

최근 식물에서 외래 유전자의 도입을 통하여 유용 단백질을 생산하는데 있어, 단백질의 3차 구조 형성, folding 그리고 활성화에 직접적인 영향을 미치는 당질화 패턴의 중요성이 대두되고 있다. 따라서 유용 단백질 생산에 사용되는 host 식물체의 당질화 패턴에 대한 연구가 필수적으로 이루어져야 한다. 본 연구에서 사용되고 있는 벼세포현탁배양을 이용한 발현 시스템의 경우, 배지에 sugar를 제거함으로써 목적단백질의 고발현 뿐만 아니라 고분비를 유도하므로, growth phase인 +sugar 상태와 production phase인 -sugar 상태에서 배지로 분비되는 당단백질의 당질화 패턴을 확인하였다. +sugar 상태의 경우 5일간 배양한 배지를, -sugar 상태의 경우 7일간 배양한 배지를 각각 3L씩 모아서 동결건조를 수행한 후, 당단백질로부터 당쇄 구조만을 분리할 수 있는 효소인 PNGase A를 처리한 후, carbograph SPE column을 이용하여 당쇄만을 순수 분리하였다. 그 후에 2-aminopyridin을 이용하여 당쇄에 형광물질을 부착한 후, NP-HPLC를 이용하여 정제하고, MALDI-TOF mass spectrometry로 당쇄의 분자량을 측정하였다 (그림 83).

MALDI-TOF MS 에 나타는 당쇄의 peak와 그 분자량을 분석한 결과, +sugar 에서는 11개의 당쇄 구조를, -sugar에서는 7개의 당쇄 패턴을 확인하였다. 특히 벼 현탁세포에서 분비되는 당단백질의 경우, paucimannosidic-type인 MMXF<sup>3</sup>를 제외하고, 모든 당쇄가 complex-type으로 나타났으며, 세포내의 당단백질에서 많이 관찰되는 high-mannose-type의 당쇄는 관찰되지 않았다. 또한 두가지 배양 상태에서의 패턴이 크게 다르게 나타났는데, +sugar에서는 GnGnXF<sup>3</sup> 당쇄가 27.1%로 가장 높은 비율을 보였고, 그 뒤로 MMXF<sup>3</sup>, (FA)GnXF<sup>3</sup>, GnMXF<sup>3</sup>의 당쇄가 높은 비율로 나타났다. 반면 -sugar 상태의 경우 GnMXF<sup>3</sup> 당쇄가 약 48.3%로 가장 높았으며 그 뒤로, MMXF<sup>3</sup> 당쇄가 32.3%를 보였고, 나머지 5 종류의 당쇄는 8% 미만의 낮은 비율로 나타났다. 특이할만한 점은 -sugar 상태의 경우, +sugar 상태에서는 보이지 않던 GnGnX가 나타났고, 높은 분자량을 보이는 세 가지의 당쇄인 AAXF<sup>3</sup>, (FA)(FA)X, (FA)(FA)XF<sup>3</sup>가 완벽하게 사라지는 현상을 보였다는 점이다 (표 11).

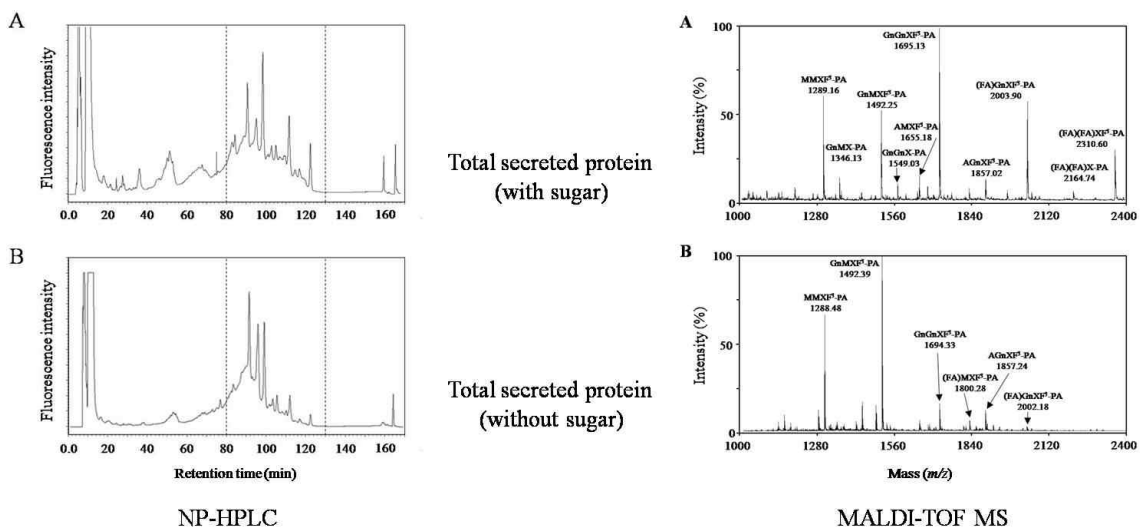


그림 83. 벼 현탁배양세포에서 분비되는 당 단백질의 당쇄에 대한 NP-HPLC와 MALDI-TOF profile



표 11. MALDI-TOF/MS에 의한 +sugar, -S sugar 상태에서의 분비 당단백질의 당 패턴 분석

<i>N</i> -glycan name <sup>b)</sup>	Relative abundance (%) <sup>a)</sup>	
	Total secreted glycoproteins	
	with sucrose	without sucrose
MMXF <sup>3</sup> -PA	16.8	32.3
GnMX-PA	4.0	-
GnMXF <sup>3</sup> -PA	14.6	48.6
GnGnX-PA	3.1	-
AMXF <sup>3</sup> -PA	2.6	1.9
GnGnXF <sup>3</sup> -PA	27.4	7.9
(FA)MXF <sup>3</sup> -PA	-	3.1
AGnXF <sup>3</sup> -PA	3.8	5.0
(FA)GnXF <sup>3</sup> -PA	15.8	1.2
AAXF <sup>3</sup> -PA	1.8	-
(FA)(FA)X-PA	2.0	-
(FA)(FA)XF <sup>3</sup> -PA	8.3	-

<sup>a)</sup>Numbers are the sum of the relative abundance of a specific *N*-glycan and MALDI-TOF/MS intensity <1% have been omitted.

<sup>b)</sup>*N*-glycan names are based on Proglycan (<http://www.proglycan.com>) nomenclature.

#### 나. 벼 현탁세포 유래 단백질 당패턴의 인간화 기술개발

최근 식물에서 외래 유전자의 도입을 통하여 유용 단백질을 생산하는데 있어, 단백질의 3차 구조 형성, folding 그리고 활성에 직접적인 영향을 미치는 당질화 패턴의 중요성이 대두되고 있다. 따라서 유용 단백질 생산에 사용되는 host 식물체의 당질화 패턴에 대한 연구가 필수적으로 이루어 져야 함. 앞의 연구결과를 통하여 벼 현탁세포유래 당단백질의 당패턴을 확인 한 결과  $\beta$ 1,2-xylose와 core  $\alpha$ 1,3-fucose의 잔기를 갖는 전형적인 식물 특이적인 당 구조를 지니고 있음을 확인하였다. 이러한 식물 특이적인  $\beta$ 1,2-xylose와 core  $\alpha$ 1,3-fucose의 잔기는 인체 내에서 알리지 유발 등의 면역반응을 유도함과 함께 단백질의 선택적 분해를 초래하게 된다. 따라서 벼 현탁세포 유래 단백질을 의료용으로서 활용하기 위하여는 식물 당단백질의 당패턴의 인간화가 매우 중요하며, 최근에는 분자농업 분야의 주요 연구과제로 대두되고 있다. 본 과제에서 사용하고 있는 벼의 당단백질 패턴을 인간화시키기 위하여 그림 84과 같은  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase ( $\beta$ 1,2-XylT)와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase ( $\alpha$ 1,3-FucT)에 대한 siRNA 발현 벡터를 제작하였다.  $\beta$ 1,2-XylT (GenBank accession No. XM\_483221)와  $\alpha$ 1,3-FucT (GenBank accession No. AK099681)는 각각 특이적인 프라이머를 사용한 RT-PCR을 이용하여  $\beta$ 1,2-XylT (nucleotide 1072-1321)와  $\alpha$ 1,3-FucT (nucleotide 993-1242) 유전자를 cloning 하여 제작 하였다.

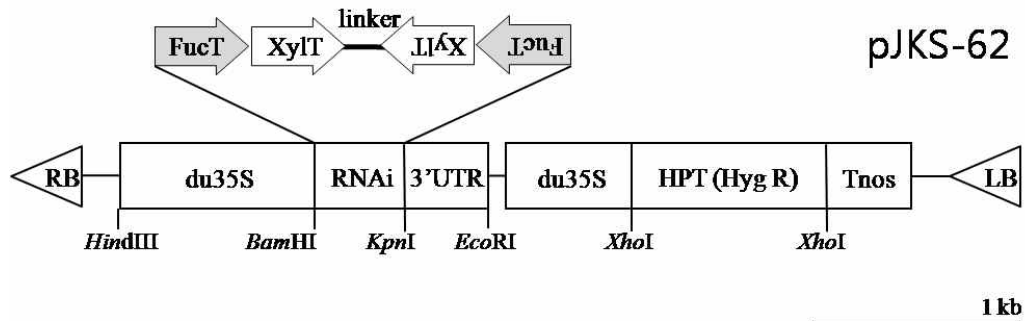


그림 84.  $\alpha$  1,3-FucT와  $\beta$  1,2-XylT의 siRNA 발현벡터의 모식도

$\beta$  1,2-XylT와  $\alpha$  1,3-FucT에 대한 siRNA 발현 벡터인 pJKS-62자를 유전자총 을 이용하여 벼 callus에 형질전환을 수행하였음. 형질전환 수행방법은 성숙된 벼 종자의 배로부터 유도된 캘러스 조직을 신선한 N6Co-culture 배지에 계대 배양하여 배 발생 캘러스의 발달을 유도한 후, 이 캘러스에 유전자 총을 이용하여  $\beta$  1,2-XylT와  $\alpha$  1,3-FucT에 대한 siRNA 발현 벡터를 벼에 도입시켰다. 형질전환은 pJKS-62 DNA (10ug)을 미리 준비해둔 microcarrier (금 입자; gold particle)에 2.5M CaCl<sub>2</sub>, 0.1M spermidine 용액을 이용하여 코팅하여 사용하였다. 형질전환시키고 24시간 후에 벼 캘러스를 Co-culture 배지에서 hygromycin이 포함된 선발배지 (N6SE)로 옮겨 압조건 (25°C)에서 배양하였다. 매 3주 간격으로 신선한 배지로 옮겨 명조건 (25°C) 계대 배양 하였고, 항생제를 포함하는 배지에서 성장하는 14 line의 캘러스를 선발하였으며 유전자 도입 및 발현여부를 확인하기 위하여 증식배지에서 증식하였다. 하이그로마이신을 포함하는 배지에서 선발한 14 line의 형질전환 캘러스의 유전자 도입여부를 확인하기 위하여 Genomic DNA PCR을 실시하였다. Genomic DNA PCR을 실시하기 위하여 선발배지에서 선발한 캘러스 (0.3g)로부터 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA는 lysis buffer [NaCl (6M), SDS (20%), proteinase K(400ug/mL), RNase(10mg/mL)]로 캘러스 조직을 lysis 시킨 후, phenol/chloroform 으로 처리하고, 에탄올에 씻어 말린 후, 증류된 물에 녹여 추출하였다. Genomic DNA 농도를 측정하여 200ng/ul를 genomic DNA PCR에 사용하였다. 유전자 도입여부를 확인하기 위하여  $\beta$  1,2-XylT와  $\alpha$  1,3-FucT 유전자를 증폭 할 수 있는 forward primer와 reverse primer를 사용하여 PCR을 수행 하였다. Genomic DNA PCR을 실시한 결과 유전자가 도입되지 않은 대조구에서는 항원 유전자에 해당하는 유전자의 증폭이 확인되지 않았으나 형질전환 된 캘러스에서는  $\beta$  1,2-XylT와  $\alpha$  1,3-FucT 유전자의 증폭이 확인되어  $\beta$  1,2-XylT와  $\alpha$  1,3-FucT에 대한 siRNA 발현 유전자가 선발된 형질전환 캘러스에 안정적으로 도입되었음을 확인하였다 (그림 85).

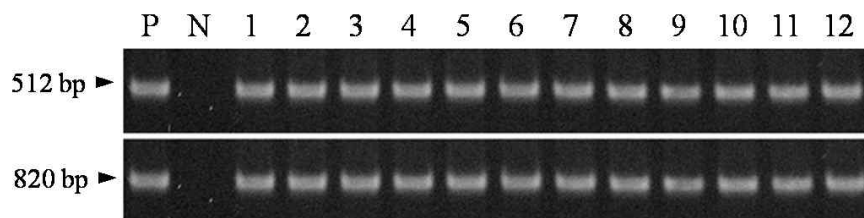


그림 85.  $\Delta$  3FT/XT (pJKS62) 유전자가 형질전환된 식물의 Genomic DNA PCR 결과

상기에서 선발한 12 line의 하이그로마이신 내성 식물로부터 단백질을 추출하여 12% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 한 후에 실온에서 90분간 150 mA의 전류로 PVDF 막에 단백질을 전이 시킨 후 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose에 특이적으로 결합(Wilson and Altmann, 1998) 하는 것으로 알려져 있는 anti-horseradish peroxidase (HRP) (Rockland, Gilbertsville, PA, USA)에 대한 특이적 항체를 이용하여 Western blot analysis를 수행 하였음. 12 line의 하이그로마이신 내성 식물의 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose에 대한 결합 정도를 확인한 결과 형질전환체 별로 다양한 시그널을 확인 할 수 있었으며 이중에서도  $\Delta$ 3FT/XT-2,  $\Delta$ 3FT/XT-6,  $\Delta$ 3FT/XT-9,  $\Delta$ 3FT/XT-10의 4 line을 잠정적으로 당단백질의 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose 잔기의 생성이 억제되어진 elite line으로 선정하였다 (그림 86).

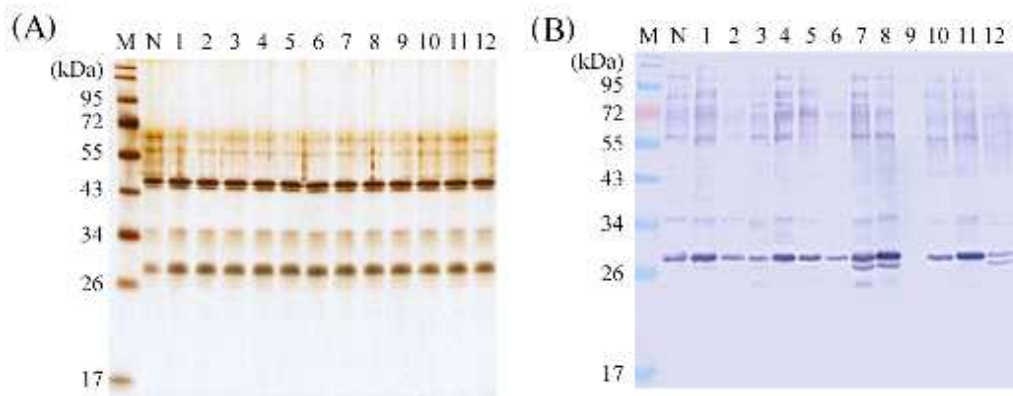


그림 86. Western blot analysis를 이용한 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose 잔기 생성 억제 line의 선발

상기에서 당단백질의 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose 잔기의 생성이 높은 수준으로 억제되어진  $\Delta$ 3FT/XT-2,  $\Delta$ 3FT/XT-6,  $\Delta$ 3FT/XT-9,  $\Delta$ 3FT/XT-10의 4 line을 대상으로  $\alpha$ 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose에 특이적인 항체를 사용하여  $\alpha$ 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose 각각의 잔기의 억제정도를 확인하고자  $\Delta$ 3FT/XT-2,  $\Delta$ 3FT/XT-6,  $\Delta$ 3FT/XT-9,  $\Delta$ 3FT/XT-10의 4 line 으로부터 단백질을 추출하여 12% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 한 후에 실온에서 90분간 150 mA의 전류로 PVDF 막에 단백질을 전이 시킨 후 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose에 특이적으로 결합하는 각각의 항체를 이용하여 Western blot analysis를 수행 하였다. 그림 3-3-5에 나타낸 바와 같이 line 간에 정도의 차이는 있으나 대조구와 비교하여 본 결과 매우 높은 수준으로 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose 잔기의 생성이 억제되었음을 확인할 수 있었음. 이 중에서도 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose 잔기의 생성 억제정도가 가장 뛰어났던  $\Delta$ 3FT/XT-9 line을 대상으로 당단백질의 당 패턴 분석을 실시하였다.

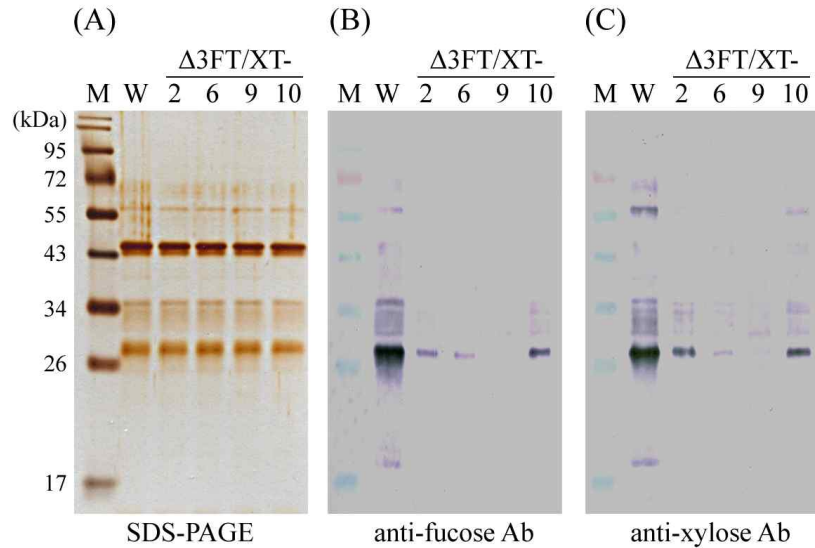


그림 87. xylose와 fucose 특이적 항체를 이용한  $\Delta$ 3FT/XT (pJKS62) 고발현 세포주의 Western blot analysis 결과

$\alpha$  1,3-fucose와  $\beta$  1,2-xylose 잔기의 생성을 매우 높은 수준으로 억제시킨  $\Delta$ 3FT/XT-9 line 으로부터 당단백질을 추출하였으며, 당단백질로부터 당쇄 구조만을 분리할 수 있는 효소인 PNGase A를 처리한 후, carbograph SPE column을 이용하여 당쇄만을 순수 분리하였다. 그 후에 2-aminopyridin을 이용하여 당쇄에 형광물질을 부착한 후, NP-HPLC를 이용하여 정제하고, MALDI-TOF mass spectrometry로 당쇄의 분자량을 측정하였으며 그의 결과를 그림 88, 표 12와 13에 정리하여 나타내었음. 대조구의 MALDI-TOF mass spectra(MS)를 분석 한 결과 14개 (MMX, MMXF3, GnMX, GnMXF3, GnGnX, GnGnXF3, AGnX, AMX, AMXF3, (FA)GnX, (FA)GnXF3, (FA)AX, (FA)(FA)X, and (FA)(FA)XF3)의 패턴을 확인 할 수 있었으며, 이중에서도 GnGnXF3 (27.0%), GnMXF3 (20.9%), MMXF3 (12.1%) 형태가 가장 높은 수준으로 나타났다. MMXF3(12.1%)만을 제외 하면 대조구의 모든 N-glycans 구조는  $\alpha$  1,3-fucose와  $\beta$  1,2-xylose 잔기를 갖는 complex type으로 확인되었음(87.9%). 한편,  $\alpha$  1,3-fucose와  $\beta$  1,2-xylose 잔기의 생성을 매우 높은 수준으로 억제시킨  $\Delta$ 3FT/XT-9 line의 당 구조를 확인 한 결과 24 glycan structures를 확인 하여 대조구 보다 10 종류의 패턴이 증가하였음을 확인 하였고 이중에서 GnGn (14.2 %)과 GnMX (11.4%) 형태가 가장 높은 수준으로 확인 되었고 대부분의 당 형태에서  $\alpha$  1,3-fucose와  $\beta$  1,2-xylose가 억제되었음을 확인하였음. 특히,  $\Delta$ 3FT/XT-9 line의  $\alpha$  1,3-fucose 잔기 생성율은 18.0%로서 대조구의 81.1%와 비교하여 약 4.5배  $\alpha$  1,3-fucose 잔기 생성이 억제되었음을 확인하였다.

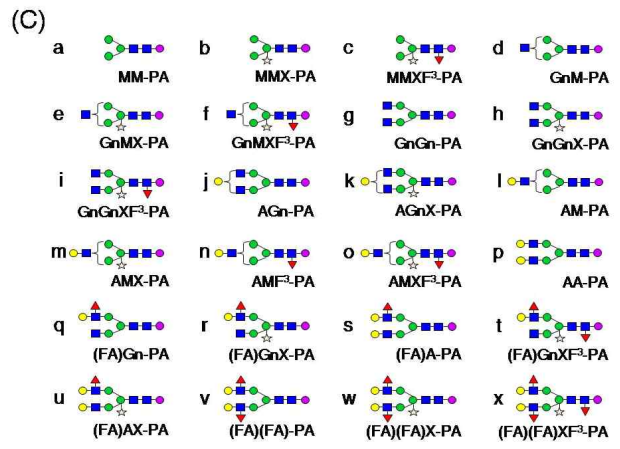
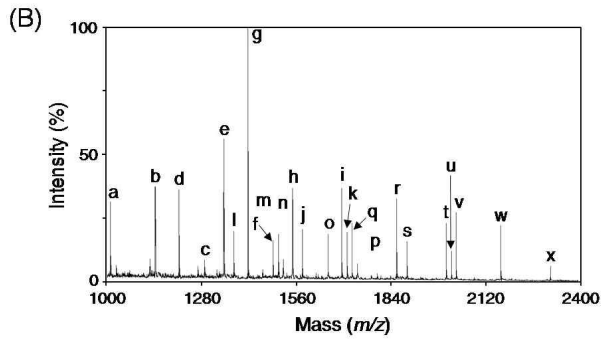
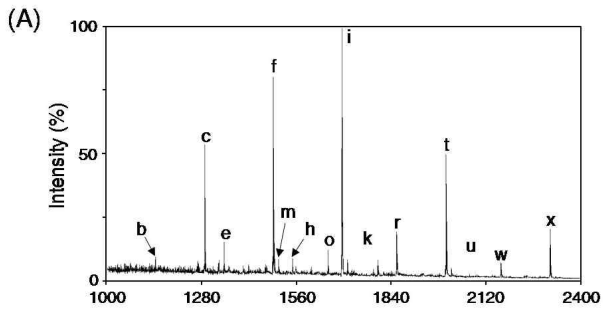


그림 88. MALDI-TOF mass 스펙트럼 분석 결과.  $\blacksquare$ , *N*-acetylglucosamine;  $\bullet$ , mannose;  $\bullet$ , galactose;  $\blacktriangle$ , fucose;  $\star$  xylose;  $\bullet$ , PA

표 12.  $\Delta$  3FT/XT-9 형질전환 세포주의 *N*-glycan 패턴의 비교

Peak Name	<i>N</i> -glycan	<i>m/z</i> (M+Na)			Relative abundance (%) <sup>1)</sup>	
		Calculated	Measured		wild type	$\Delta$ 3FT/XT-9
			wild type	$\Delta$ 3FT/XT-9		
a	MM-PA	1011.87		1011.27		4.5
b	MMX-PA	1144.00	1143.04	1143.22	2.5	7.7
c	MMXF <sup>3</sup> -PA	1290.16	1289.76	1290.08	12.1	1.5
d	GnM-PA	1215.08		1214.89		5.4
e	GnMX-PA	1347.21	1346.94	1346.13	2.7	11.4
f	GnMXF <sup>3</sup> -PA	1493.37	1492.89	1492.88	20.9	2.2
g	GnGn-PA	1418.29		1417.10		14.2
h	GnGnX-PA	1550.42	1549.86	1549.75	1.5	7.7
i	GnGnXF <sup>3</sup> -PA	1696.58	1696.81	1695.14	27.0	5.9
j	AGn-PA	1580.45		1579.02		2.9
k	AGnX-PA	1712.58	1711.80	1711.04	1.5	2.9
l	AM-PA	1377.24		1376.10		2.5
m	AMX-PA	1509.37	1508.91	1508.54	2.2	2.8
n	AMF <sup>3</sup> -PA	1523.40		1521.55		1.6
o	AMXF <sup>3</sup> -PA	1655.53	1654.88	1655.06	2.6	2.5
p	AA-PA	1742.61		1740.96		1.4
q	(FA)Gn-PA	1726.61		1724.94		2.8
r	(FA)GnX-PA	1858.74	1857.72	1857.46	5.6	4.7
s	(FA)A-PA	1888.77		1886.85		2.4
t	(FA)GnXF <sup>3</sup> -PA	2004.90	2003.65	2003.21	2.6	3.1
u	(FA)AX-PA	2020.90	2019.61	2019.05	1.1	1.6
v	(FA)(FA)-PA	2034.93		2032.70		4.1
w	(FA)(FA)X-PA	2167.06	2165.56	2165.24	1.8	3.0
x	(FA)(FA)XF <sup>3</sup> -PA	2313.22	2312.50	2312.04	5.9	1.2

<sup>1)</sup> Numbers are the sum of the relative abundances of a specific glycoform on extracellular glycoproteins. The data were deduced from MALDI-TOF MS data (Fig. 7)

표 13.  $\Delta$ 3FT/XT-9 형질전환 세포주와 대조구의 상대적 N-glycan 비교

Type of glycan <sup>a)</sup>	Relative abundance (%) <sup>b)</sup>		$\Delta$ 3FT/XT-9
	wild	type	
Xyl0Fuc0	0.0		40.2
Xyl1Fuc0	18.9		41.8
Xyl0Fuc1	0.0		1.6
Xyl1Fuc1	81.1		16.4
Total fucose	81.1		18.0
Total xylose	100		58.2

<sup>a)</sup> Xyl0Fuc0, Man  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$  -4GlcNAc-Asn; Xyl1Fuc0, (Xyl  $\beta$ 1-2)Man  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc-Asn; Xyl0Fuc1, Man  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$  1-3)GlcNAc-Asn; Xyl1Fuc1, (Xyl  $\beta$ 1-2)Man  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$  1-3)GlcNAc-Asn

<sup>b)</sup> The data were deduced from MALDI-TOF MS results (Table 5)

#### 다. 벼 현탁세포 유래 당단백질의 인간화

최근 식물에서 외래 유전자의 도입을 통하여 유용 단백질을 생산하는데 있어, 단백질의 3차 구조 형성, folding 그리고 활성에 직접적인 영향을 미치는 당질화 패턴의 중요성이 대두되고 있다. 따라서 유용 단백질 생산에 사용되는 host 식물체의 당질화 패턴에 대한 연구가 필수적으로 이루어져야 한다. 지난 1차년도 연구결과를 통하여 벼 현탁세포유래 당단백질의 당패턴을 확인한 결과  $\beta$ 1,2-xylose와 core  $\alpha$ 1,3-fucose의 잔기를 갖는 전형적인 식물 특이적인 당 구조를 지니고 있음을 확인 하였으며, 2차 년도에는 인체 내에서 알려지 유발 등의 면역 반응을 유도함과 함께 단백질의 선택적 분해를 초래하게 되는 식물 특이적인  $\beta$ 1,2-xylose와 core  $\alpha$ 1,3-fucose의 잔기를 없애기 위하여  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase ( $\beta$ 1,2-XylIT)와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase ( $\alpha$ 1,3-FucT)에 대한 siRNA 발현 벡터를 제작하고 이를 벼에 도입한 후에 당분석을 수행한 결과 성공적으로 1,2-xylose와 core  $\alpha$ 1,3-fucose의 잔기의 생성이 억제됨을 확인하였다. 그림 89에 나타낸 바와 같이 당의 끝에 붙어있는 식물 특이적인 1,3-galactose와  $\alpha$ 1,3-fucose를 제거한 후 인간 당패턴인 1,4-galactosyltransferase를 도입하여 1,4-galactose 패턴을 지닌 인간 당패턴으로 전환시키고자 그림 90과 같이 당해 연도에는 식물 특이적인 1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase에 대한 siRNA 발현 벡터를 제작하여 벼에 형질전환 하였다.

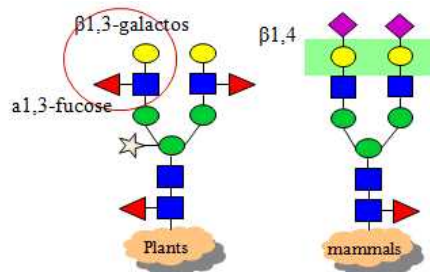


그림 89. 식물과 동물의 당패턴의 비교



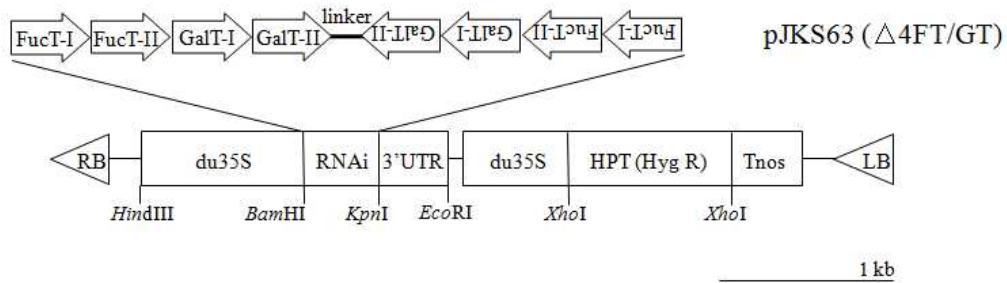


그림 90. 1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase에 대한 siRNA 발현 벡터 모식도

1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase에 대한 siRNA 발현 벡터를 도입하고 하이그로마이신에서 형성된 callus를 대상으로 siRNA 발현으로 1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase 유전자의 발현이 억제된 세포주를 선발하였음. 하이그로마이신을 포함하는 선발배지에서 성장한 callus 11 line에 대하여 Real-time PCR을 이용하여 1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase 유전자 각각의 발현 정도를 확인한 결과를 그림 91에 나타내었음. 11 line중에서 S63-1, S63-12번 cell line에서 95% 이상의 발현 억제가 확인되었다.

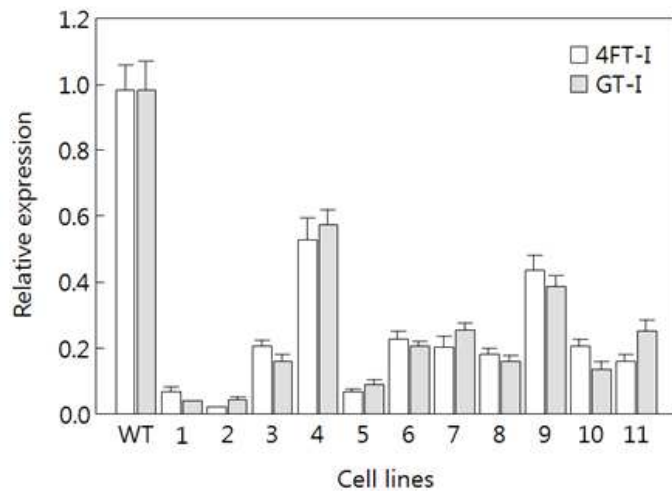


그림 91. Real time PCR을 이용한 1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase 억제 세포주의 선발

상기에서 확보한 1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase 유전자의 발현이 대부분 억제된 S63-1번 line을 대상으로 당단백질을 추출하였으며, 당단백질로부터 당쇄 구조만을 분리할 수 있는 효소인 PNGase A를 처리한 후, carbograph SPE column을 이용하여 당쇄만을 순수 분리하였다. 그 후에 2-aminopyridin을 이용하여 당쇄에 형광물질을 부착한 후, NP-HPLC를 이용하여 정제하고, MALDI-TOF mass spectrometry로 당쇄의 분자량을 측정하였으며 그의 결과를 그림 92, 표 14에 정리하여 나타내었음. 대조구의 MALDI-TOF mass spectra(MS)를 분석한 결과 14개(MMX, MMXF3, GnMX, GnMXF3, GnGnX, GnGnXF3, AGnX,

AMX, AMXF3, (FA)GnX, (FA)GnXF3, (FA)AX, (FA)(FA)X, and (FA)(FA)XF3의 패턴을 확인 할 수 있었으며, 이중에서도 GnGnXF3 (34.46%), GnMXF3 (16.29%), MMXF3 (10.50%) 형태가 가장 높은 수준으로 나타났다. MMXF3(10.50%)만을 제외 하면 대조구의 모든 *N*-glycans 구조는  $\alpha$  1,3-fucose와  $\beta$  1,2-xylose 잔기를 갖는 complex type으로 확인되었다 (87.9%). 한편, 1,3-galactose와  $\alpha$  1,3-fucose 잔기의 생성을 매우 높은 수준으로 억제시킨 S63-1 line의 당 구조를 확인 한 결과 단지 5 glycan structures를 확인 하여 대조구 보다 6 종류의 패턴이 감소하였음을 확인 하였으며 이는 모두 1,3-galactose와  $\alpha$  1,3-fucose 잔기를 포함하는 AM, AMXF3, AGn, AGnX, AGnXF3, AF4Gn, AF4GnXF3, AA, AAF4XF3, AAF4F4XF3 이었다. 본 연구를 통하여 1,3-galactosyltransferase와  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase에 대한 siRNA 발현으로 1,3-galactose와  $\alpha$  1,3-fucose 잔기의 생성이 완벽하게 억제되었음을 확인하였다.

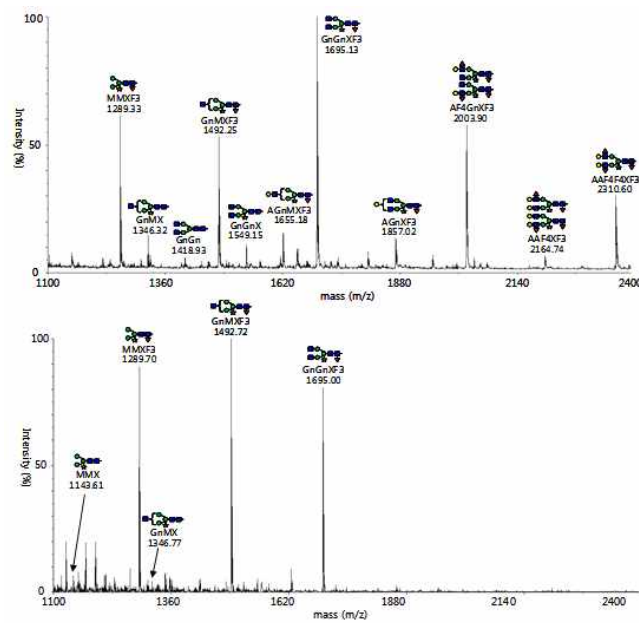


그림 92. MALDI-TOF mass 스펙트럼 분석 결과. ■, *N*-acetylglucosamine; ●, mannose; ●, galactose; ▲, fucose; ★ xylose; ●, PA

표 14. S63-1 형질전환 세포주의 *N*-glycan 패턴의 비교

<i>N</i> -glycan	Mass (m/z) <sup>*</sup>	wild type	Δ3FT/XT	Δ4FT/GT
MMX	1144.03	-	12.57	2.73
MMXF3	1290.19	10.50	-	31.20
GnM	1215.11	-	8.19	-
GnMF3	1361.27	-	5.38	-
GnMX	1347.24	1.77	17.77	2.58
GnMXF3	1493.40	16.29	2.93	33.68
GnGn	1418.32	2.5	6.76	-
GnGnX	1550.45	3.18	16.57	-
GnGnXF3	1696.61	34.46	7.16	29.81
AM	1377.27	-	3.80	-
AMXF3	1655.56	2.75	-	-
AGn	1580.48	-	5.62	-
AGnX	1712.61	-	6.36	-
AGnXF3	1858.77	3.39	-	-
AF4Gn	1726.64	-	5.11	-
AF4GnXF3	2004.93	18.67	-	-
AA	1742.64	-	1.78	-
AAF4XF3	2167.09	1.34	-	-
AAF4F4XF3	2313.25	5.15	-	-

4. 식물유래 산업용 효소의 산업화 추진  
나. 연구결과를 활용한 산업화 추진 내용  
(1). 200L급 대용량 바이오리액터 제작

당초 목표인 200L/회 보다 10배 배양규모가 큰 air-bubble type bioreactor를 제작(그림 93, 94) 하였으며 현재 시운전 중에 있어 대량생산의 기반을 구축 하였다고 판단 되었다 (재조합단백질의 생산을 위한 200L/회 air-bubble type bioreactor는 국내 최대 규모로 파악하고 있다)



그림 93. 250L규모의 식물세포배양기 3D 모델



그림 94. 250L규모의 식물세포배양기 운용 크린룸

나. 식물세포유래 단백질의 제품화 완성

본 연구수행을 통하여 확보한 벼 현탁세포유래 TEV endopeptidase와 Enterokinase의 사업화를 위하여 제품에 대한 포장, 카달로그 및 MSDS의 작성을 완료하여 판매를 위한 제반 준비를 완료하였다.



**Human Enterokinase**

- Specific protease that cleaves after the sequence Asp-Asp-Asp-Asp-Lys
- Light chain of enteropeptidase has full enzymatic activity
- Source : *Oryza sativa*, N-glycosylated
- Biorisk-free



**Tobacco Etch Virus (TEV) endopeptidase**

- Seven amino acid recognition site for rTEV is Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly
- Cleavage occurring between Gln and Gly
- Source : *Oryza sativa*, *E-coli* and *Tobacco*
- Biorisk-free

그림 95. 본 연구를 통하여 생산된 벼 현탁세포유래 와 Enterokinase(위)의 TEV endopeptidase (아래)

**nbm** Natural Bio-Materials

**Recombinant human Enterokinase (light chain) from *Oryza sativa***

**DESCRIPTION**

**Source** *Oryza sativa*-derived  
Recombinant human Enterokinase light chain containing C-terminal (His).

**Predicted molecular mass** 26 kDa (light chain)

**SPECIFICATIONS**

**SDS-PAGE** ~40 kDa, reducing conditions

**Activity** Measured by its ability to cleave a colorimetric peptide substrate, GD4K-β-naphthylamine. Galsarson M E, et al. 2006 (Biochemistry/Moscow)  
The specific activity is > 9 units/mg/min, as measured under the described conditions. See Activity Assay Protocol

~95%, by SDS-PAGE under reducing conditions and visualized by silver stain

**Purity** (A) SDS-PAGE (B) Western blot

**Formulation** Supplied as a 0.2 μm filtered solution in 50% glycerol, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4

**Activity Assay Protocol**

**Materials**

- Assay buffer: 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 20 mM Tris-HCl, pH 7.4
- Recombinant human enterokinase(light chain)
- Substrate: GD4K-β-naphthylamine(Sigma, Catalog # G5261), 100 mM stock in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4
- Optical glass cuvette, pathlength 10mm (Sigma, Catalog # Z800024)
- DU 800 UV-Visible spectrophotometer (Beckman coulter) or equivalent

**Assay**

1. Dilute rEnterokinase to 0.1 mg/ml, in Assay buffer
2. Load into a glass cuvette 990μl of the Assay buffer
3. For a substrate, load 2 μl of 100 mM substrate
4. Start the reaction by adding 2 μl of the diluted rEnterokinase
5. Read in kinetic mode for 5 minutes at an absorbance of 340nm
6. Calculate specific activity

$$\text{Specific Activity (units/mgmin)} = \frac{\Delta A_{340nm}/\text{min}}{1.54}$$

\*\*The extinction coefficient (ε) of GD4K-β-naphthylamine is 1640 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 340nm in Assay buffer.

**Stability & Storage** Use a manual defrost freezer and avoid repeated freeze-thaw cycles.

- 6 months from date of receipt, -20 to -70°C as supplied.
- 3 months, -20 to -70°C under sterile conditions after opening.

www.nbmn.co.kr Tel. +82-63-223-4555, Fax. +82-63-223-4530 E-mail : nbmn4555@hanmail.net

**nbm** Natural Bio-Materials

**Recombinant Tobacco Etch Virus (TEV) endopeptidase from *Oryza sativa***

**DESCRIPTION**

**Source** *Oryza sativa*-derived  
Recombinant TEV endopeptidase

**Predicted molecular mass** 27 kDa protein with a polyhistidine tag at the C-terminal

**SPECIFICATIONS**

**SDS-PAGE** ~27 kDa, reducing conditions

**Activity** Measured by its ability to cleave a fusion protein containing the recognition sequence Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln, with the cleavage point after Gln  
TEV endopeptidase cleaves >50% of the control fusion protein, as measured under the described conditions. See Activity Assay Protocol

**Unit Definition** One unit of rTEV cleaves >90% of 3 μg control fusion protein in 50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0 at 25°C for 1h

**Purity** ~95%, by SDS-PAGE under reducing conditions and visualized by silver stain

**Formulation** The protein was lyophilized without any additives

**Activity Assay Protocol**

**Assay**

1. Dilute rTEV endopeptidase to 1 mg/ml, in Assay buffer (50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0)
2. Form reaction mixture by combining 1 μl of substrate (3 mg/mL) and 28 μl Assay buffer
3. Add 1 μl rTEV endopeptidase(1mg/mL) to the reaction mixture
4. Incubate the reaction for 1 hour at room temperature
5. Stop the reaction by mixing 5μl reducing (in non-reducing) SDS-PAGE sample buffer. Heat for 5 minutes at 100°C.
6. Analyze the cleavage by SDS-PAGE followed by protein staining or western blot.

**Stability & Storage** (Bovine Trypsin although stable at room temp for 1 week, should be stored desiccated below -18°C. For long term storage it is recommended to add a carrier protein (1% HSA or BSA). Please prevent freeze-thaw cycles.

www.nbmn.co.kr Tel. +82-63-223-4555, Fax. +82-63-223-4550 E-mail : nbmn4556@hanmail.net

그림 96. 본 연구를 통하여 생산된 벼 현탁세포유래 TEV endopeptidase(우)와 Enterokinase(좌)의 카달로그



다. 식물세포유래 단백질의 브랜드 확정

식물세포에서 생산된 재조합 단백질의 산업화를 위하여 모든 단백질에 적용 할 브랜드 명을 확정하여 국문과 영문으로 특허청에 각각 상표출원(4건)을 완료하였다. 상표는 **Innovative + Cytokine**, **Innovative + Enzyme**의 합성어로서 식물에서 생산된 Biorisk free의 혁신적인 사이토카인과, 혁신적인 효소라는 의미를 담고 있다.

구분	상표명	
	국문	영문
식물유래 사이토카인	<b>이노카인</b>	<b>INNOKine</b>
식물유래 효소	<b>이노자임</b>	<b>INNOzyme</b>

라. 본 연구결과의 홍보를 위한 관련 국제전시회 및 학회 참가

본 연구수행을 통하여 확보한 벼 현탁세포유래 TEV endopeptidase와 Enterokinase의 사업화를 위하여 2012 국제 BIO-KOREA(KINTEX, 2012년 9월12-14)와, 2012 분자세포생물학회(COEX, 2012년 10월 11-12)에 홍보부스를 설치하여 상품과 기술을 홍보하였다. 특히 2012 국제 BIO-KOREA에서는 다국적 회사로부터 호평을 받아 벼 현탁세포유래 단백질에 대한 수출협의를 진행하고 있다.



2012 국제 BIO-KOREA(KINTEX)  
(2012년 9월12-14)

2012 분자세포생물학회(COEX)  
(2012년 10월 11-12)

## 제 5 절: 식물세포배양을 이용한 항체 대량생산 및 기능분석 연구

(제 1 핵심 4세부과제- 전북대학교)

치주질환의 원인균인 *Porphyromonas gingivalis*의 FimA 단백질에 대한 항체를 생산하는 벼 식물세포 현탁배양에서 대체 탄소원과 삼투압 제제 첨가에 의한 항체의 생산량을 증진, 항체 발현에 이용된 amylase 3D promoter 유도시 당 결핍 조건에서 배지에 축적되는 amylase와 protease의 감소에 의한 항체 분리 효율의 증진을 위한 siRNA 기법을 이용한 amylase의 감소, 배지 내에 분비, 축적된 항체의 protease에 의한 분해 억제에 의한 항체 축적 등에 대한 연구를 수행하고 또한 벼 식물세포 현탁배양에서 생산 및 분리된 항체에 대한 기능을 확인하기 위한 연구를 수행하였다.

### 1. Amylase와 CysP 발현 억제에 의한 항체 발현 증진

#### 가. Amylase와 CysP 발현 억제를 위한 식물발현벡터 제작

선행연구결과 확보된 rice amylase 3D 유전자와 cysteine proteinase (CysP) 유전자를 바탕으로 amylase와 CysP 유전자의 발현이 동시에 억제되도록 RNAi에서 trigger로 작용할 수 있는 구조를 제작하였고 RNAi의 trigger 사이에 rice amylase 3D 유전자의 첫 번째 intron을 linker로 삽입하여 ihpRNA 구조를 구축하였다.

먼저 trigger1과 2를 제작하기 위하여 다음과 같은 amylase arm F1 5'-ACT AGT AAT ATT CGG TGA TGA TGA CTG ATG AAC CAC CGG TGC G-3' 과 amylase arm F2 5'-ACT AGT GGT ACC AGC GAC GAC ACG CAG TAC TC-3' 그리고 amylase arm R1 5'-GGA TCC TGT CGT GGT TGT CGA ACG TGA C-3' primers를 합성하였다. Primer에 삽입된 제한효소부위 *SpeI*, *SspI*, *KpnI* and *BamHI* (밑줄 그어짐)는 subcloning의 편리를 위하여 삽입하였다.

상기의 primer들을 이용하여 amylase 유전자를 포함하고 있는 pMYN305 plasmid DNA를 주형으로 하여 trigger1에 사용될 amylase arm-1은 amylase arm F1과 amylase arm R1 primer를, trigger 2에 사용될 amylase arm-2는 amylase arm F1과 amylase arm R1 primer를 가지고 PCR 방법을 이용하여 증폭하였다. 각각의 PCR 산물, 500와 600 bp의 DNA fragments를 pGEM-T Easy vector에 도입하여 DNA sequencing을 이용하여 DNA 염기서열을 확인하였

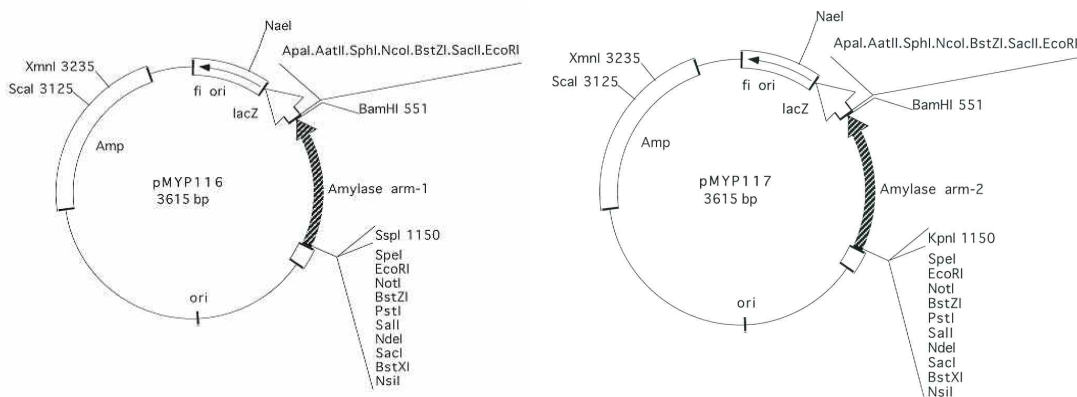


그림 1. Amylase 유전자에 대한 RNAi 구조를 제작하기 위한 plasmid vectors.



고 pMYP116과 pMYP117로 명명하였다 (그림 1). pMYP116과 pMYP117에서 EcoRI 제한효소를 이용하여 각각의 DNA fragment 500과 600 bp를 확인하여 유전자의 도입을 확인하였다 (그림 2).

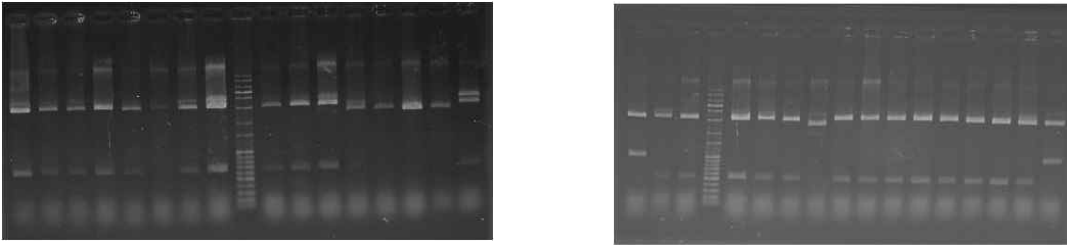
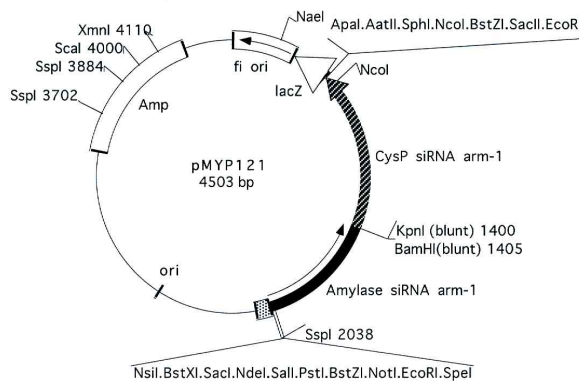


그림 2. pMYP116와 pMYP117 제한효소를 이용한 분석

Amylase와 CysP가 동시에 연결된 trigger1을 제작하기 위하여 plasmid pMYP116으로부터 amylase를 BamHI 처리후 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt end를 만든 후 SpeI으로 절단한 후 선행연구결과에서 CysP를 포함하고 있는 pMYP104를 KpnI 처리후 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt end를 만든 후 SpeI으로 절단하고 삽입하여 amylase+CysP arm-1을 제작하였고 pMYP121이라 명명하였다 (그림 3). 벡터를 제한효소 EcoRI을 이용하여 목적 유전자의 삽입을 확인하였다.

Amylase와 CysP가 함께 연결된 trigger2를 제작하기 위하여 plasmid pMYP117로부터 amylase를 BamHI 처리후 Klenow fragment를 이용하여 blunt end를 만든 후 SpeI으로 절단한 후 선행연구결과에서 이미 제작된 pMYP104를 KpnI 처리후 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt end를 만든 후 SpeI으로 절단하여 삽입하여 amylase+CysP arm-2를 제작하였고 pMYP122이라 명명하였다 (그림 4). 상기의 벡터들을 제한효소 EcoRI을 이용하여 목적 유전자의 삽입을 확인하였다.



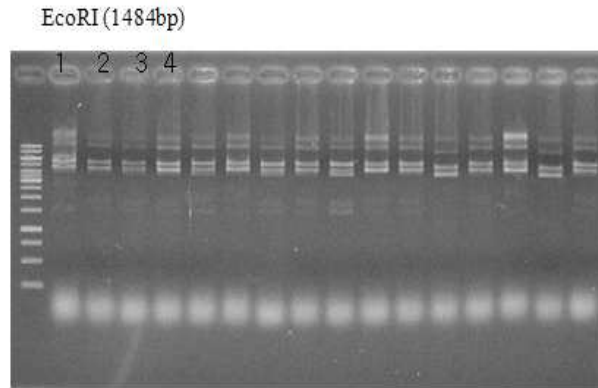


그림 3. Amylase와 CysP의 trigger 1의 제작

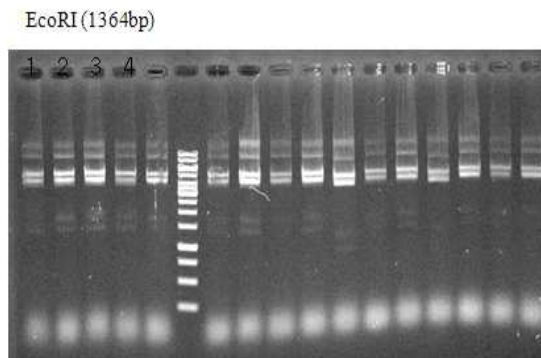
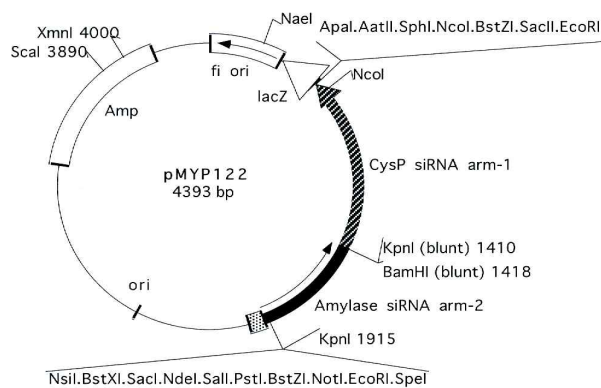


그림 4. Amylase와 CysP의 trigger 2의 제작

Amylase와 CysP의 hairpin RNA (hpRNA) 구조를 제작하기 위하여 amylase+CysP arm-1이 삽입되어 있는 plasmid pMYP121를 제한효소 SpeI으로 절단한 후 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt end를 생성한 후 제한 효소 NcoI으로 절단하였으며, plasmid pMYN319를 제한효소 XbaI 으로 절단한 후 Klenow fragment를 이용하여 blunt end를 생성한 후 NcoI으로 절단하여 목적 유전자를 삽입하였고 pMYP123이라 명명하였다 (그림 5).

또한 amylase+CysP arm-2가 삽입되어 있는 plasmid pMYP122를 제한효소 KpnI과 NcoI으로 절단하여, amylase+CysP arm-1이 삽입되어 있는 plasmid pMYP123을 동일한 제한효소

로 절단하여 목적유전자를 삽입하여 pMYP124를 제작하였다 (그림 6). 삽입된 목적유전자를 확인하기 위하여 KpnI과 NcoI 제한효소를 이용하여 확인하였다 (그림 6).

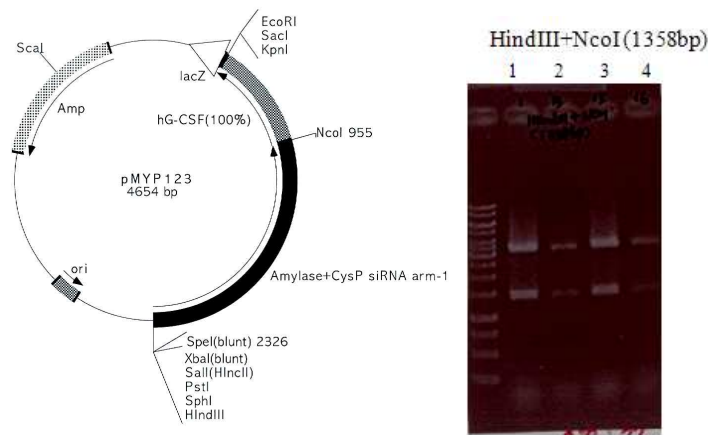


그림 5. Amylase-CysP siRNA의 arm-1를 포함하는 벡터 제작

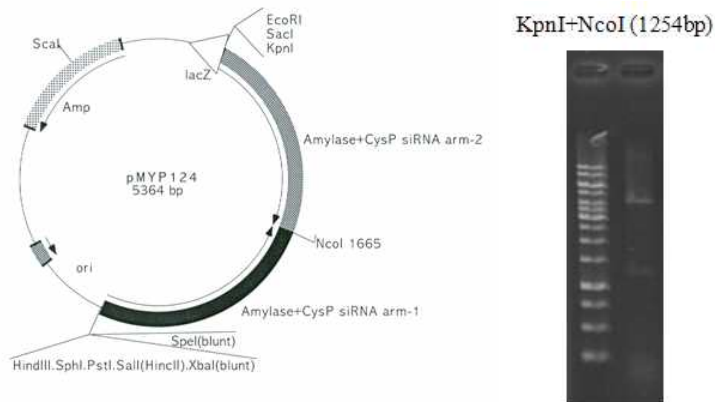


그림 6. Amylase-CysP siRNA를 포함하는 벡터 제작

두 유전자를 연결하는 linker로 rice amylase 3D 유전자의 첫 번째 intron을 삽입하기 위하여 선행 연구결과에서 제작된 linker가 삽입되어 있는 pMYN316을 NcoI으로 절단 후 pMYP124를 NcoI으로 절단하여 linker를 삽입하였으며, ihpRNA 구조를 제작하여 pMYP125로 명명하였다 (그림 7). 삽입된 linker의 방향성을 확인하기 위하여 EcoRI과 SnaBI, 그리고 HindIII와 SnaBI을 이용하여 함께 절단하여 linker가 trigger1으로부터 trigger2 방향으로 올바르게 삽입된 것을 확인하였다 (그림 7).

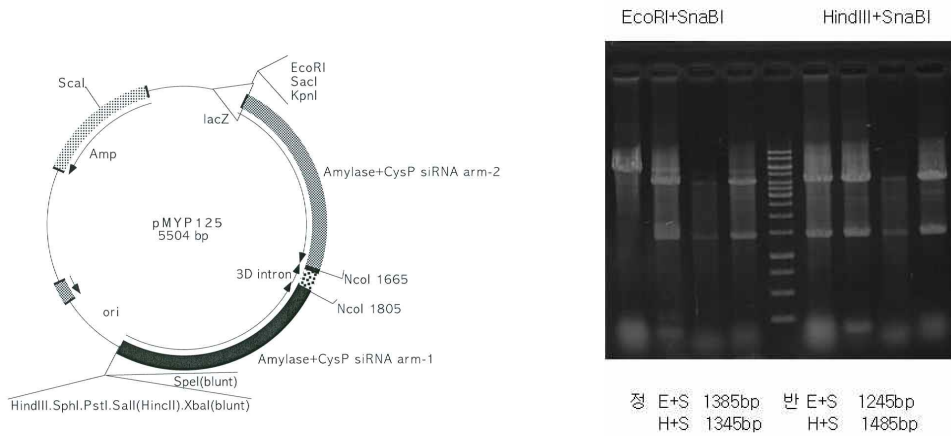


그림 7. Amylase와 CysP에 대한 ihpRNA 구조를 포함하는 벡터 제작

Amylase와 proteinase CysP의 발현 억제에 추가로 proteinase inhibitor인 C1-T1 유전자의 발현을 위한 식물발현벡터를 제작하기 위하여 Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV35S) promoter 조절 하에 rice amylase 1A 유전자의 signal sequence를 가지고 있는 proteinase inhibitor인 C1-T1유전자를 포함하고 형질전환 식물체의 선발마커로 Hygromycin phosphotransferase gene (*Hpt*)를 포함하고 있는 pMYP120을 KpnI으로 절단 후 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt end를 만든 후, pMYP125의 amylase+CysP의 ihpRNA를 HindIII와 KpnI으로 절단한 후 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt end를 만들어 ligation하여 벡터를 제작하였고 pMYP127이라 명명하였다 (그림 8).

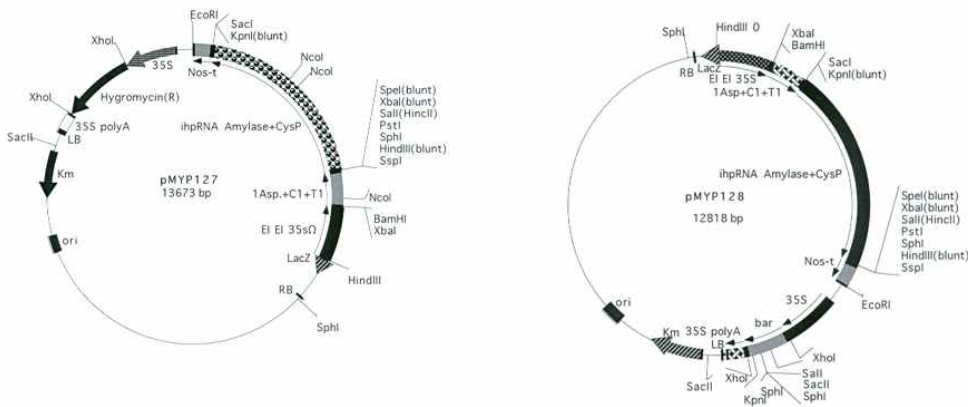


그림 8. 식물발현벡터 pMYP127과 pMYP128 제작

Amylase+CysP의 ihpRNA 구조의 삽입을 확인하기 위하여 그림 9와 같은 제한 효소의 조합을 이용하여 유전자의 도입을 확인하였다.

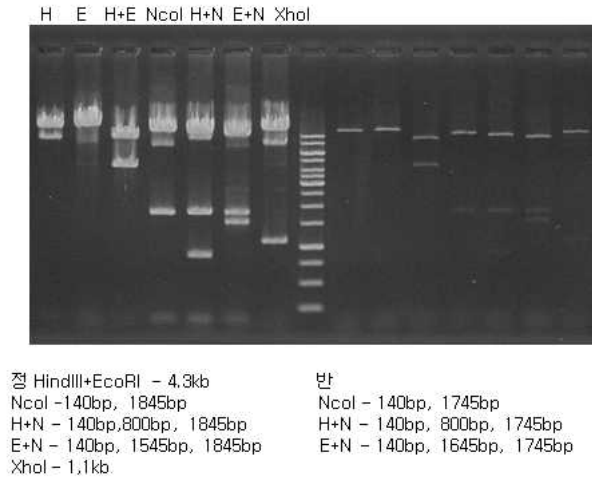


그림 9. 식물발현 벡터 pMYP127 제한효소 분석

치주질환 원인균인 *Porphyromonas gingivalis*의 FimA 단백질에 대한 항체를 발현하는 벼의 callus는 hygromycin 항생제에서 선발되었기 때문에 C1-T1+siRNA Amylase+siRNA CysP 유전자를 가진 식물발현벡터는 다른 selection marker를 가져야 하므로 형질전환 식물체를 phosphinotrichin phosphotransferase gene (Bar)에 의해 선발하기 위하여 selection marker로 Bar 유전자를 가지고 있는 pCAMBIA3300 벡터를 HindIII+EcoRI 절단한 후, pMYP127을 동일한 제한 효소로 절단하여 pCAMBIA3300 벡터에 삽입하였으며 pMYP128이라 명명하였다 (그림 8). Subcloning을 확인하기 위하여 HindIII와 EcoRI 제한효소를 이용하여 유전자의 도입을 확인하였다 (그림 10).

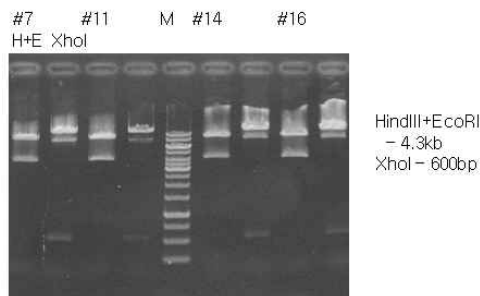


그림 10. 식물발현벡터 pMYP128 제한효소 분석

나. 항체 단백질 고발현 식물체를 이용한 식물의 형질전환

(1) 벼의 형질전환

사전연구에서 확보된 *P. gingivalis* FimA 단백질에 대한 항체를 고발현하는 벼의 callus #123-9 line과 #265-4 line에 C1+T1과 amylase와 CysP의 siRNA를 포함하고 있는 식물발현벡터 pMYP128을 형질전환하기 위해 하루 전 N6CO배지에서 callus를 암배양하였다. N6CO 배지는 3.957 g/L의 N6 salt (vitamins 포함), 30 g/L의 sucrose, 2 mg/L의 2,4-D, 0.2 mg/L의 kinetin, 10 g/L의 glucose, 2 g/L phytigel로 이루어졌고 pH 5.2 임. 식물발현벡터 pMYP128 plasmid DNA 5 ug을 gold particles (0.6 μm)에 코팅한 다음 Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (BIO-RAD)을 이용하여 형질전환을 수행하였다. 그 다음 #123-9와 #265-4

캘러스를 N6CO배지에서 3일간 암배양한 후 항생제가 포함된 N6SE 배지에 옮겼다. N6SE 배지는 3.957 g/L의 N6 salt (including vitamin), 30 g/L의 sucrose, 2 mg/L의 2,4-D, 0.2 mg/L의 kinetin, 2 g/L phytigel로 이루어졌고 pH는 5.8 이고, 여기에 50 mg/L의 hygromycin B와 4 mg/L의 PPT (DL-phosphinotricin)를 포함하고 있다. 여기에서 hygromycin B는 항체 유전자의 선발을 위한 선발 마커이고 PPT는 pMYP128 plasmid에 대한 선발 마커로 이용되었다. 현재 N6SE배지에서 형질전환된 callus를 선발하였다 (그림 11).

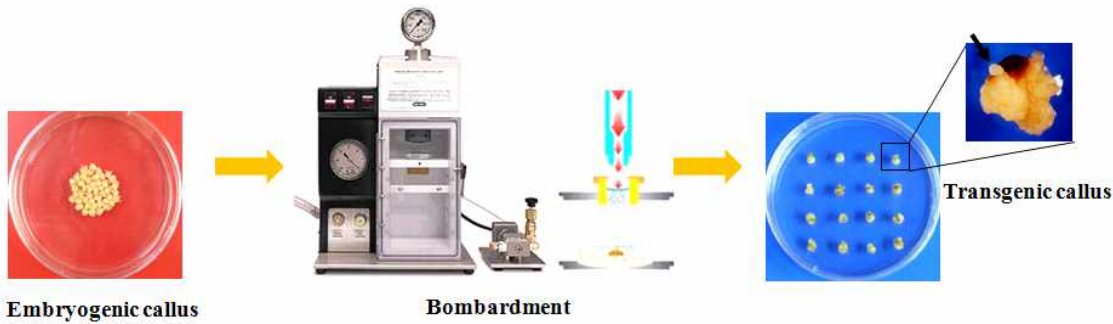


그림 11. Particle bombardment 형질전환 방법을 이용한 rice callus의 형질전환

(2) pMYP128의 형질전환 식물체 선발 및 genomic DNA PCR 분석

식물현탁세포배양에서 amylase와 CysP 단백질의 발현을 억제할 수 있는 ihpRNA 구조와 proteinase inhibitor인 C1-T1 유전자를 포함하고 있는 식물발현벡터(pMYP128)를 제작하여 *P. gingivalis* FimA 단백질에 대한 항체를 고발현하는 벼의 캘러스 #123-9와 #265-4에 형질전환을 수행하여 선발배지에서 형질전환 캘러스를 선발하였다.

항생제를 포함한 배지에서 선발된 callus들의 항원유전자의 도입을 확인하기 위하여 형질전환에 이용된 pMYP128 plasmid에 포함되어있는 유전자의 DNA 염기서열에 특이적인 primer를 이용하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. 사용된 forward와 reverse primer의 위치는 그림 12에 표시하였다. Ramy1A F-B (5’-GGA TCC GCA TGC AGG TGC TGA-3’)와 3D linker R1(5’-CCA TGG CCC TGC ATG ATG CAT GTT ATA AGT AGG TAA G-3’)을 사용하여 PCR을 수행한 결과로는 sense strand에 해당하는 1,930 bp 크기의 밴드를 확인하여야 하고, 3D linker F1 (5’-CCA TGG AGG TAC GTA GTA CTC TAC TAC CCA TCA C-3’)와 Amylase arm F2 (5’-ACT AGT GGT ACC AGC GAC GAC ACG CAG TAC TC-3’)를 사용하여 수행한 PCR의 결과로는 anti-sense strand에 해당하는 1,380 bp 크기의 밴드를 확인하여야 한다.

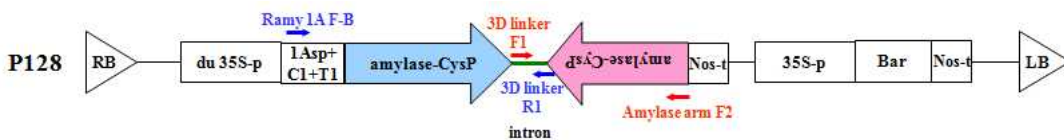


그림 12. 선발된 형질전환 식물체 genomic DNA PCR에 이용된 primers.

선발된 형질전환 캘러스로부터 genomic DNA를 추출한 후에 genomic DNA PCR amplification을 수행한 결과 pMYP128로 형질전환된 #123-9의 경우 2, 9, 12번 lines에서 원하는 크기의 밴드가 확인되었고 (그림 13), #265-4에서는 3번 line에서 원하는 크기의 밴드를



확인하였다 (그림 14).

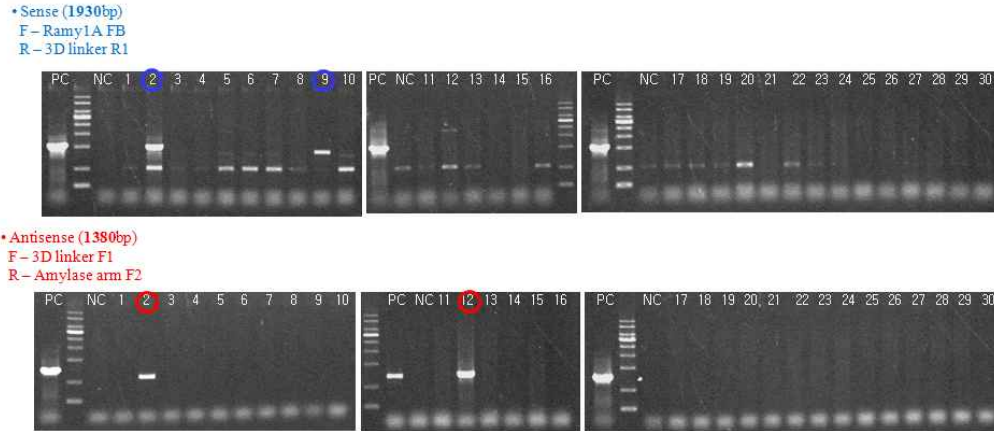


그림 13. #123-9 캘러스에 pMYP128의 형질전환 확인을 위한 genomic DNA PCR

(3) 항체의 발현 증진 분석을 위한 SDS-PAGE와 western blot analysis

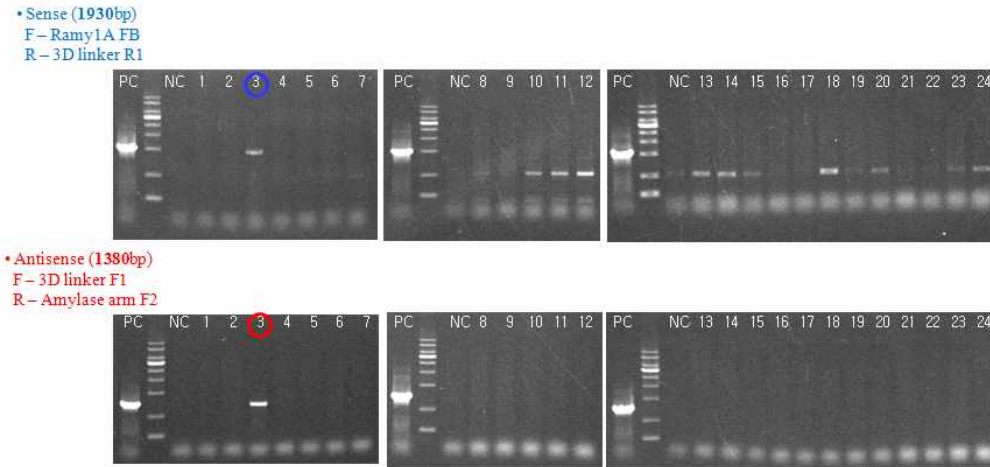


그림 14. #265-4 캘러스에 pMYP128의 형질전환 확인을 위한 genomic DNA PCR

Genomic DNA PCR 방법으로 목적 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체로 만든 식물세포현탁 배양에서 amylase의 발현 저해와 항체단백질의 발현 증가를 살펴보기 위해 식물세포 현탁배양을 구축하였고 식물세포 현탁배양 배지내로 분비된 단백질을 분석하였다.

식물세포 현탁배양에서 분비된 항체 단백질을 확인하기 위하여 항체단백질의 발현을 유도하기 위하여 당이 결핍된 배지에서 7일간 배양을 한 후에 수확한 배지를 이용하였음. 항체 단백질을 분석하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하여 분석한 결과 pMYV128로 형질전환된 #123-9의 경우 2, 9, 12번 lines과 #265-4의 경우 3번 line에서 amylase의 발현이 감소되었음을 확인하였고 항체단백질 발현의 증가를 살펴보기 위해 항체단백질에 특이적으로 결합하는 항체단백질을 이용하여 western blot analysis를 수행한 결과 control인 #123-9 또는 #265-4 보다 높은 발현을 보이는 형질전환 벼 캘러스는 확인하지 못하였다 (그림 15).



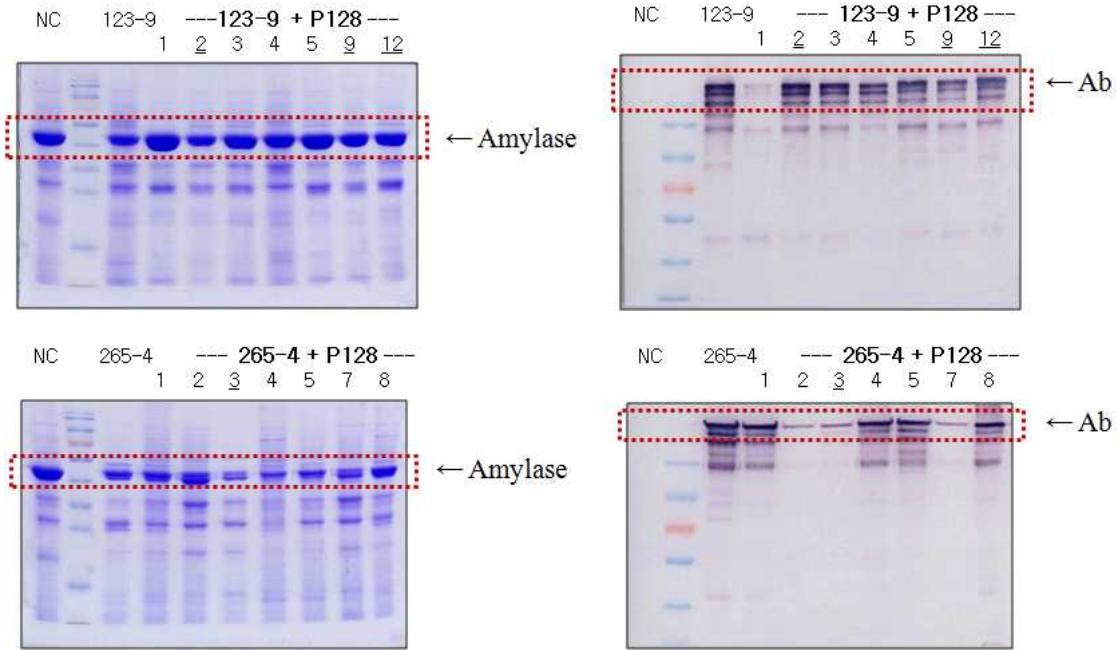


그림 15. Amylase와 항체 단백질의 발현을 분석하기 위한 SDS-PAGE와 western blot analysis

다. 항체유전자와 pMYP128의 동시 식물형질전환

(1) #123, #265 항체 유전자의 heavy chain, light chain, pMYP128의 동시 발현을 위한 형질전환

FimA 단백질에 대한 항체단백질의 고발현을 보이는 형질전환체를 대상으로 하여 pMYP128 plasmid를 가지고 형질전환을 수행한 결과 형질전환 효율이 낮아 결과를 분석하기 어려움을 보여 이를 개선하기 위하여 항체 heavy와 light chain 유전자와 pMYP128 유전자를 동시에 rice callus를 이용하여 bombardment 방법으로 벼의 callus에 형질전환 하였다.

항체유전자에 대해서 선발 마커로 hygromycin를, pMYP128에 대해서 선발 마커로 PPT를 포함하고 있는 배지에서 선발된 형질전환 캘러스들에 대해서 target 유전자의 도입을 확인하기 위하여 선발된 캘러스로부터 genomic DNA를 추출하여 genomic DNA PCR를 수행하였다.

#123과 #265의 heavy chain, light chain 그리고 pMYP128 plasmid의 sense와 anti-sense strand를 각각의 특이적인 primers를 이용하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. PCR amplification 결과 #123HC+LC+P128의 경우 #2, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 26번 lines에서 원하는 크기의 DNA 밴드가 확인되었고 (그림 16), #265HC+LC+P128에서는 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16번 lines에서 원하는 크기의 밴드를 확인하였다 (그림 17).

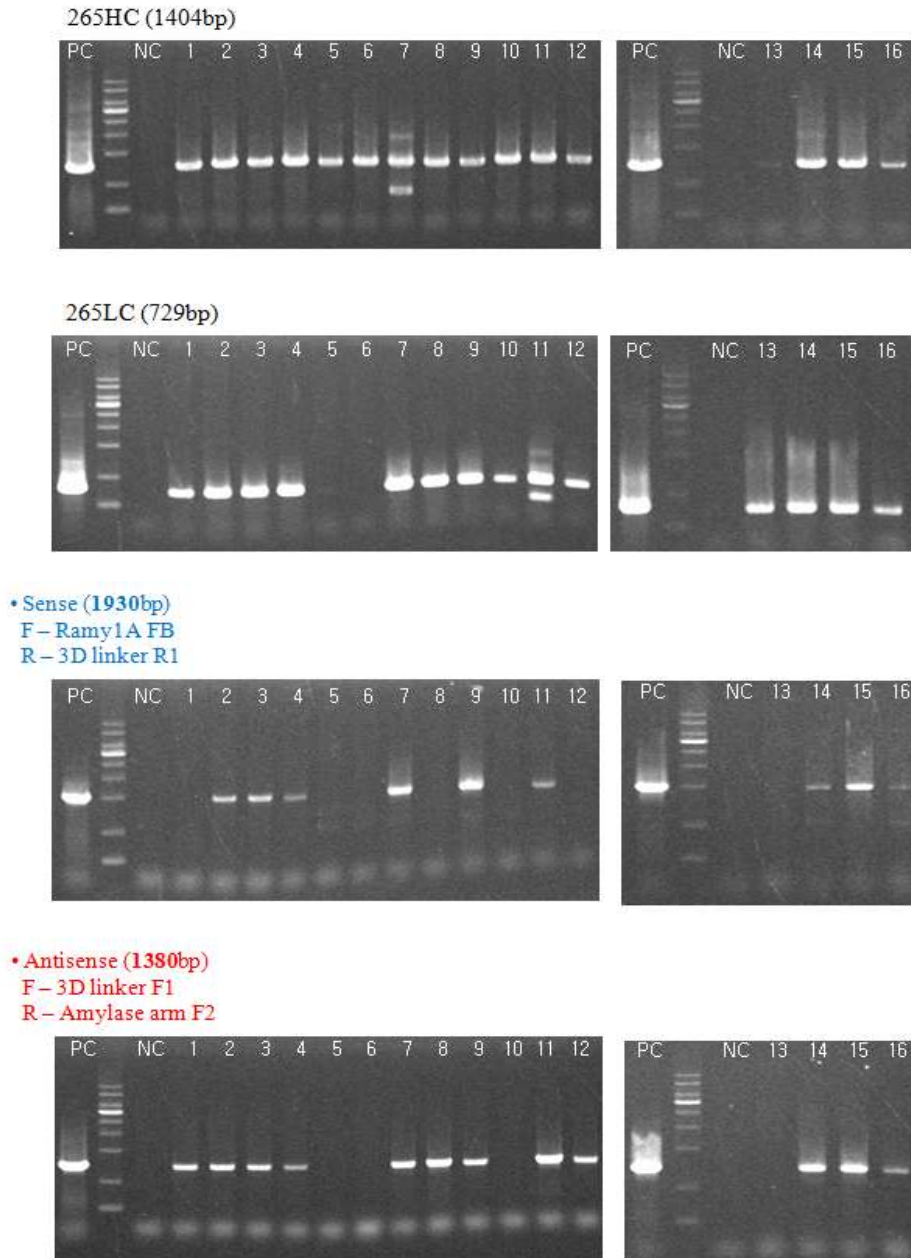


그림 17. #265HC+LC+P128 callus의 형질전환 확인을 위한 genomic DNA PCR

## (2) 항체 단백질의 발현 증진 분석

Genomic DNA PCR를 이용하여 유전자의 도입을 확인한 후에 항체단백질의 발현 증가, amylase와 proteinase 감소에 대한 분석을 하기 위하여 식물세포현탁 배양을 구축하였고 배지내로 분비된 단백질을 western blot과 ELISA분석을 수행하였다.

항체단백질의 발현을 확인하기 위하여 당이 결핍된 배지에서 7 일간 배양을 수행한 후에 분석을 하였다. #123 항체유전자로 형질전환된 경우에 western blot 분석결과 대조군으로 이용한 #123-9 (pMYP128로 형질전환되지 않은 형질전환 식물체)에서 확인된 항체 단백질의 크기와 발현 양상이 비슷함을 보여 항체단백질이 잘 발현 되었음을 확인하였다 (그림 18-a).

항체 단백질의 발현 정도를 대조군으로 이용한 #123-9와 비교하기 위하여 수행한 ELISA 정량 분석 결과 대조군인 #123-9 보다 높은 발현을 보이지 않았다 (그림 18-b).

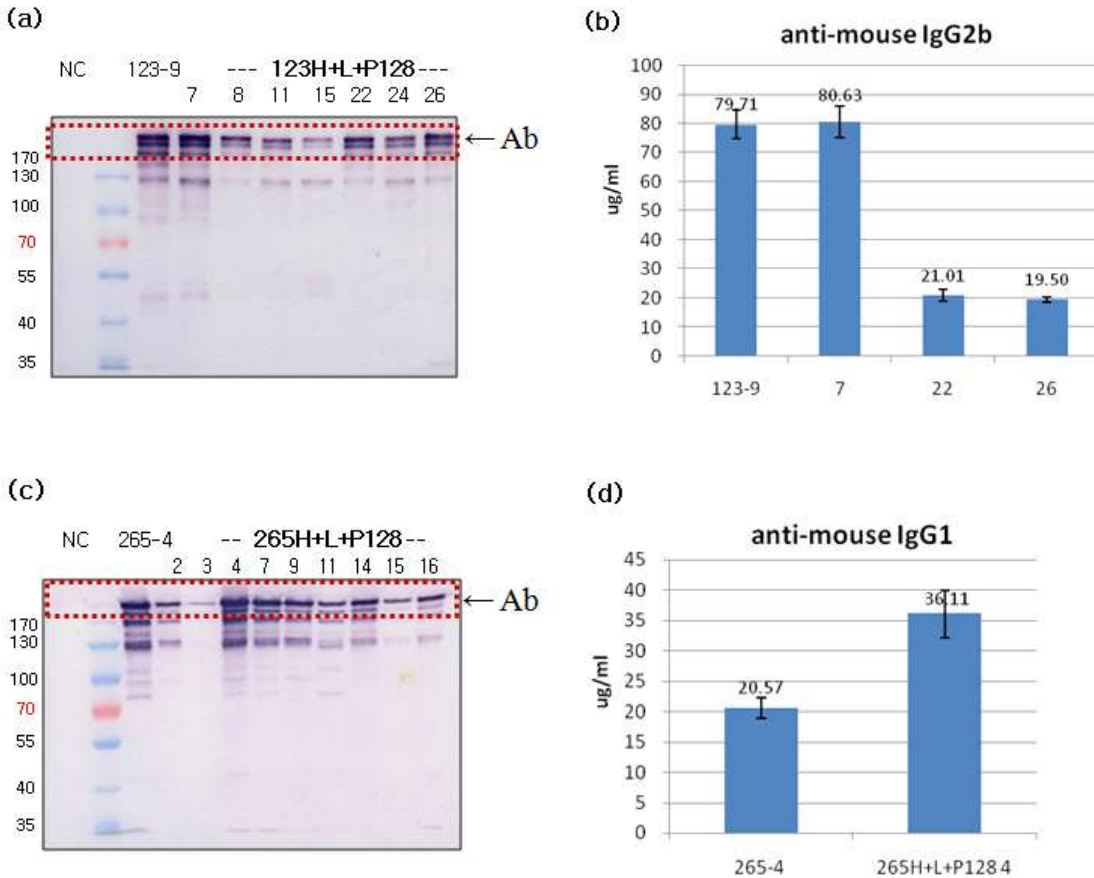


그림 18. #123과 #265 항체 발현 분석을 위한 western blot과 ELISA 정량

항체단백질의 발현을 확인하기 위하여 당이 결핍된 배지에서 7 일간 배양을 수행한 후에 분석을 하였다. #265 항체유전자로 형질전환된 경우에 western blot 분석결과 대조군으로 이용한 #265-4 (pMYP128로 형질전환되지 않은 형질전환 식물체)에서 확인된 항체 단백질의 크기와 발현 양상이 비슷함을 보여 항체단백질의 증가를 확인하지 못하였다 (그림 18-c).

항체 단백질의 발현 정도를 control로 이용한 #265-4(without pMYP128)와 비교하기 위하여 수행한 ELISA 정량 분석 결과 4번 line에서 control인 #265-4 보다 약 1.8 배 높은 발현을 보였다 (그림 18-d).

### (3) 단백질 분해효소 저해제 C1-T1의 발현과 amylase 와 protease의 발현 억제 분석

단백질 분해효소 저해제인 C1-T1 유전자의 발현을 확인하기 위하여 당이 결핍된 배지에서 7 일간 배양을 수행한 후에 분석을 하였음. 형질전환 식물세포배양에서 C1-T1 단백질에 대한 항체를 이용하여 수행한 western blot 분석 결과 음성 대조군인 #123-9와 #265-4에서는 발현이 되지 않은 것을 확인하였고 pMYP128로 형질전환된 #123의 경우 8, 11, 22, 24,

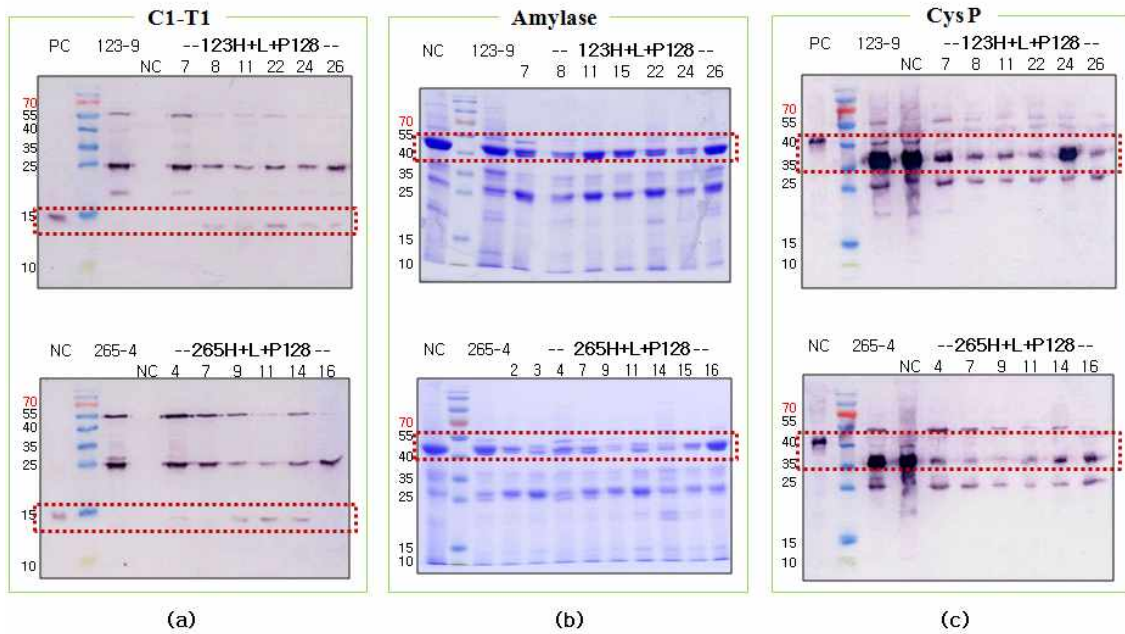


그림 19. C1-T1유전자의 발현과 amylase와 protease의 발현 억제 분석

26번에서, #265의 경우 4, 9, 11, 14번에서 C1-T1 단백질에 밴드를 확인하였다 (그림 19-a).

형질전환 식물체에서 pMYP128의 siRNA에 의한 amylase의 발현 감소를 SDS-PAGE 전기영동한 후 염색한 결과 control #123-9와 #265-4에 비해서 pMYP128로 형질전환된 #123의 경우 8, 22와 24번에서, #265의 경우 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14, 15와 16에서 배지 내에 분비된 amylase의 감소를 보였다 (그림 19-b).

형질전환식물체에서 pMYP128의 siRNA에 의한 cysteine proteinase의 발현감소를 CysP 단백질에 대한 항체를 이용하여 대조군인 #123-9와 #265-4에 비교하여 분석한 결과 #123의 경우 7, 8, 11, 22와 26에서, #265의 경우 4, 7, 9, 11, 14와 16에서 CysP 단백질의 발현 감소를 확인하였다 (그림 19-c).

#### (4) Cysteine proteinase activity assay

CysP 단백질의 발현을 western blot 분석 방법으로 확인한 후에 CysP 단백질 분해효소 활성을 분석하기 위하여 사용한 분석 방법은 Barrett and Kirschke (Methods Enzymol. 1981;80 535-561)을 참고하였다. Z-Arg-Arg-pNA · 2HCl을 substrate로 하여 형질전환 식물세포 현탁배양에서 발현되어 분비된 cysteine proteinase의 활성을 측정하였다. 그 결과 음성 대조군인 형질전환 되지 않은 것보다 #123의 경우 7, 8와 11번에서 각각 81, 85와 84%로 낮아졌고 #265의 경우 4, 7과 9번에서 각각 71, 88과 89%로 낮아진 것으로 보아 pMYP128에 의해서 cysteine proteinase의 활성이 낮아진 것을 확인하였다 (그림 20).

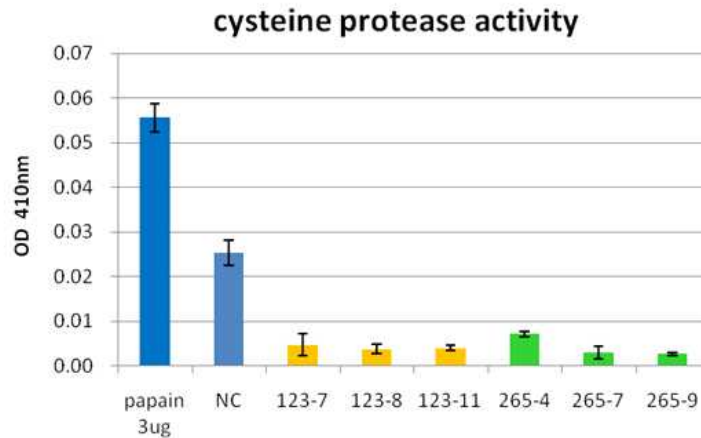


그림 20. Cysteine protease activity assay

다. 항체유전자와 pMYP128의 동시 식물형질전환 재수행

(1). 벼의 형질전환 재수행

#123, #265와 pMYVP128를 가지고 동시에 형질전환을 수행하여 항체단백질을 고발현 하는 형질전환체에 형질전환한 것에 비해 더 많은 형질전환 식물체를 얻어서 분석을 하였으나 pMVP128에 의해서 amylase 분비의 감소, C1-T1 단백질의 발현 및 분비, CysP 단백질 분해효소의 감소 등을 확인하였으나 효율적으로 항체 단백질의 증진을 확인하지 못하여 형질 전환을 계속 수행하였다.

Hygromycin B와 PPT를 선발마커를 포함하고 있는 선발배지에서 선발한 형질전환체의 genomic DNA를 추출하여 genomic DNA PCR amplification 결과 #123HC+LC+P128의 경우 2, 3, 4, 13-15, 17, 20, 21, 24, 25, 30, 32, 35, 39, 42, 51, 53, 58-65, 67, 69, 71, 72번 lines에서 원하는 크기의 DNA 밴드를 확인하였고 (그림 21), #265HC+LC+P128 에서는 6-10, 13-15, 19, 21, 22, 26-30, 33-37, 39, 40, 48, 54, 59-61, 63, 66, 67, 69, 72번 lines에서 원하는 크기의 DNA 밴드를 확인하였다 (그림 22).



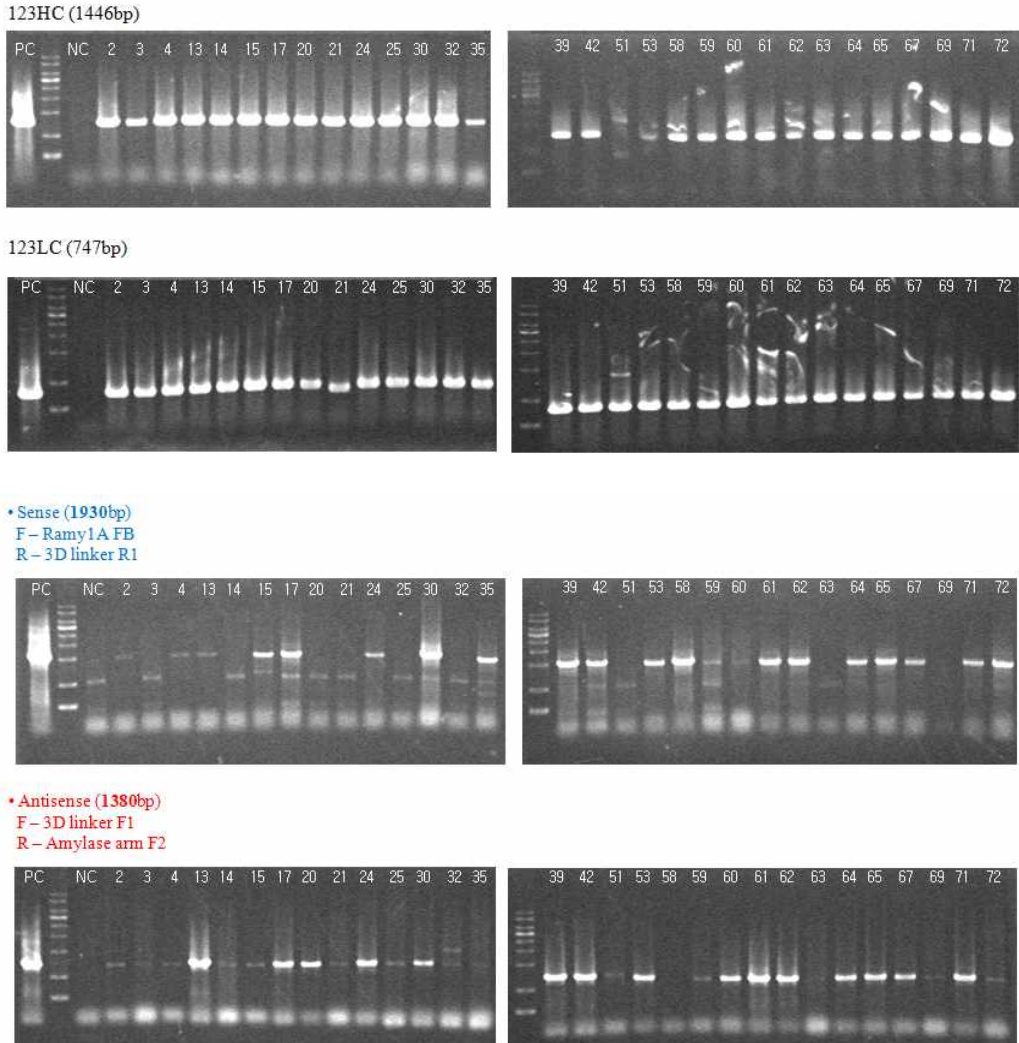


그림 21. #123HC+LC+P128 캘러스의 genomic DNA PCR II

향체 유전자의 도입을 확인한 후에 향체 단백질의 발현 증가를 살펴보기 위해 western blot 분석과 ELISA를 수행하였다. Genomic DNA PCR로 향원유전자의 도입이 확인된 lines에 대해서 식물세포 현탁배양을 구축하기 앞서 먼저 형질전환 캘러스를 이용하여 고체 배지에서 당이 결핍된 조건에서 7일간 배양하여 향체단백질의 발현을 유도하고 향체단백질의 발현을 확인하였다. #123 향체 단백질의 western blot 분석결과 발현된 향체단백질이 대조군인 #123-9와 비슷한 결과를 얻어 향체단백질이 발현되었음을 확인하였고 (그림 23-a,c), 발현된 향체단백질의 양을 비교하기 위하여 ELISA 방법을 이용한 결과 #123-9 보다 높은 발현을 보이는 line은 없었다 (그림 23-b,d).

#265 향체 단백질의 western blot 분석결과 발현된 향체단백질이 대조군인 #265-4와 비슷한 결과를 얻어 향체단백질이 발현되었음을 확인하였고 (그림 24-a,c), 발현된 향체단백질의 양을 비교하기 위하여 ELISA 방법을 이용한 결과 고발현을 보이는 #265H+L+P128의 48번 형질전환 캘러스에서 약 2.2 배 정도의 높은 발현을 보였다 (그림 24-b,d).

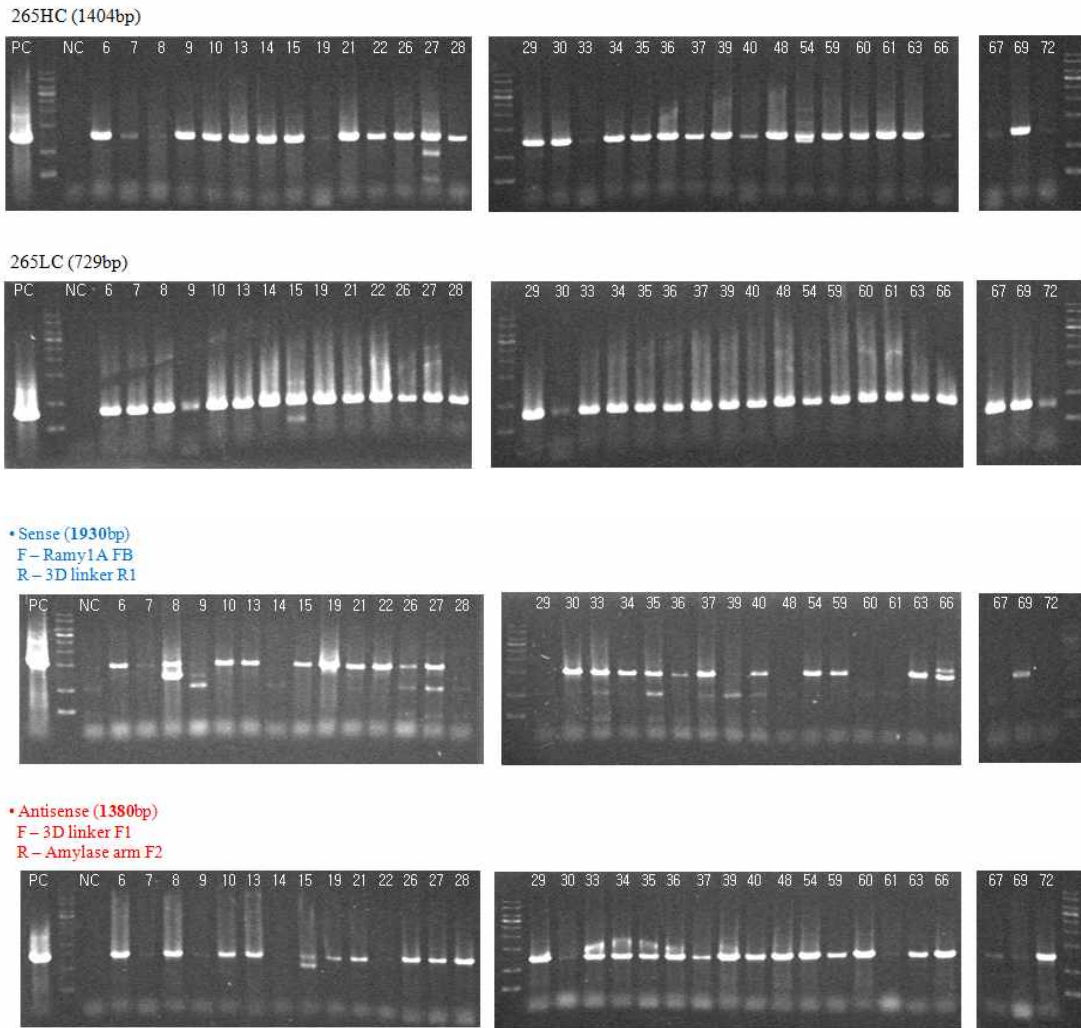


그림 22. 265HC+LC+P128 callus의 형질전환 확인을 위한 genomic DNA PCR II

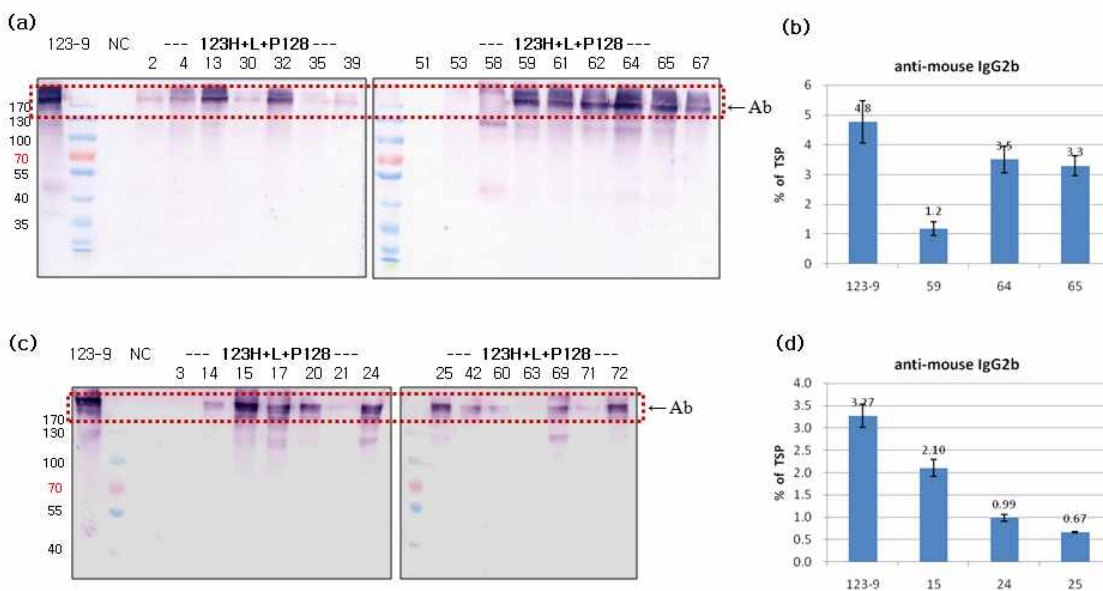


그림 23. #123 항체 발현 분석을 위한 western blot과 ELISA 정량



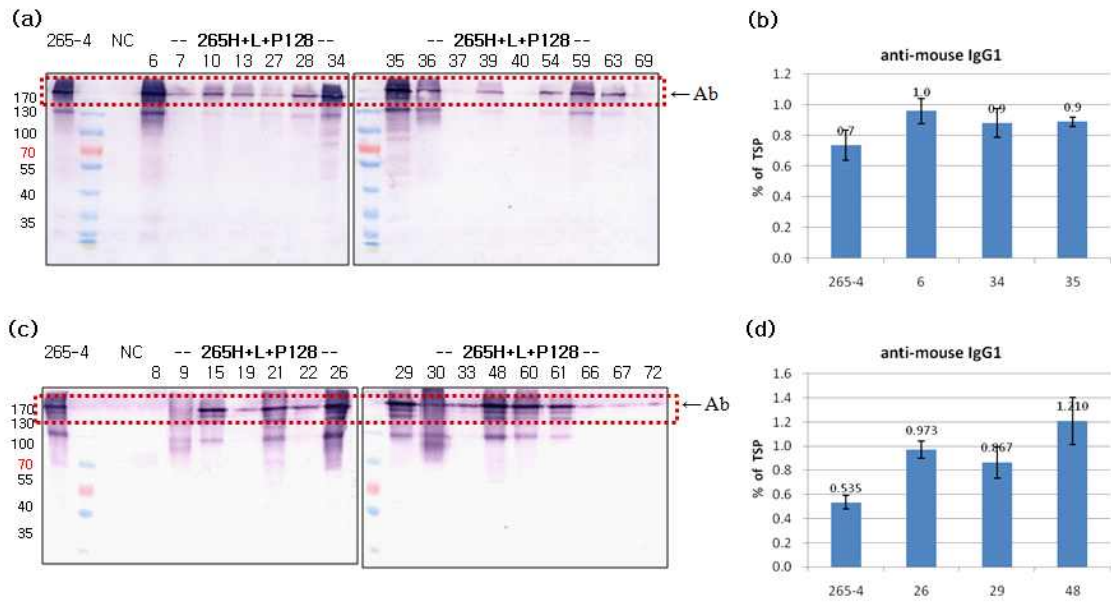


그림 24. #265 항체 발현 분석을 위한 western blot과 ELISA 정량

(2) 식물세포 현탁배양에서 항체의 발현 증진 분석

항체의 발현 증가를 살펴보기 위해 callus에서 western blot과 ELISA를 수행 후 나온 결과 #123HC+LC+P128에서는 15, 24, 25, 59, 64, 65번 lines에서, #265HC+LC+P128에서는 첫 번째로 형질전환을 수행한 4번, 두 번째 형질전환에서 얻은 6, 26, 29, 35, 48번 lines에서 고 발현을 확인하여 이들을 이용하여 액체배지(20ml)에서 식물세포 현탁배양을 확립하고 당결핍 조건에서 7일간 배양을 한 후에 배지로 분비된 항체단백질의 발현을 확인하고자 western blot 분석을 수행하였다.

Western blot 분석 결과 대조군인 #123-9 보다 #123HC+LC+P128 형질전환체 15, 24번 lines에서 높은 발현을 보였다. #265 항체단백질의 western blot 분석 결과에서는 #265HC+LC+P128 형질전환체 4, 48번 lines에서 대조군인 #265-4 보다 높은 발현을 보였다 (그림 25, 26).

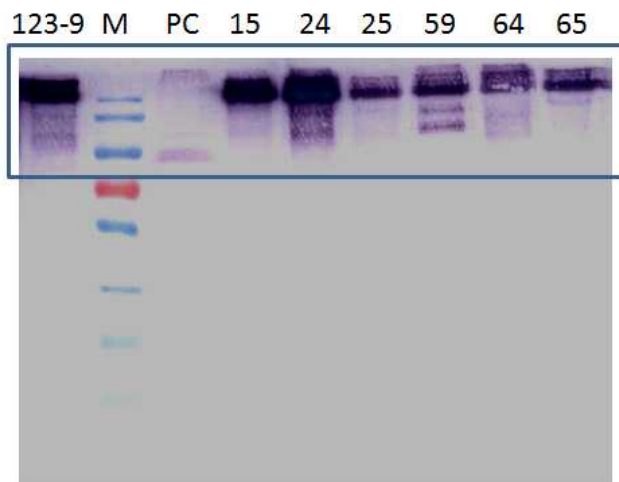


그림 25. #123 항체단백질 발현 분석을 위한 western blot 분석

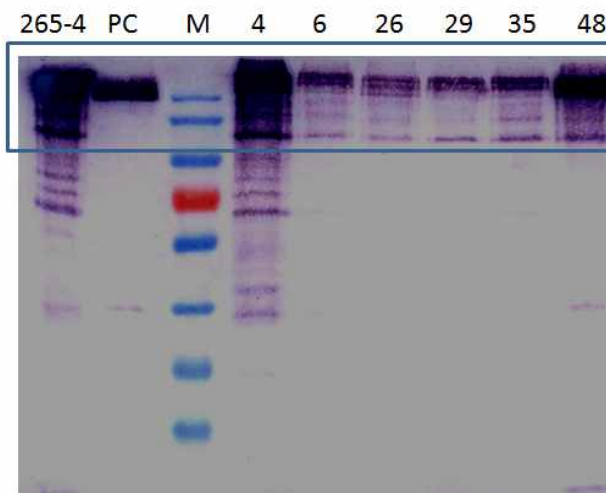


그림 26. #265 항체단백질 발현 분석을 위한 western blot 분석

(3) 단백질분해 효소 저해제 C1-T1의 발현 분석

형질전환 식물체에 의한 식물세포 현탁배양에서 P128에 의한 proteinase inhibitor인 C1-T1의 발현 분석하였음. 형질전환 식물세포현탁배양에서 액체배지로 분비된 C1-T1의 발현

을 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 western blot 분석으로 확인하였다. #123HC+LC+P128 형질전환에서는 15, 24, 64, 65번 lines에서, #265HC+LC+P128 형질전환체에서는 4, 26, 35, 48번 lines에서 C1-T1이 발현되었음을 확인되었고 대조군인 #123-9와 #265-4에서는 C1-T1이 detected 되지 않았다 (그림 27, 28).

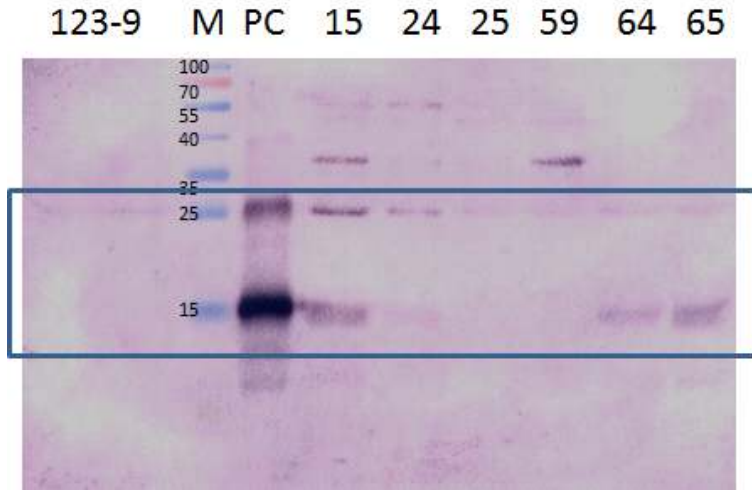


그림 27. #123HC+LC+P128 식물세포현탁 배양에서 C1-T1 단백질 발현 분석을 위한 western blot 분석

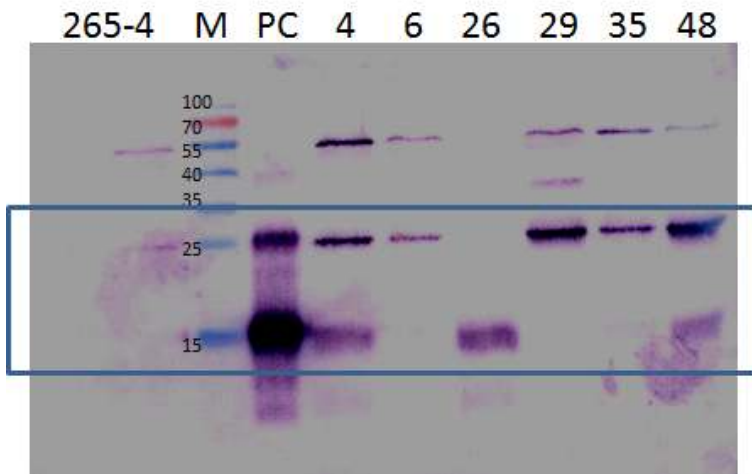


그림 28. #265HC+LC+P128 식물세포배양에서 C1-T1 단백질 발현 분석을 위한 western blot 분석

#### (4) Cysteine protease의 발현 억제 분석

siRNA에 의한 cysteine protease의 발현 감소를 분석하였음. 형질전환체를 이용한 식물세포 현탁배양에서 당결핍조건에서 7일간 배양을 한 후에 배지로 분비된 cysteine protease의 분비가 대조군인 #123-9와 #265-4에 비해 #123HC+LC+P128의 경우 15, 24, 64, 65번 lines에서, #265HC+LC+P128의 경우엔 4, 6, 35, 48번 lines에서 감소했음을 확인하였다 (그림 29, 30).

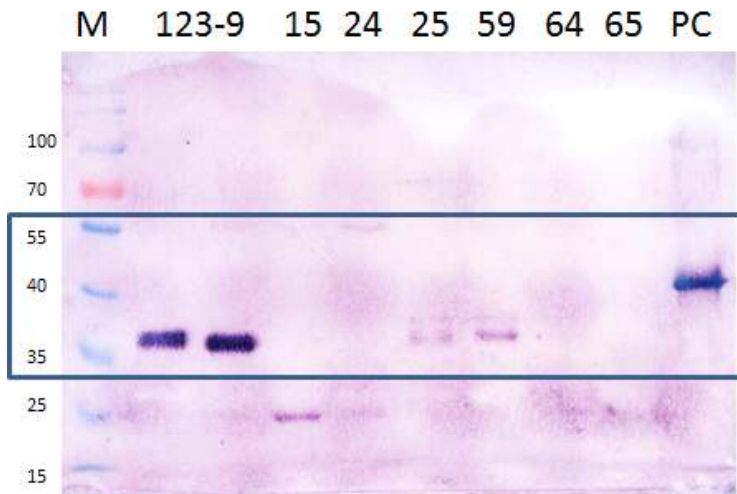


그림 29. #123HC-LC-P128 식물세포현탁배양에서 cysteine protease 분비 억제 분석을 위한 western blot 분석

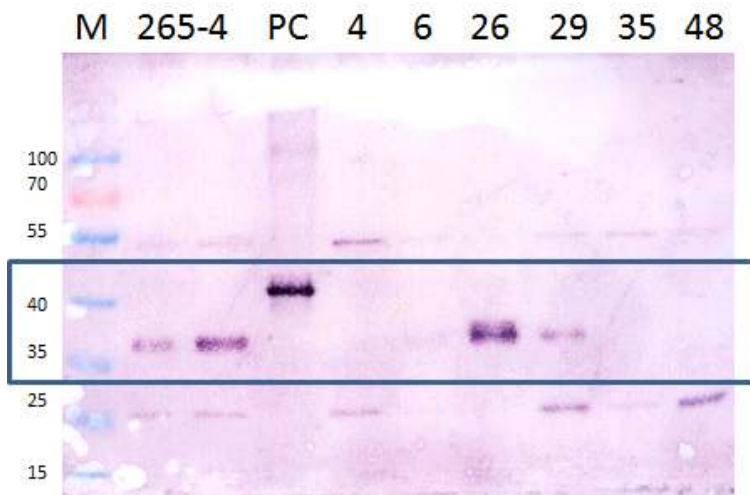


그림 30. #265HC-LC-P128 식물세포현탁배양에서 cystein protease 분비 억제 분석을 위한 western blot 분석

(5) Amylase의 발현 억제 분석

siRNA에 의한 amylase의 분비 감소를 분석하였음. 형질전환체를 이용한 식물세포 현탁배양에서 당결핍조건에서 7 일간 배양을 한 후에 배지로 분비된 amylase의 분비가 #123HC+LC+P128의 경우 대조군과 비교하여 15, 24, 64, 65번 lines에서, #265HC+LC+P128의 경우 4, 35, 48번 lines에서 감소했음을 확인하였다 (그림 31, 32).

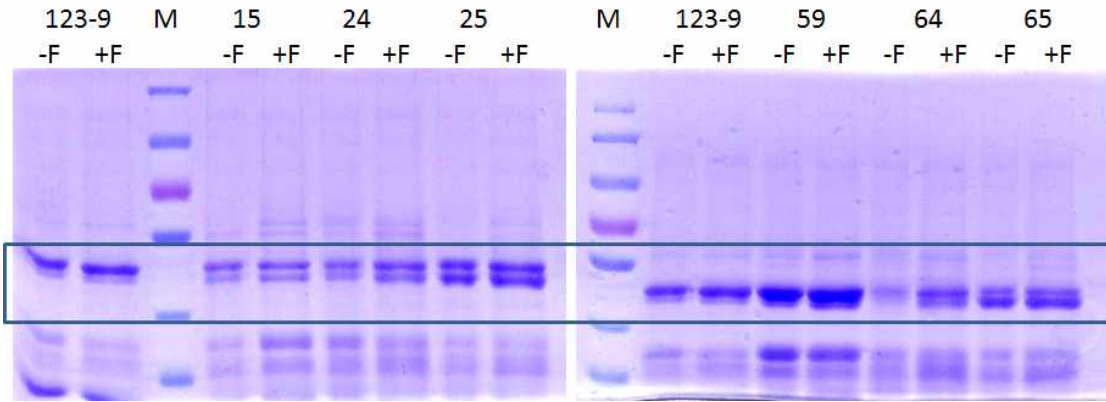


그림 31. 식물세포 현탁배양에서 amylose 발현 억제 분석을 위한 western blot 분석

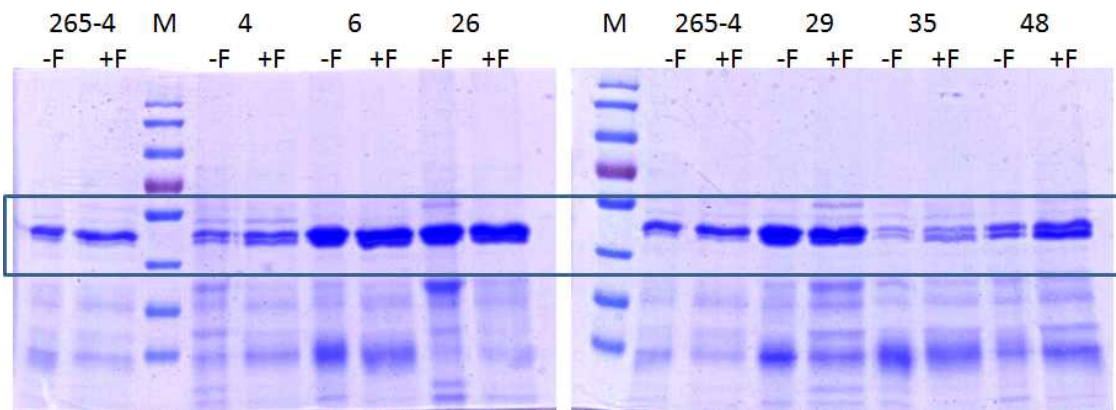


그림 32. 식물세포 현탁배양에서 amylose 발현 억제 분석을 위한 western blot 분석

(6) 항체 단백질의 증진에 대한 분석

Amylase와 Cys protease에 대한 siRNA 기법을 이용하여 항체단백질의 발현 및 분비 증진을 확인하기 위하여 ELISA를 수행하였다. #123 항체 단백질에 대한 ELISA 결과 (그림 33) siRNA에 의해 amylose와 Cys proteinase 감소가 없는 대조군과 비교하여 #123HC+LC+P128에서 5 배 정도 높은 발현을 보였다.

## 2. 항체의 기능 확인

### 가. 항체를 생산하는 벼 세포 현탁 배양에서 고발현 조건 확립

치주질환 균주인 *P. gingivalis*의 FimA에 대한 항체 단백질은 벼의 현탁배양을 이용하여 생산하기 위하여 벼에서 단백질의 고발현 체계로 알려진 amylase 3D promoter system을 이용하여 sugar starvation 조건에서 항체 단백질의 발현을 유도하여 생산하고 있다.

항체 단백질을 생산하는 벼 캘러스 #123-9와 #265-4, 6, 8 lines을 항체 단백질 발현 유도시 sucrose free induction 조건을 대신할 대체 탄소원과 삼투성 제제를 넣어줌으로써 항체 생산량을 증가시키고자 하였다. 항체 단백질의 발현을 유도하기 위하여 sugar가 없는 배지에 fumaric acid, succinic acid, malic acid, NaCl을 60 mM의 농도로 7일간 배양을 하고 culture media를 수확하여 ELISA로 정량을 수행한 결과 #123-9 (mouse IgG2b) line에서 약 10배의 발현증가를 보였고, #265-4, 6, 8 (mouse IgG1) line들은 fumaric acid와 succinic acid에서 약간의 증가를 보이는 것으로 나타났다 (그림 33).

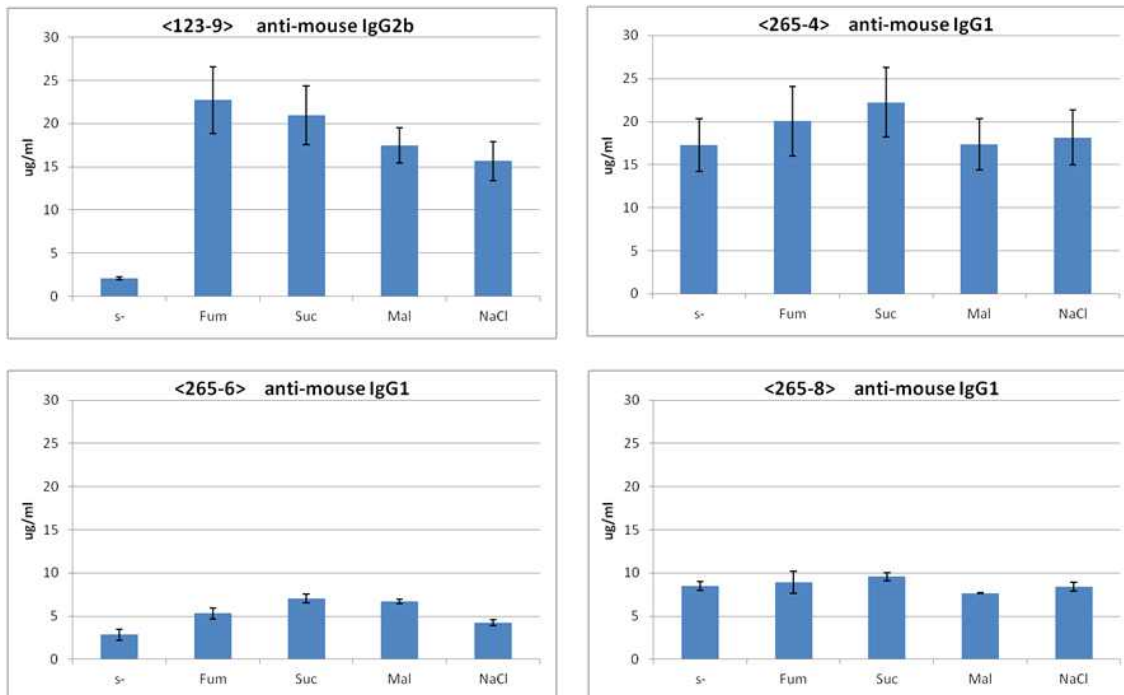


그림 33. 대체 탄소원과 삼투성 제제를 사용한 항체의 고발현 조건 확립

### 나. 탄소원 대체제에 의한 항체단백질 발현의 증진

식물세포 현탁배양을 이용한 항원단백질 생산에 있어서 현재 사용하고 있는 rice amylase 3D promoter의 induction에 당결핍 조건을 이용하여 한 번 항원단백질을 유도한 후에 식물세포를 재사용하기 어렵기 때문에 이를 개선하기 위한 방법으로 sucrose 대신에 탄소원 대체제인 fumaric acid를 60 mM로 첨가하여 항원단백질의 발현을 확인하여 보았다. 대조군인 #123-9에서는 배양 배지 부피 20 ml에서 100 ml로 증가 시켰을 때에 배지에 분비된 항체단백질의 발현이 현저하게 감소함을 예비 실험에서 확인하였다 (그림 34). #123HC+LC+P128 형질전환 식물세포배양에서 #123-9와 다르게 100 ml 배지에서 현저히 많은 양의 분비된 항원단백질이 western blot 분석에 의해서 확인되었고 또한 60 mM fumaric acid가 첨가된 100 ml 배지에서 첨가되지 않은 배지에서 보다 현저히 분비된 항원단백질이



많음을 확인하였다 (그림 35).

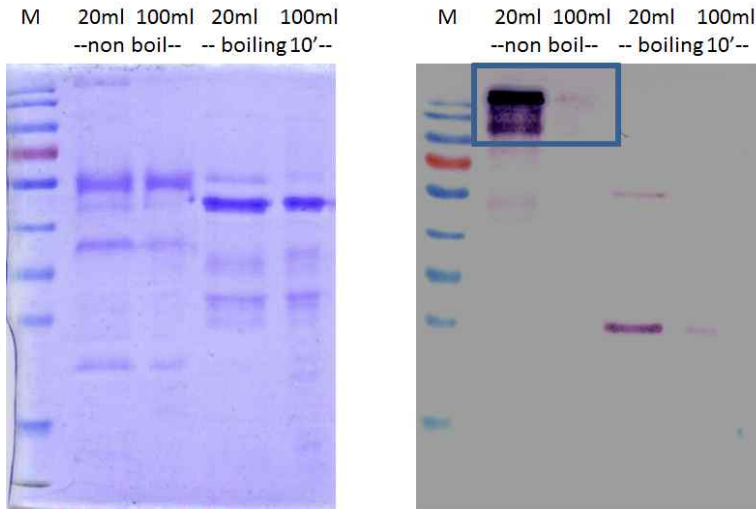


그림 34. #123-9 형질전환 식물세포 현탁배양에서 항체단백질 발현비교를 위한 SDS-PAGE & western blot ( 60 mM fumaric acid ).

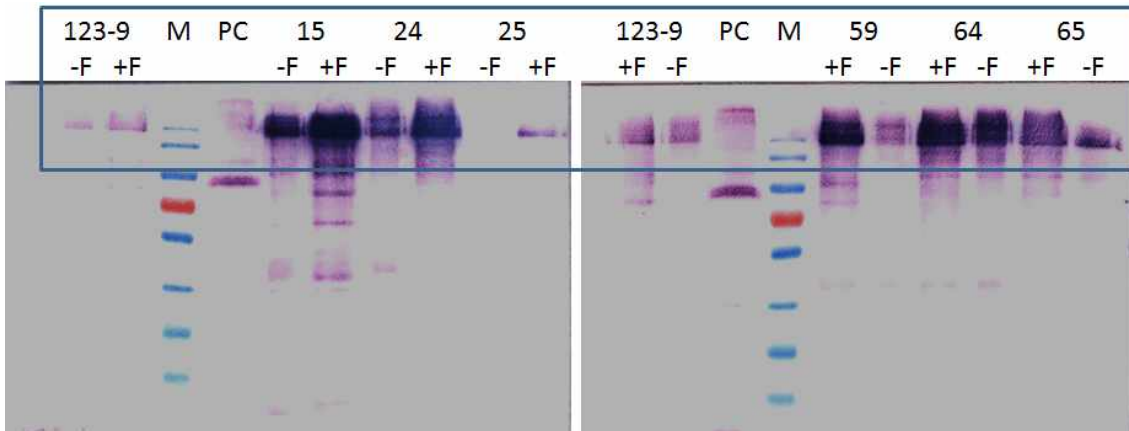


그림 35. 탄소원 대체제를 이용한 #123 항체단백질 발현 분석을 위한 western blot (+F : +fumaric acid 60 mM)

#265HC+LC+P128 형질전환 식물세포 현탁배양에서는 대조군인 #265-4는 부피증가와 관련없이 항체발현이 높음을 확인하였다. #265HC+LC+P128 형질전환체 식물세포 현탁배양에서도 #123 항체와 같이 fumaric acid 가 첨가된 배지에서 항원단백질의 발현이 향상 되었음을 확인하였다 (그림 36).

#123HC+LC+P128에서는 15, 24, 59, 64번 lines에서 (그림 35), #265HC+LC+P128에서는 첫 번째 형질전환을 수행한 4번, 두 번째 형질전환에서 얻은 6, 35, 48번 lines에서 높은 발현을 확인하였다 (그림 35, 36).



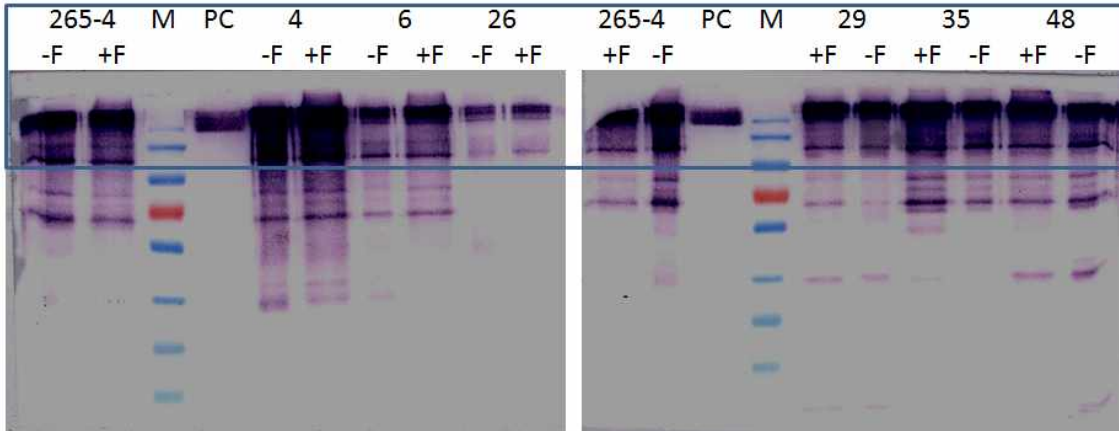


그림 36. 탄소원 대체제를 이용한 #265 항체단백질 발현 분석을 위한 western blot 분석 (+F : 60 mM fumaric acid)

다. 현탁배양에서 생산된 항체 분리 및 기능 분석

(1) 벼 캘러스로부터 생산된 항체의 정제

Rice amylase 3D promoter 조절 하에 있는 항체단백질을 생산하기 위하여 sucrose가 없는 조건에서 발현을 유도한 후에 배양액을 거름종이로 filtration하여 soup을 분리한 다음 냉동을 시켜 동결건조하고 PBS buffer에 녹인 다음 PBS buffer로 투석을 하였다.

투석을 한 후에 배양액을 Protein G column (GE Healthcare)을 장착한 BioLogic LP, chromatography system (BIO-RAD)을 이용하여 정제하였다. 방법은 간략하게 다음과 같음. 먼저 column을 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 washing 하였다. 그 다음 sample을 loading하고 다시 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 washing 하였다. Sample를 washing한 후에 항체 단백질을 분리하기 위하여 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7)를 이용하여 elution 하였다. 항체단백질을 elution 한 후에 용액의 pH를 중성으로 맞추기 위해 미리 준비 해놓은 1 M Tris-HCl (pH 9.0)을 1/10 volume 넣은 tube에 elute를 섞었다. 이렇게 정제한 항체를 fraction 별로 SDS-PAGE 하여 확인하였다(그림 37-40). Protein G column을 이용하여 분리한 후에 항체단백질을 확인하기 위하여 western blot 분석을 수행한 결과, #123-9는 fraction 7부터 11까지에서 항체 단백질이 관찰되어졌고 #265-4, 6, 8에서는 fraction 7에서 12까지에서 항체가 assembly된 형태로 순수하게 분리되었음을 확인하였다.

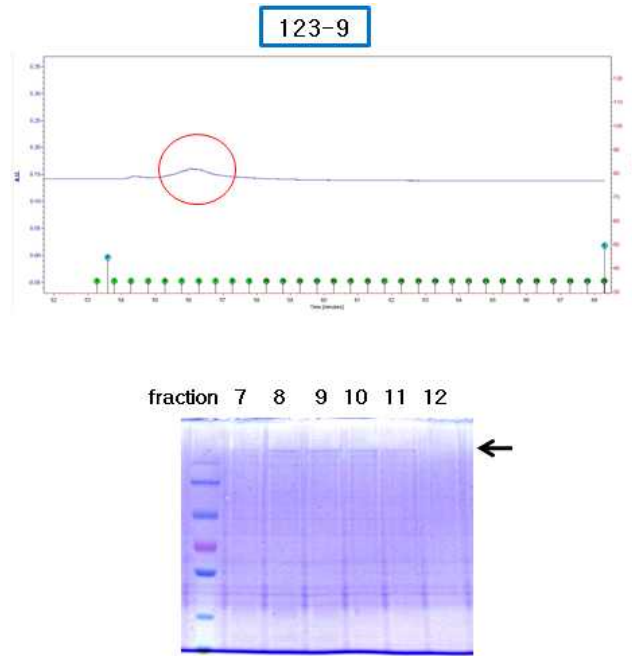


그림 37. 현탁배양 #123-9 line의 FimA 항체 정제 후 SDS-PAGE

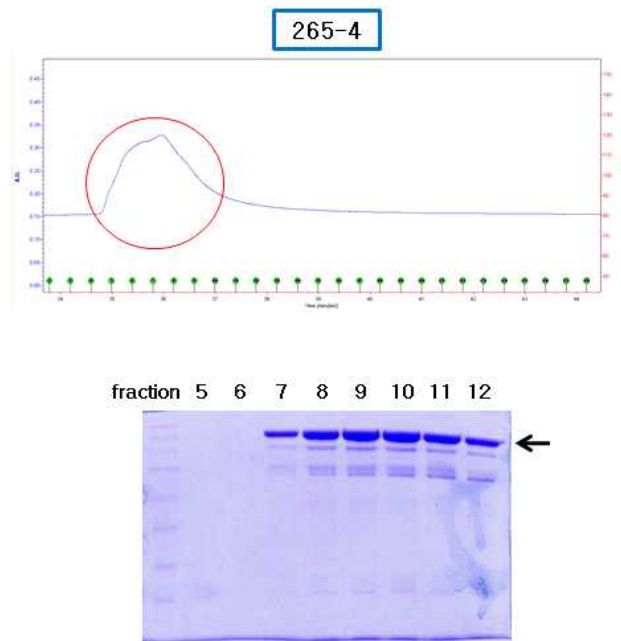


그림 38. 현탁배양 #265-4 line의 FimA 항체 정제 후 SDS-PAGE

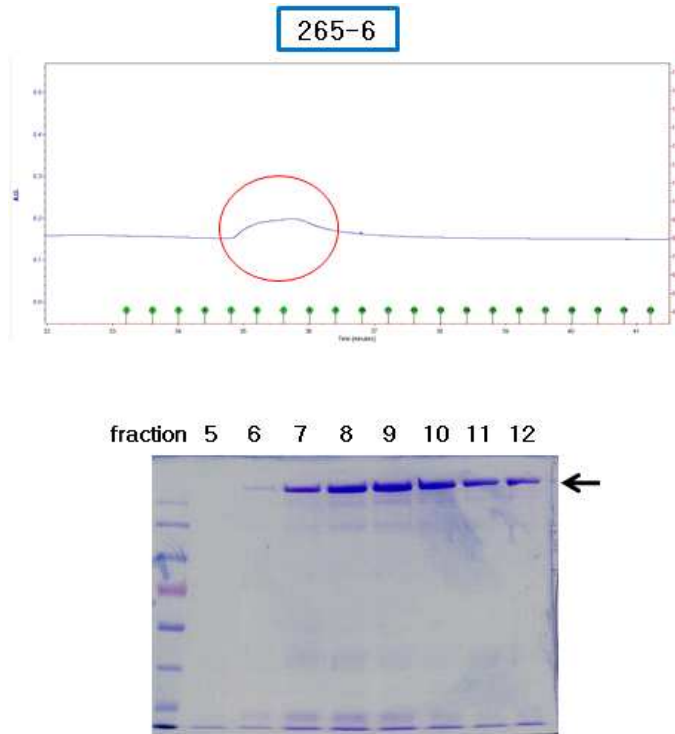


그림 39. 현탁배양 #265-6 line의 FimA 항체 정제 후 SDS-PAGE

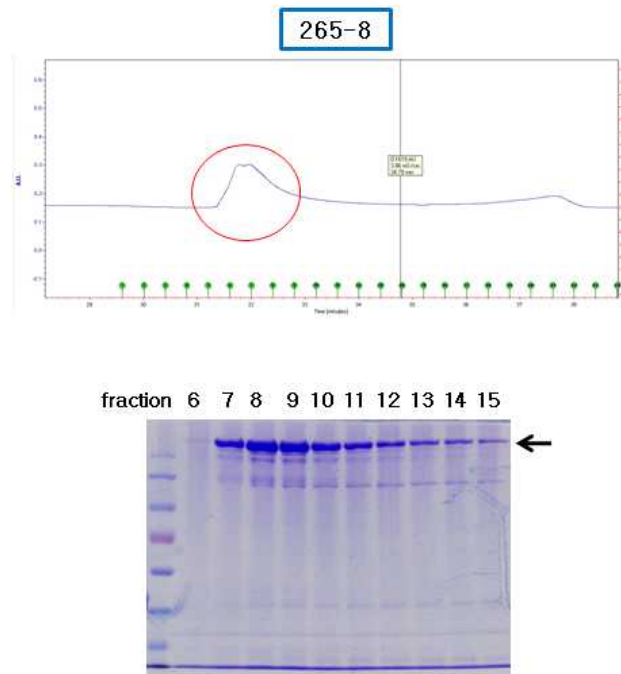


그림 40. 현탁배양 #265-8 line의 FimA 항체 정제 후 SDS-PAGE

Protein G column을 이용하여 분리한 항체단백질의 양을 확인하기 위하여 ELISA를 이용하여 항체단백질을 정량하였음. #123-9에서 분리된 항체 단백질은 mouse IgG2b이므로 anti-IL-8 항체 단백질을 control로 이용하여, #265-4, 6, 8에서 분리된 항체 단백질은 mouse

IgG1이므로 anti-TNF 항체단백질을 control로 이용하여 정량한 결과 #129-9 항체단백질은 19.59 ug/ml, #265-4, 6, 8 lines에서 분리된 항체 단백질은 1188, 320, 920 ug/ml의 농도로 확인하였다 (그림 41).

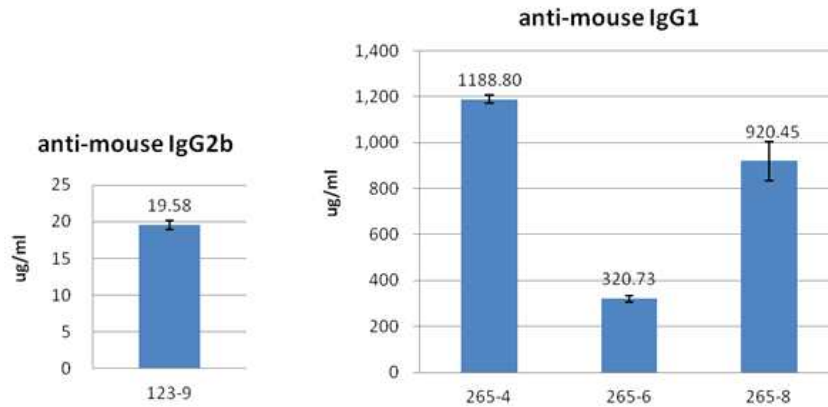


그림 41. 현탁배양에서 분리정제한 항체단백질의 정량

Protein G 를 이용하여 순수분리하기 전에 식물세포 현탁배양액 부피당 최종 항체 단백질의 생산량은 #123-9 line은 180 ug/L, #265-4 line은 20 mg/L, #265-6은 1.5 mg/L, #265-8은 2.5 mg/L을 보였다.

(2) 현탁배양에서 발현된 FimA 항체의 *P. gingivalis*의 부착에 대한 억제 효능 실험

식물세포 현탁배양으로부터 정제된 FimA 항체가 saliva-coated hydroxyapatite bead (HA)에 *P. gingivalis*의 부착을 저해하는지를 알아보기 위해 억제효능 실험을 수행하였음. #123 항체 단백질의 경우, hybridoma cell 배양액으로부터 분리한 항체는 50과 25 ug/ml에서 49와 38% 정도의 저해를 보인 반면 식물현탁배양에서 분리된 #123-9 항체는 32와 21%의 저해를 보였음. #265 항체의 경우에는, hybridoma cell 배양액에서 분리한 항체가 50과 25 ug/ml에서 52와 21%의 저해를 보였고 식물세포에서 분리된 항체, #265-4는 25와 23%, #265-6은 35와 21%, #265-8은 43와 29%의 저해를 보임으로서 베타 켈러스 현탁배양으로부터 정제한 FimA 항체도 hybridoma cell에서 분리된 항체와 비교하여 *P. gingivalis*의 부착에 대해 저해하는 것을 알 수 있었다 (표 1).

표 1. FimA 항체의 *P. gingivalis*의 부착에 대한 억제효능 실험

Antibody	Final conc. (ng/ml)	Inhibition (%)
123 Hybridoma cell	50	49.79 ± 5.00
	25	37.76 ± 3.09
265 Hybridoma cell	50	51.81 ± 2.17
	25	40.95 ± 3.30
123-9 Rice	50	31.94 ± 6.85
	25	21.27 ± 3.64
265-4 Rice	50	25.16 ± 1.80
	25	23.81 ± 1.68
265-6 Rice	50	35.81 ± 6.57
	25	21.33 ± 3.15
265-8 Rice	50	43.92 ± 5.31
	25	29.10 ± 3.08

(3) 식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 invasion assay

항체단백질을 생산하는 식물세포배양에서 분리된 항체단백질의 KB epithelial cell에 대한 치주균인 *P. gingivalis*의 세포 내 침투에 대한 억제효능을 분석하였다. 먼저 항체단백질을 25, 50, 100 ug/ml의 농도로 37°C에서 한 시간 동안 *P. gingivalis*과 같이 반응을 시키고, 이를 KB cell에 4시간 처리하여 치주균이 KB cells 내로 유입되도록 하였다. 그 다음 항생제인 metronidazole을 100 ug/ml의 농도로 한 시간 동안 처리하여 세포 밖에 부착되어있는 균을 제거하고 세포 안에 침투된 균만을 모은 후 단계적으로 희석하여 고체배지에 혐기배양조건으로 배양을 하였다. 5일간 배양한 후 콜로니 수를 카운팅 한 결과 항체를 처리하지 않은 경우에는 invasion efficiency가 12.57이 나왔고 positive control로 사용한 #265 hybridoma cell 배양액으로부터 정제한 항체를 처리한 경우는 10.03 (20 ug/ml), 9.00 (50 ug/ml) 그리고 6.65 (100 ug/ml)를 보인 반면 식물에서 생산된 #265 항체를 처리한 것은 8.7 (20 ug/ml), 6.15 (50 ug/ml) 그리고 6.34 (100 ug/ml)를 보여 control에 비해 낮은 수치를 보였고 또한 농도가 높을 수록 낮은 수치를 보였다. 이 결과로 식물세포 현탁배양으로부터 정제한 항체단백질이 치주균의 세포 내 침투 능력을 억제하는 것을 알 수 있었다 (그림 42).

(4) 식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 phagocytosis assay

식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 phagocytosis assay를 수행하기 위하여 mouse의 복수로부터 double density gradient 방법으로 neutrophil을 분리하였고, 항체로 opsonization시킨 *P. gingivalis*의 phagocytosis 정도를 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. *P. gingivalis*의 형광표지는 60°C에서 30분간 heat killing 시킨 후 1 mg/ml 농도의 FITC를 37°C에서 30분간 처리하였다. 항체의 opsonization은 20 ug/ml의 농도로 FITC-표지된 *P. gingivalis*에 30분간 처리하였다. 그 다음 neutrophil과 위의 *P. gingivalis*를 10분간 또는 30분간 배양한 후 flow cytometry로 neutrophil의 FITC 강도를 측정하였다. 그 결과 positive

control로 사용한 #265 hybridoma cell 배양액으로부터 정제한 항체를 처리한 경우와 비슷하게 비 캘러스 #265-4의 현탁배양으로부터 정제한 FimA 항체를 처리한 경우도 peak가 우측으로 이동되어 (FITC 강도가 센 세포의 양이 증가함) 항체에 의한 *P. gingivalis*의 phagocytosis가 증가되었음을 알 수 있었다 (그림 43).

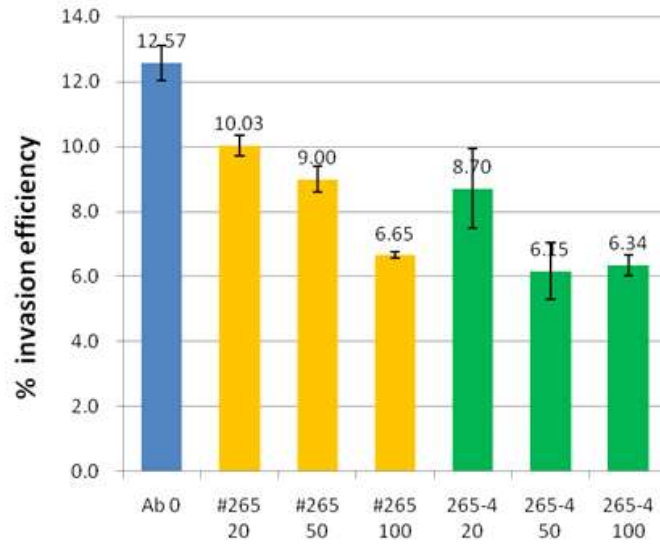


그림 42. 항체의 세포 침투 억제효능 검증

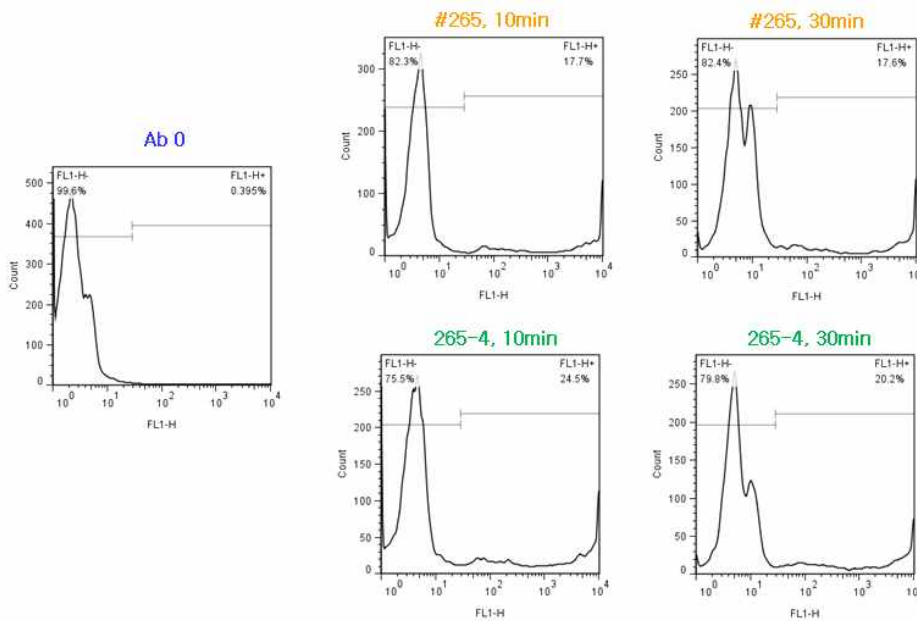


그림 43. 항체의 opsonization 효능 검증



(5) 식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 Bacterial killing assay

식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 bacterial killing assay를 수행하기 위하여 실험 방법은 Tetsuo Kobayashi et al. (Infect. Immun. May 2001, 2935-2942)을 참고하여 neutrophil의 *P. gingivalis* 사멸능에 대한 항체의 영향을 살펴보았다. 항체를 10, 50, 250 ug/ml의 농도로 *P. gingivalis*에 opsonization 시킨 다음 mouse로부터 분리한 neutrophil과 함께 37°C 에서 15분 또는 30분간 배양하였다. Neutrophil 내로 들어간 intra-bacteria와 세포 밖에 남아있는 extra-bacteria를 원심분리로 분리하였고 각각을 고체배지에 혐기배양조건에서 배양하여 형성된 콜로니 수를 세었다. Killing index는 다음과 같이 계산하였다.

$$[(\text{총 균수} - \text{세포밖 균수} - \text{세포안 균수}) / (\text{총 균수} - \text{세포밖 균수})] \times 100$$

Neutrophil과 15분간 배양한 실험 결과 항체를 처리하지 않은 경우보다 항체를 처리했을 때 killing index가 64.4였는데 10 ug/ml 농도로 처리했을 때 75.7, 50 ug/ml 일 때 76.8, 100 ug/ml 일 때 75.6을 보여 균 사멸능이 증가하는 것으로 보였다. Neutrophil과 30분간 반응을 하였을 때에는 항체를 처리한 것이나 안한 것이나 비슷한 결과를 보였다 (그림 44).

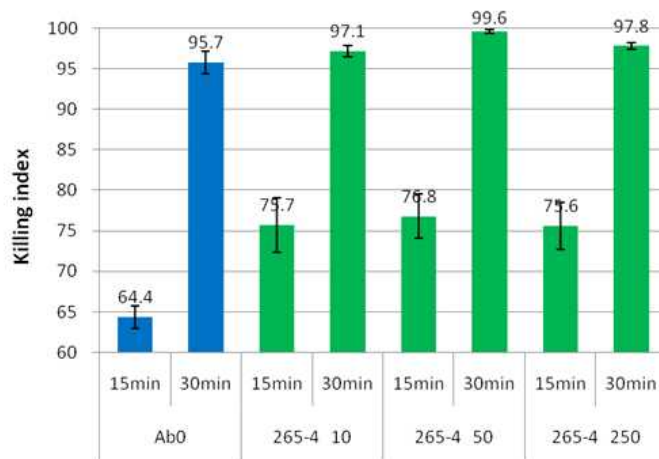


그림 44. 항체의 균 사멸능 검증

3. *N. benthamiana*에서 항체유전자의 transient expression

FimA 항체유전자를 발현시키는 방법으로 안정적 형질전환이 아닌 *Nicotiana benthamiana* 식물에서 transient expression을 시도해 보았음. Transient expression 시스템은 stable transformation 시스템 보다 빠른 시일 내에 외래 단백질을 다량 발현시키는 것으로 알려져 있다.

South Africa의 Rybicki 교수로부터 3종류의 expression vectors를 받아 이용하였다 (그림 45). pTRAc와 pTRAc-rbcs1-cTP, pTRAc-ERH vector는 각각 cytoplasm과 chloroplast, ER targeting을 목적으로 하는 식물발현벡터이다 (참고 Journal of General Virology 2007, 88, 1460-1469).



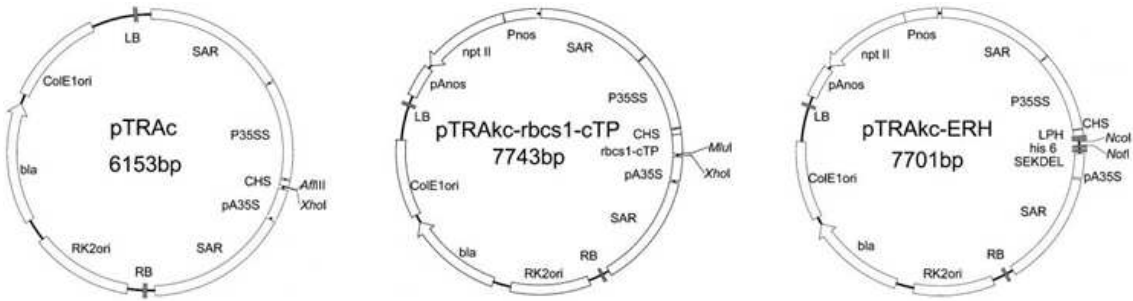


그림 45. Transient expression을 위한 식물발현벡터

항체유전자에 대한 식물발현벡터 제작을 위한 PCR 증폭에 사용한 primer는 다음과 같다.

Name	Sequence (5' → 3')
Bsp sg-265H F	TCATGATC GAAGTGAAGCTGGTG
265H-R	AGATCTTCAATTACCCGGAGA
Not 265H R	GCGGCCGC TTTACCAGGAGAGTG
Nco sg-265L F	CCATGG ACATTGTGATGACC
Not 265L R	GCGGCCGC AACTCATTCTGTT
123L-R	GGATCCCTAACACTCATTCT

항체 유전자를 pTRAc와 pTRAc-rbcS1-cTP vector에 클로닝하기 위하여 5'과 3' 말단에 BspHI과 BglIII 제한효소 부위를 포함하고 #265 heavy chain 유전자에 specific한 primers (Bsp sg-265H F와 265H-R)와 NcoI과 BamHI 제한효소 부위를 포함하고 265 light chain 유전자에 specific한 primers (Nco sg-265L F와 123L-R)을 가지고 PCR를 수행하여 항체 유전자를 증폭하였다. pTRAc-ERH vector에 클로닝하기 위하여 5'과 3' 말단에 BspHI과 NotI 제한효소 부위를 포함하고 #265 heavy chain 유전자에 specific한 primers (Bsp sg-265H F와 Not 265H R)와 NcoI과 NotI 제한효소 부위를 포함하고 #265 light chain에 specific한 primers (Nco sg-265L F와 Not 265L R)을 가지고 PCR를 수행하여 항체유전자를 증폭하였다 (그림 46).

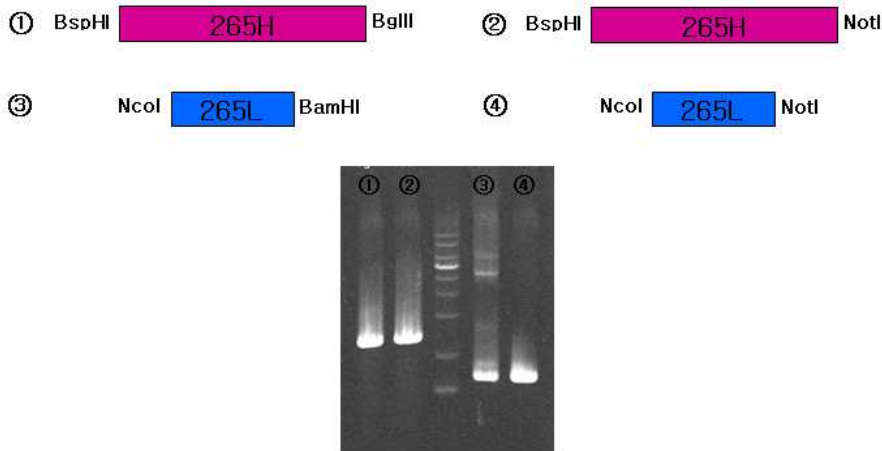


그림 46. 클로닝을 위한 항체 유전자의 PCR 증폭

pTRAc vector에 항체유전자를 subcloning하기 위하여 vector를 AflIII, BamHI으로 자르고 #265 heavy chain 유전자는 BspHI, BglIII, light chain 유전자는 NcoI, BamHI으로 자른 후 서로 ligation을 수행하고 박테리아에 형질전환한 후에 얻은 형질전환체에서 plasmid를 추출하여 EcoRI과 XbaI으로 잘라서 1,385 bp와 670 bp의 원하는 DNA band를 확인하여 constructs를 제작하였다 (그림 47).

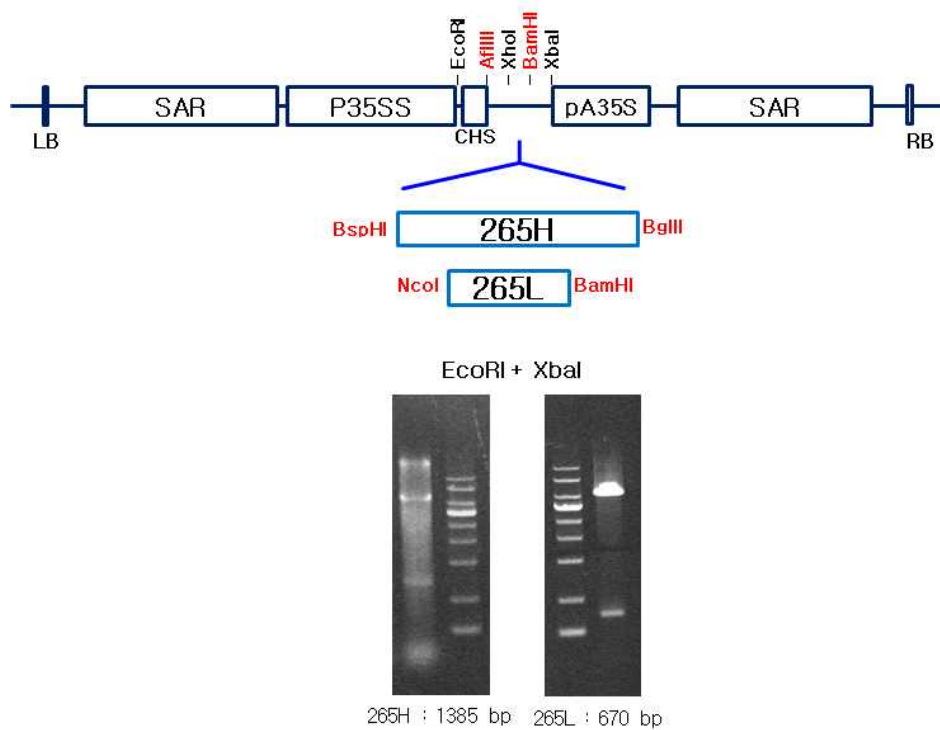


그림 47. pTRAc vector에 #265 항체유전자의 식물발현벡터 제작

pTRAc-ERH vector에 항체 유전자를 subcloning하기 위하여 vector는 NcoI과 NotI으로 자르고 #265 heavy chain 유전자는 BspHI, NotI, light chain 유전자는 NcoI, NotI으로 자른 후 서로 ligation을 수행하고 박테리아에 형질전환한 후에 얻은 형질전환체에서 plasmid를 추출하여 EcoRI과 XbaI으로 잘라서 1,500 bp와 815 bp의 원하는 bands를 확인하여 형질전환을 확인하였다 (그림 48).

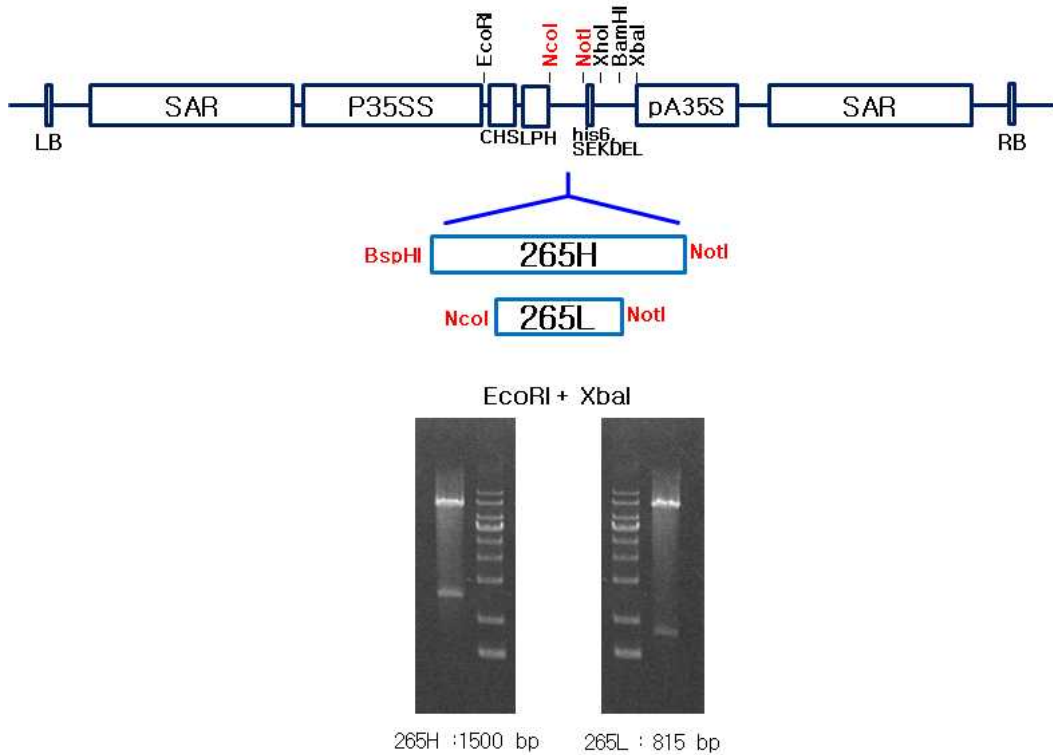


그림 48. pTRAcK-ERH vector에 #265 항체의 클로닝

pTRAcK-rbcs1-CTP vector에 항체유전자를 subcloning하기 위하여 vector는 MluI를 처리하고 klenow fragment를 처리한 후 BamHI를 처리하여 자르고 #265 heavy chain 유전자는 EcoRI를 처리한후 klenow fragment를 처리하고 BglIII를 처리하였고, light chain 유전자는 EcoRI를 처리한 후에 klenow fragment를 처리하고 BamHI으로 자른 후 서로 ligation을 수행하고 박테리아에 형질전환한 후에 얻은 형질전환체에서 plasmid를 추출하여 EcoRI과 XbaI으로 잘라서 210, 1,335 bp와 210, 645 bp의 원하는 band를 확인하여 형질전환을 확인하였다 (그림 49).

식물발현벡터를 제작한 후 각각의 식물발현벡터를 *Agrobacterium* GV3101에 electroporation 방법을 이용하여 형질전환을 하였다. 각각의 targeting vector에 클로닝된 #265 heavy chain과 light chain 유전자를 동시에 *N. benthamiana*에 agroinfiltration 방법을 이용하여 항체단백질의 발현을 수행하였음. Infiltration 후 2, 4, 6일째 잎을 수확한 후에 갈라서 단백질을 추출하여 western blot과 ELISA를 수행한 결과 ER targeting에서 infiltration한 후 6일째 sample에서 0.13% of TSP의 발현 수준을 보이는 것을 확인하였다 (그림 50).

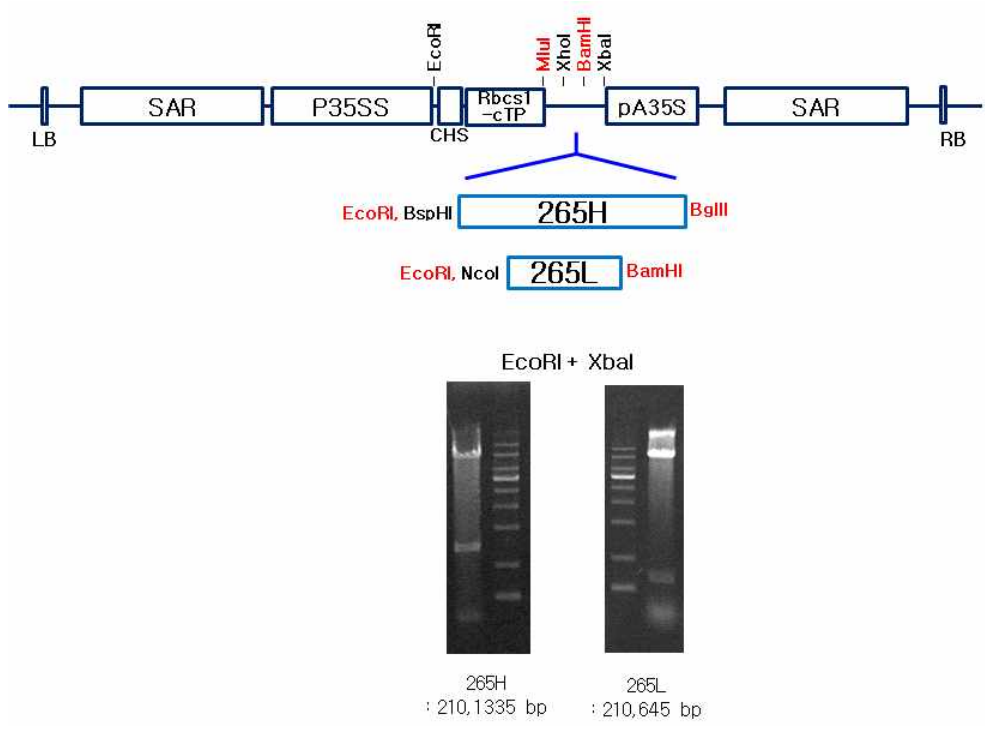


그림 49. pTRAcK-rbcsl-cTP vector에 #265 항체유전자의 식물발현벡터 제작

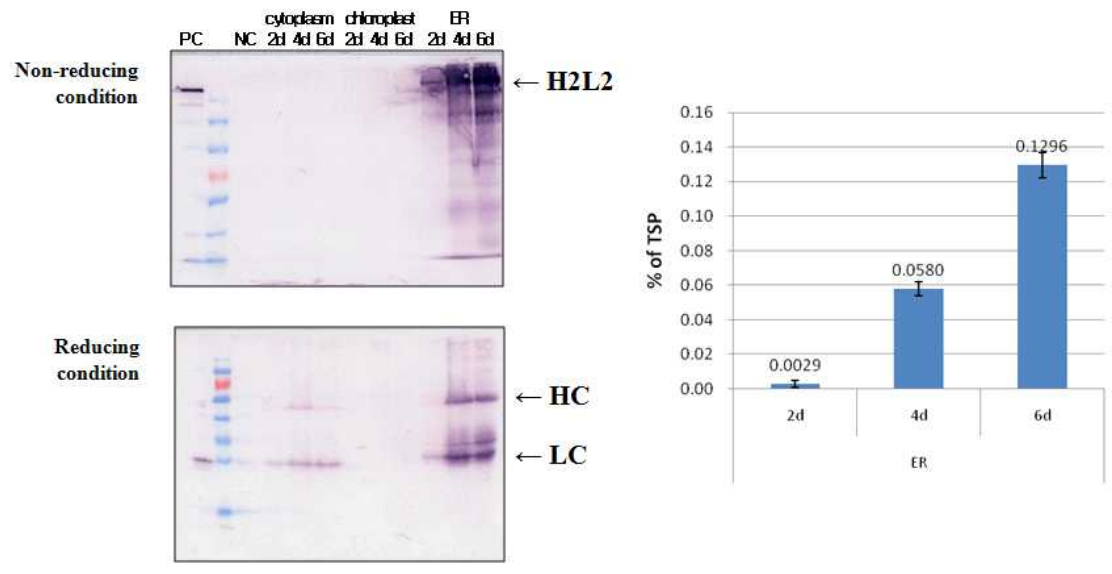


그림 50. Agroinfiltration을 통한 항체의 transient expression

#### 4. 항체 단백질을 생산하는 형질전환 식물체 개발

##### 가. 벼의 형질전환을 위한 식물발현 벡터 제작

식물세포 현탁 배양을 이용한 항체단백질의 발현이 분비되어 항체단백질의 기능을 확인하고 형질전환 벼의 종자에서 항체 단백질의 발현을 시키기 위하여 식물세포 현탁배양에서 당 결핍 조건에서 항체단백질의 발현을 시킨 amylase 3D promoter를 germinated seed에서 강하게 목적단백질을 발현시키는 것으로 알려져 있는 Rice amylase 1A promoter로 치환 하였다.

이에 Ramy 3D promoter를 가지고 있는 기존의 유전자에서 Ramy 1A promoter로 치환하기 앞서 Ubiquitin promoter로 치환하고 그 다음 목적으로 하는 Ramy 1A promoter로 치환하였다.

Ubiquitin promoter 조절 하에 있는 항체 유전자 #123와 #265 light chain 유전자를 포함하고 있는 pMYV921와 pMYV922 plasmids를 XbaI으로 자른 후 Klenow fragment를 처리하여 blunt end를 제작하고, 그 다음 HindIII로 잘라 CIAP 처리 후 vector로 준비하고 pMYV109 plasmid의 BamHI으로 자른 후 Klenow fragment를 처리하여 blunt end를 제작하고, 그 다음 HindIII로 잘라 insert로 Ramy 1A promoter를 이용하여 식물발현 벡터를 제작하였다 (그림 51). 선발배지에서 형질전환체를 선발하여 HindIII-BamHI를 이용하여 Ramy 1A promoter크기의 800 bp band를 확인하였다 (그림 52). Ramy 1A promoter 조절하에 #123과 #265 항체의 light 유전자를 포함하고 있는 식물발현벡터를 각각 pMYV923과 pMYV924로 명명하였다 (그림 53).

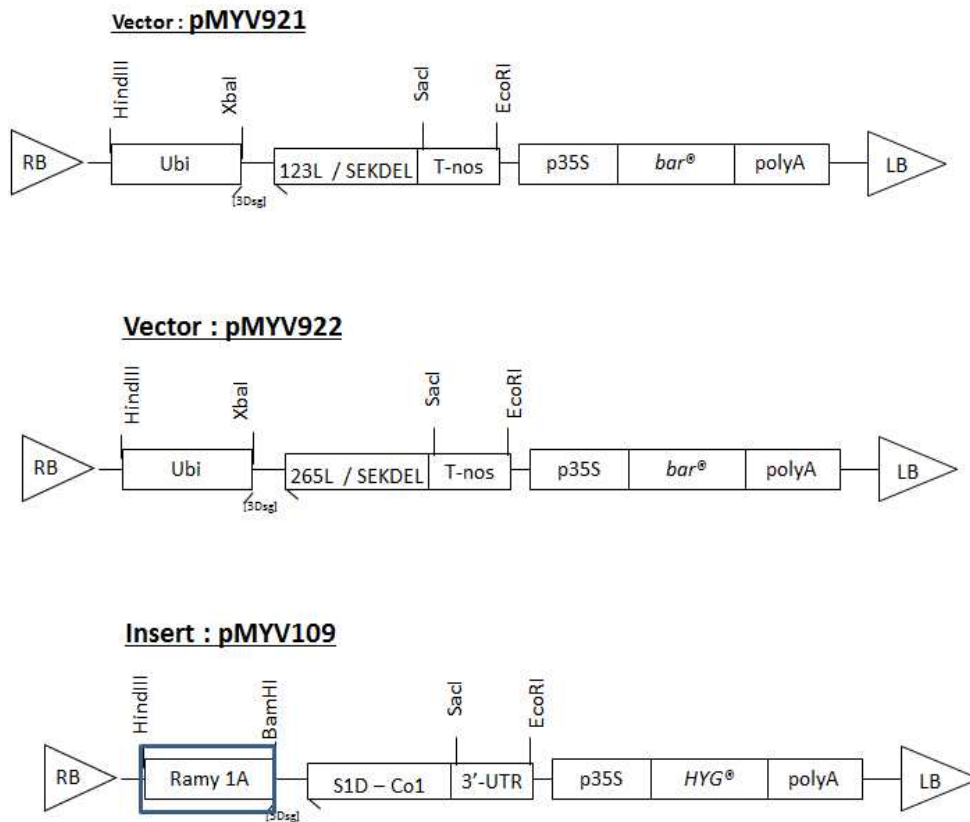


그림 51. #123와 #265 light chain의 항체유전자를 Ramy 1A promoter로 치환

Rice Ramy 1A promoter (HindIII-BamHI digestion)

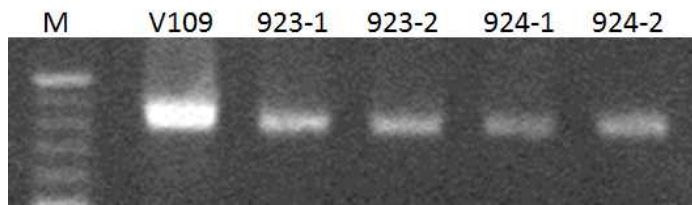


그림 52. pMYV923과 pMYV924 형질전환 확인을 위한 HindIII-BamHI 제한 효소 반응.

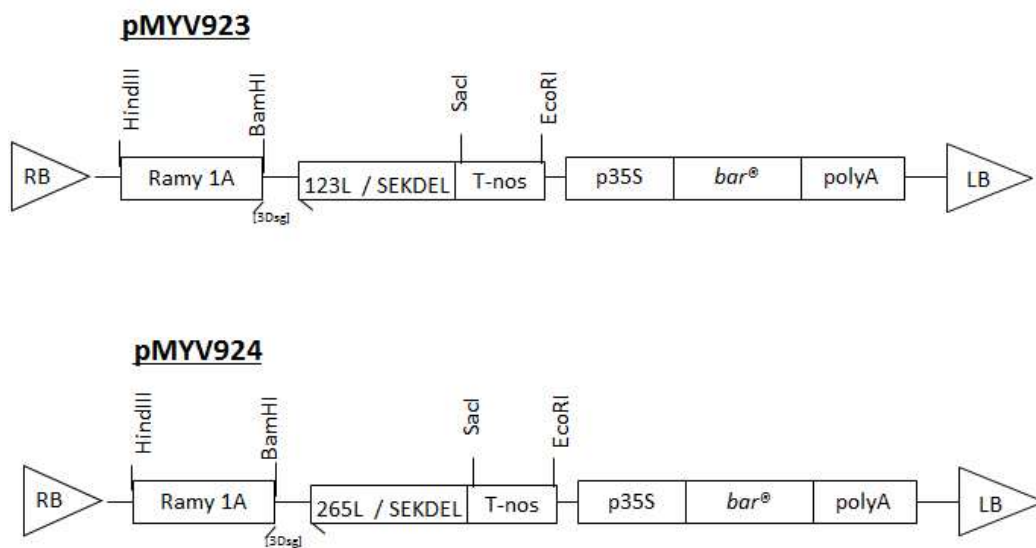


그림 53. pMYV923과 pMYV924의 plasmids의 유전자 지도

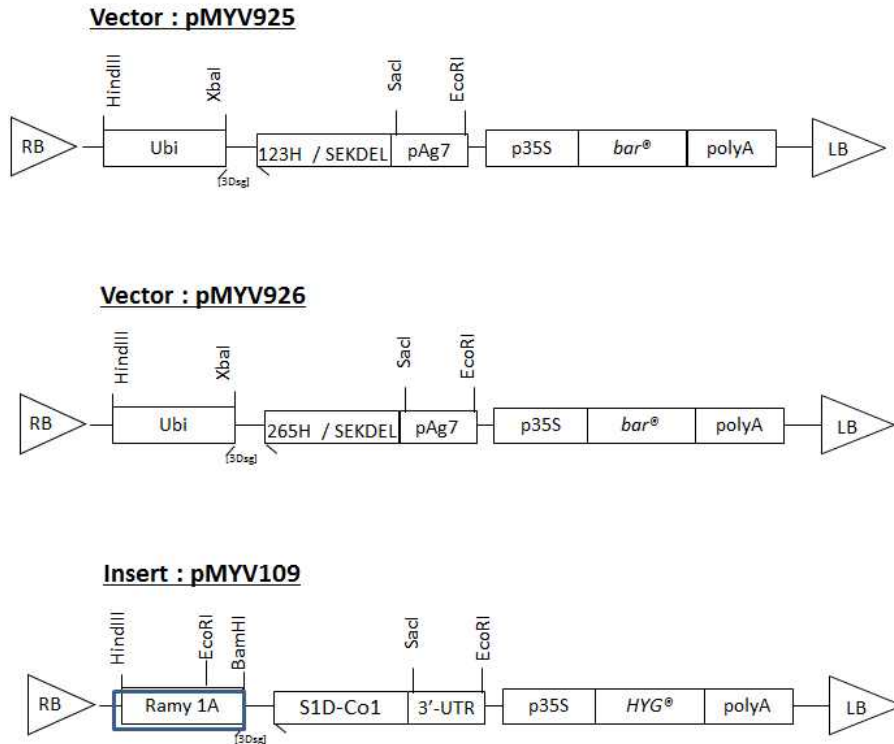


그림 54. #123와 #265 heavy chain의 항체유전자를 Ramy 1A promoter로 치환

Ubiquitin promoter 조절 하에 있는 항체 유전자 #123와 #265 heavy chain 유전자를 포함하고 있는 pMYV925와 pMYV926 plasmids를 XbaI으로 자른 후 Klenow fragment를 처리하여 blunt end를 제작하고, 그 다음 HindIII로 잘라 CIAP 처리 후 vector로 준비하고 pMYV109 plasmid의 BamHI으로 자른 후 Klenow fragment를 처리하여 blunt end를 제작하고, 그 다음 HindIII로 잘라 insert로 Ramy 1A promoter를 이용하여 식물발현 벡터를 제작하였다 (그림 54). 선발배지에서 형질전환체를 선발하여 EcoRI/BamHI를 이용하여 600 bp와 300 bp의 bands를 확인하였다 (그림 55). Ramy 1A promoter 조절하에 #123과 #265 항체의 heavy 유전자를 포함하고 있는 식물발현벡터를 각각 pMYV927과 pMYV928로 명명하였다 (그림 56).

Agrobacterium-mediated 형질전환 방법에 의해서 벼를 형질전환하기 위하여 식물형질 전환 벡터를 tri-parental mating transformation 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens*에 형질전환하여 선발배지에서 얻은 형질전환체에서 plasmid DNA를 추출한 후에 박테리아에 back transformation을 수행하여 형질전환을 확인하였다.

Rice Ramy 1A promoter-265H (BamHI-EcoRI digestion)



그림 55. pMYV927과 pMYV928 형질전환 확인을 위한 EcoRI-BamHI 제한 효소 반응.



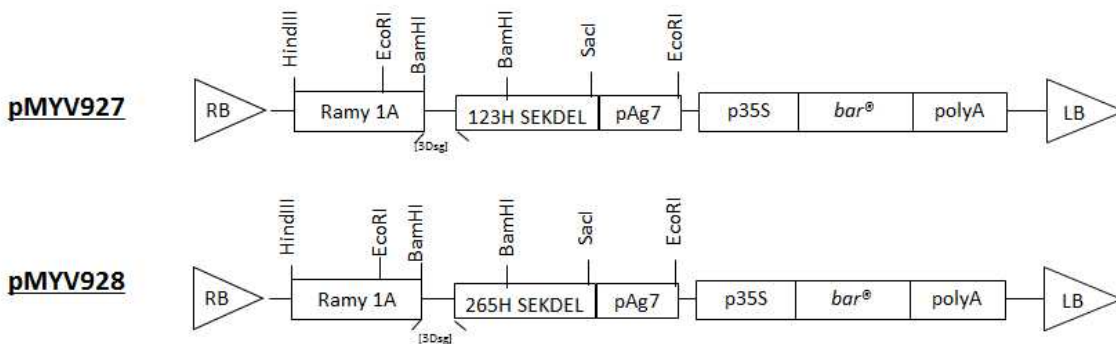


그림 56. pMYV927과 pMYV928의 plasmids의 유전자 지도

#### 나. 벼의 형질전환

Sucrose (30 g/l), casamino acids (1 g/l), 2,4-D (2 mg/l), gelrite (2 g/l), pH 5.8를 포함하는 N6 medium에서 2 주간 유도된 callus를 1 주간 새로운 배지에서 배양하고 형질전환하기 전 3일간 새로운 배지에 한 번 더 배양을 하여 형질전환 할 callus를 준비하였고 pMYV923, pMYV924, pMYV927과 pMYV928 식물발현벡터를 포함하고 있는 Agrobacterium을 2일간 배양한 배양액의 200 ul를 plate에 spreading하여 2-3일간 배양하였고 AAM 배지로 resuspended한 용액에 200 uM의 최종농도가 되게 acetosyringone를 첨가하여 형질전환에 이용할 Agrobacterium 용액을 준비하였다.

준비된 callus를 Agrobacterium 용액에 10분간 침지하고 멸균된 거름종이에 용액을 제거한 후, sucrose (30 g/l), casamino acids (1 g/l), 2,4-D (2 mg/l), glucose (10 g/l), gelrite (2 g/l), acetosyringone (100 µM), pH 5.2를 포함하는 N6 co-culture medium에서 암상태로 3-5일간 배양하고 cefotaxime이 첨가된 멸균수로 세척하고 멸균된 거름종이로 용액을 제거한 후 phosphinothricin (PPT) (4 mg/l)가 첨가된 선발배지에서 형질전환 callus를 선발하였다.

선발된 형질전환 callus는 vitamin B5 (3.957g/l), sucrose (30 g/l), proline (0.5 g/l), glutamine (0.5 g/l) casein enzymatic hydrolysate (0.3 g/l), NAA (0.5 mg/l), BAP (3 mg/l), hygromycin B (50 mg/l) 그리고 N6 salts를 포함하는 Cambia medium에 옮겨서 재분화하였다.

#### 다. 형질전환 벼의 유전자 도입 확인

선발된 형질전환 식물체의 잎에서 genomic DNA를 추출하여 light chain과 heavy chain에 특이적인 primers를 이용하여 genomic DNA PCR를 수행하여 형질전환을 확인하였다 (그림 57).

#### 라. 형질전환 식물체에서 항원단백질의 발현

재분화된 식물체를 온실에 옮긴 후, 종자를 수확한 후에 항체단백질의 발현을 확인하기 위하여 종자의 발아를 유도한 후에 발아된 종자로부터 단백질을 추출하여 항체단백질에 특이적인 항체를 이용하여 western blot 분석을 실시한 결과 아주 약한 세기의 항체단백질 bands를 확인하였다 (그림 58).

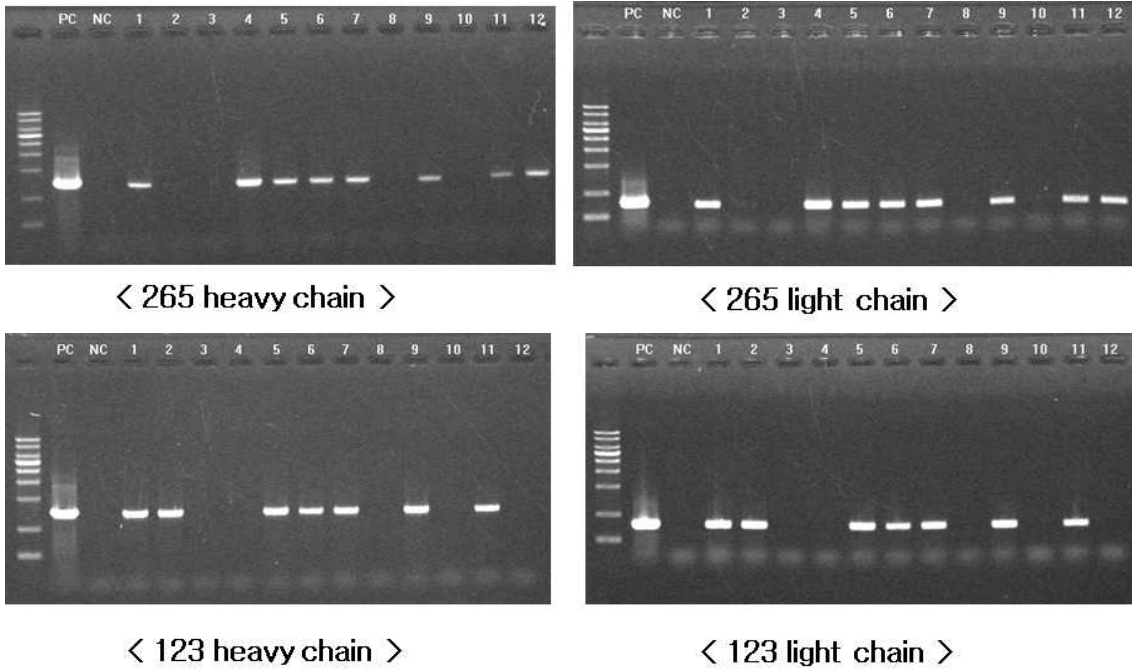


그림 57. 항체유전자 형질전환 식물에서 genomic DNA PCR 분석

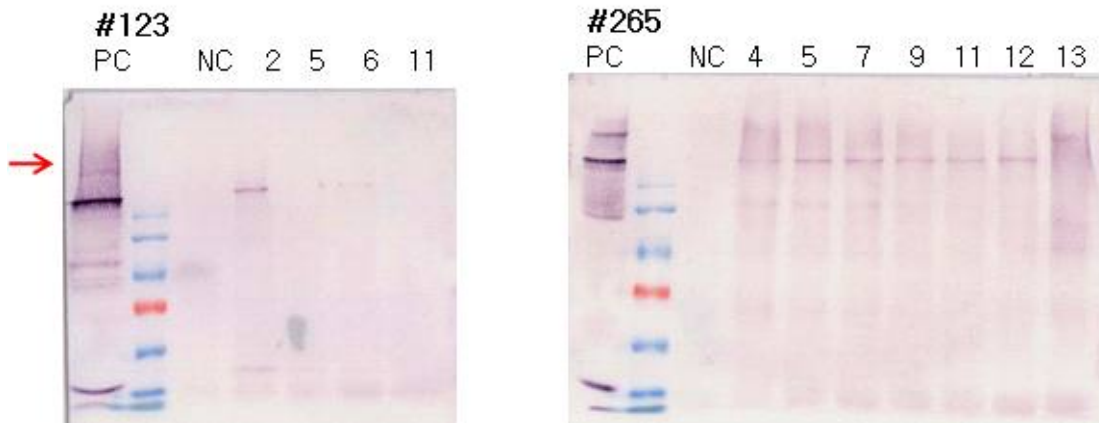


그림 58. 형질전환 벼의 종자에서 항체단백질의 발현

마. 벼의 종자에서 강력한 발현을 보이는 다른 promoter system 확립

벼의 종자에서 항체단백질의 낮은 발현율은 promoter의 낮은 발현율일 것이라는 판단하는데 항체단백질에 추가로 rice amylase promoter 조절하에 덩기 EDIII protein 발현 시켜 보았을 때에도 비슷한 낮은 발현율을 보였다. 현재, 이런 낮은 발현율을 해결하고자 duplicated 35S CaMV promoter, 항시성인 Ubiquitin promoter, rice Actin promoter, Glutelin promoter 그리고 HMW Bx17 promoter에 대한 벼의 종자에서 활성도를 확인하는 실험을 진행하고 있다.

# 제 6 절 경구백신 효율증진 방안 및 백신 효능 검정 연구

(제2핵심 제 1세부과제-전북대학교)

## 1. 연구의 필요성 (배경)

### 가. 점막면역 시스템

신체의 호흡기와 소화기, 그리고 비뇨기와 생식기를 덮고 있는 점막은 표면적이 약 400m<sup>2</sup>이며, 음식을 비롯한 여러 미생물 및 다양한 병원균과 같은 외부 환경으로부터 신체를 보호하기 위해서 체내와 체외의 접점부분에 점막면역 시스템이 발달되어 있다(Ogra, 2003). 가장 대표적인 점막면역 시스템인 장내 점막면역 시스템에 대하여 알아보면, 대부분의 외부 항원은 특이적으로 항원을 잘 받아들일 수 있는 특징을 가진 세포인 M cell에 의하여 체내로 들어오는데, M cell은 장내 면역기관인 Peyer's patch의 follicle-associated epithelium(FAE)에 위치한다(Kuolee & Chen, 2008). 항원이 M cell을 통하여 유입되면 그림 1에서 보는 바와 같이 M cell 주변의 dendritic cell(DC) 및 T 세포와 B 세포에 의하여 항원에 대한 innate 및 adaptive immunity가 유도되며, immunoglobulin class switching에 의해 항원 특이적인 IgA를 만들 수 있는 B 세포의 분화가 유도된다. IgA를 발현하는 B 세포는 effector site인 lamina propria로 이동하여 plasma cell로 분화되어 IgA를 분비하며, 생성된 IgA는 J chain에 의해 dimer 형태로 상피

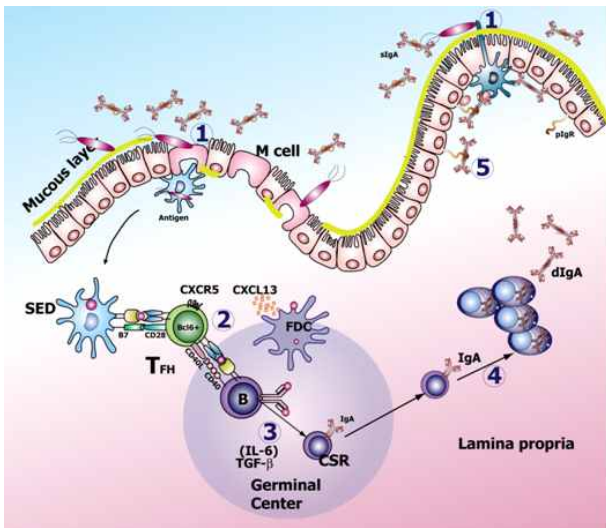


그림 1. 장 점막면역계의 schematic diagram

세포의 pIgR(polymeric immunoglobulin receptor)에 의해 체외로 분비된다(Strugnell & Wijburg, 2010). 분비된 IgA(SIgA, secretory IgA)는 장 상피세포에 병원체의 부착을 억제하고, allergen과 같은 macromolecule의 유입을 억제하며, 바이러스나 독소에 대한 neutralization을 유도한다)(Cerutti et al., 2011). 또한, 항원과 immune complex를 형성한 후 항원을 제거하는 역할도 수행한다. 따라서 SIgA는 점막면역반응에서 가장 중요한 역할을 하기 때문에 경구백신의 궁극적인 목적 중의 하나는 투여되는 항원에 대한 SIgA의

유도라 할 수 있다(Strugnell & Wijburg, 2010).

점막 면역계에서 SIgA는 T cell에 도움 없이 유도 될 수 있으나 항원과의 낮은 친화력 때문에 항원 및 병원균에 대한 방어 기능이 낮다. 그러나 germinal center에서 T cell의 도움을 통해 항원에 대한 특이성이 증가하는 기작에 의해 생성되는 SIgA는 항원 또는 병원균에 대한 높은 친화력으로 체내의 유입을 방어하는 기능을 수행한다(Victora & Nussenzweig 2012). 항원의 유입 및 innate 신호에 의한 follicular dendritic cell의 활성화는 chemokine CXCL13을 분비하고, CXCR5 갖는 B cell들은 CXCL13 network을 통해 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal B cell follicle의 형성한다(Deshane & Chaplin, 2010). CD40을 발현하는 germinal B cell은 항원 및 DC에 의해 활성화에 의해 CD40 ligand를 발현하는 T cell과의 상호 신호 전달 및 주변 TGF-β와 IL-6의 영향

에 의해 유도된 activation-induced cytosine deaminase에 의해 IgA isotype switching 및 somatic hypermutation가 진행되어 항원에 높은 친화력을 갖는 IgA를 발현할 수 있는 B cell들이 형성된다(Crotty S., 2011). 또한 germinal center에서 유도된 IgA를 갖는 B cell의 생성은 항원 특이적 IgA를 갖는 memory cell 형성과 밀접하게 연관되어 있어, germinal center 활성화의 조절은 최근 백신 개발의 주요 target 분야이다. 따라서 점막 백신 중 한 가지 방법인 경구백신은 투여의 수월성과 더불어 점막면역 뿐만 아니라 전신 면역계에서도 항원 특이적 면역 반응을 유도 할 수 있어 차세대 백신기술로 고려되고 있다.

#### 나. 경구 백신 보조제

점막백신의 여러 접종 경로 중에서도 점종의 수월성 때문에 경구용 백신이 가장 선호되고 있다. 그런데, 경구로 투여되는 항원은 면역반응의 유도보다는 면역관용의 유도 특성이 강하다는 문제가 있어 경구백신이 극복해야하는 가장 큰 숙제는 백신을 점막 면역반응이 잘 일어날 수 있는 면역 기관까지 전달하여 면역반응을 유도할 수 있게 해야 한다는 점이다. 이를 위한 방법으로 가장 선호되는 방법이 백신 보조제(adjuvant)를 사용하는 방법인데, 이는 cholera toxin 등을 사용하여 실험적으로 입증되었다. 하지만, 아직 안전성과 효율성을 모두 갖추고 있는 효과적인 점막면역 보조제가 제시되고 있지 않아 효율적인 경구백신 개발에 있어서 백신 보조제에 대한 연구는 필수적이다.

경구 백신의 효율을 높이기 위해 사용되는 백신 보조제로는 Toll like receptor ligand(TLR) 및 cholera toxin 등이 있는데, 이들의 효과는 antigen presenting cell(APC)로부터 Th1/2 세포로의 분화를 유도하는 cytokine의 분비 유도 뿐 아니라, 최근 밝혀진 Th17 세포에서 분비되는 cytokine인 IL17A/F와 IL-23 등의 분비 유도를 통한 memory 세포의 기능 향상이 주요 효과로 보고되고 있다(표 1). 예를 들어 세포 표면의 ganglioside를 receptor로 갖는 cholera toxin의 경우 점막 면역의 주요 보조제로 이용되고 있으며, 주로 Th2 type cytokine의 분비 유도를 통해 점막 면역유도에 중요하게 관여하는 것으로 보고되었지만, 또 다른 기능으로 IL-17의 분비 유도를 통해 long-lived memory cell을 유도하는 것으로 밝혀졌다(Agren LC 1997). 점막에서의 Th17 type cytokine의 기능은 *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumonia*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* 및 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 백신에서 항원 특이적 long-lasting memory cell의 유도를 통한 백신 효과를 결정하는데 중요하게 작용하는 것이 검증되었다. 따라서 경구면역 증진을 위해 백신을 점막 면역계로 잘 전달할 뿐 아니라, Th1/2/17 type의 cytokine의 분비를 통한 면역 증강효과를 유도할 수 있는 경구 백신 보조제의 개발이 중요하다고 할 수 있다. 더불어, 최근 cholera toxin 및 TLR ligands는 germinal center 구성에 중요한 follicular dendritic cell의 활성을 높여 항원에 대한 높은 친화력을 갖는 항체를 유도하는 연구 보고에 따라 백신 보조제 개발에 새로운 target을 제시하였다.

표 1. Adjuvants involved in generation of Th17 polarizing cytokines

Adjuvant	Receptor	Cytokine produced in APC	T-helper response
Peptidoglycan	TLR2	IL-23, IL-1 $\beta$	IL-17
Lipoteichoic acid	TLR2	IL-23	
LPS	TLR4	IL-23, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12	IL-17 and IFN- $\gamma$
Candida mannan	Macrophage Mannose Receptor	IL-23, IL-1 $\beta$	IL-17
Curdlan	Dectin-1	IL-23, IL-12p40, IL-10, IL-2, IL-6	IL-17 and IFN- $\gamma$
Cholera toxin	Cell surface gangliosides	Inhibits IL-12	IL-17 and IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5
Pertussis toxin	TLR2/4	IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-23	IL-17 and IFN- $\gamma$
Dimethyl dioctadecylammonium bromide	Unknown	IL-23, IL-12, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$	IL-17 and IFN- $\gamma$
CFA	MyD88 dependent	TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23	IL-17

## 2. 연구 내용

본 세부과제에서는 경구백신 효율 증진 방안으로 제시된 점막면역 조절에 대한 연구 및 점막 보조제의 개발을 목표로 진행되어 왔다. 점막은 많은 병원균 및 음식물 등과 같은 외부 항원에 직접 노출되어 있기 때문에 항원의 유입을 긴밀하게 조절하고 있으며, 유입된 항원 및 병원균들에 대한 면역반응은 전신 면역 시스템에 독립적으로 진행될 수 있는 점막 면역 시스템을 갖고 있다. 최근 백신에서 점막 면역 유도에 대한 관심이 증가하는 이유는 점막이 외부 항원 유입의 첫 번째 방어 지역이며, 점막에서의 면역 반응과 동시 전신 면역에서도 효과적인 항원 특이적 면역 반응의 유도가 가능하기 때문이다. 그러나 백신의 점막 면역유도는 백신이 점막으로 유입되어야 하는 점과 경구내성(oral tolerance)을 극복해야하는 두 가지 장애물을 극복해야하며, 그에 대한 해결책으로 점막 보조제가 제시 되고 있으나 아직 그 개발이 미비한 실정이다. 따라서 본 세부과제에서는 보다 효과적인 경구백신 개발을 위해 항 펩타이드를 이용한 점막 면역 시스템의 조절 기작에 대한 이해 및 경구 백신 보조제로써 개발 가능성을 확인하고자 하였으며, 또한 점막에서 항원 유입에 특이성을 보이는 M cell에서 발현 되는 단백질의 분석을 통해 점막으로 항원 유입 기작 및 새로운 경구 백신 보조제의 개발에 대한 연구를 통해 경구 백신을 점막으로 보다 효율적으로 전달하고 면역반응을 증진시킬 수 있는 방안을 찾아 경구 백신 개발에 필수적으로 요구되는 기반 기술을 확보하고자 하였다.



가. 항 펩타이드 작용기작 분석을 통한 점막 면역 조절에 대한 이해

점막은 많은 유해한 병원균뿐만 아니라 장내 commensal bacteria 및 많은 음식물에 노출되어 있기 때문에 외부 항원의 유입을 조절할 뿐 아니라 항원에 대한 면역반응 역시 선택적으로 이루어지는 곳이다(Artis, 2008). 따라서 점막을 통한 경구 백신은 항원의 적절한 유입 경로를 선택해야 할 뿐 아니라 경구내성을 극복해야 하는 과제를 달성해야만 한다. 성공적인 경구백신의 개발은 항원을 점막 내로 보다 효율적으로 전달하여야 할 뿐 아니라 점막 면역반응 및 전신 면역반응이 모두 잘 일어날 수 있도록 하는 보조제가 같이 제시되어야 하나, 이에 대한 연구가 부족한 형편이다(그림 2).

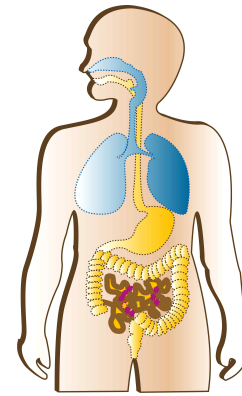


그림 2. 점막 면역계

최근 밝혀진 Th17 세포는 점막 면역반응 유도에 필요한 것으로 알려진 Th1 및 Th2 세포 활성화와 함께 adaptive immune response와 innate immune response를 연결하는 기능을 하는 것으로 알려져 점막 면역반응 유도에서 중요한 cell population으로 인식되고 있을 뿐 아니라 항원 특이적 memory cell의 유도에 중요한 기능을 하는 것으로 최근 밝혀짐에 따라 백신에서 그 기능의 중요함이 강조되고 있다(Weaver, 2013). 따라서 점막 백신 보조제의 target으로 인식되고 있는 Th17 세포는 mouse의 경우 IL-6와 TGF-β에 의하여 분화가 유도되며, human의 경우에는 IL-1β가 더 첨가되었을 때 naive T 세포가 Th17 세포로 분화되어 IL-17을 발현하며, IL-23R의 발현을 통하여 Th17 세포들의 수명 및 특성을 유지시킨다고 알려지고 있다(그림 3).

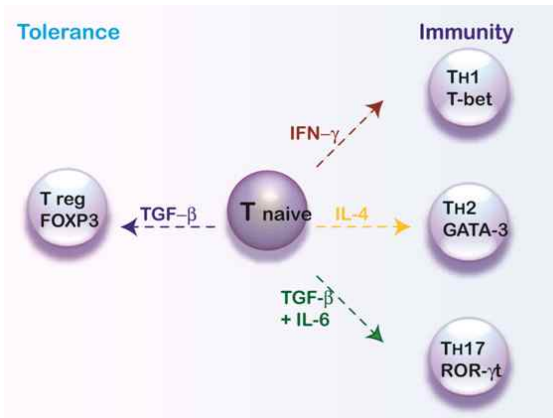


그림 3. T세포의 분화

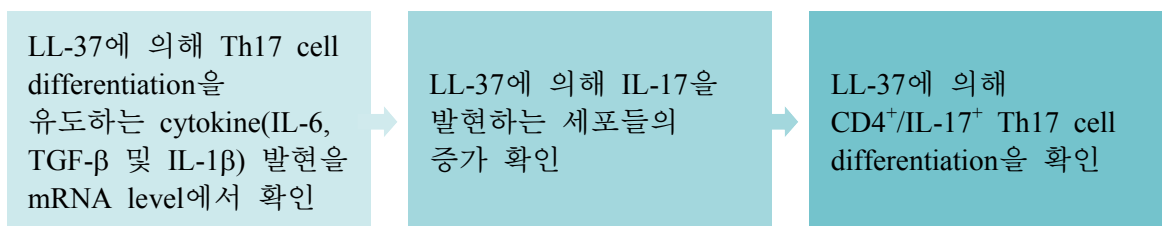
점막에서 발현되는 것으로 알려진 항 펩타이드는 박테리아 및 바이러스 등의 증식을 억제하는 기능을 수행할 뿐 아니라 여러 면역세포의 활성을 조절하는 것으로 최근에 연구가 활발히 진행되고 있다. 점막면역계에서는 Th17 세포에 의하여 여러 항 펩타이드들이 발현되는 것으로 알려져 있으나, 아직은 cathelicidin 계열의 펩타이드의 발현이 Th17 세포의 분화를 유도한다는 사실은 알려진 바가 없고, 단지 commensal bacteria의 대사산물인 butyric acid 및 VitD 등에 의하여 점막 표피세포로부터 발현이 유도 된다고 알려지고 있다(Davidson et al., 2004).

Human cathelicidin LL-37은 neutrophil, macrophage와 다양한 epithelial cell에서 발현되며, 특히 VitD와 butyrate에 노출되었을 때 분비가 유도되는 것으로 알려지고 있다(Schauber et al., 2003). LL-37은 antimicrobial effect를 가지고 있을 뿐 아니라 여러 면역세포의 기능을 modulation하는 것으로 알려져 있는데, LL-37은 점막의 질병들과 깊은 연관성을 보이고 있다. 예를 들면 ulcerative colitis가 유도된 환자에서 LL-37의 발현이 증가된 것이 확인되며, *Shigella*

와 enteropathogenic *E. coli* 의 감염 중에는 발현이 억제되는 것이 관찰되었다(Hase et al., 2003; Yang et al., 2006). 또한 commensal bacteria의 2차 대사산물인 butyrate에 의해 epithelial cell로부터 LL-37의 발현이 증가됨이 보고되고 있으며, 아직은 PP에서의 LL-37의 기능이 알려지지 않았지만 최근 butyrate를 만드는 commensal bacteria인 *Alcaligenes spp.*가 PP 내부에 상주하는 것이 확인됨(Obata et al., 2010) 따라 PP에서 LL-37의 발현 및 점막 면역시스템의 조절 기능이 예상되고 있는 등 점막면역계 조절의 매우 중요한 물질로 간주되고 있다.

따라서 본 연구에서는 항 펩타이드인 LL-37이 Th17 cell 분화 유도 및 점막 면역 유도 조직의 특성화에 대해 이해 하고자 진행하였다.

(1) 소장 점막면역계의 항 펩타이드(LL-37) 처리에 의해 Th17 cell의 분화 유도를 검증하였다.



(가) 항 펩타이드 LL-37 처리에 따른 점막 세포에서의 Th17 세포 분화유도에 필요한 cytokine 발현 분석

항 펩타이드 LL-37의 처리가 점막 lymphocyte에 미치는 영향을 알아보기 위하여 먼저 점막의 immune inductive site인 PP로부터 collagenase II와 Percoll system을 이용하여 lymphocyte를 분리하였다. 분리된 lymphocyte( $1 \times 10^6$  cell/well)에 LL-37( $10 \mu\text{M}$ )을 처리한 후 15분과 180분 후에 mRNA를 분리하여 Th17 세포 분화유도에 필요한 cytokine(IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, IFN- $\gamma$  및 IL-4)의 상대적 발현을 real time PCR을 통하여 확인하였으며, LL-37을 처리하지 않은 세포를 control로 하여 상대적인 증가를 비교하였다(그림 4). 그림에서 보는 바와 같이 LL-37 처리 15분 후에 IL-6와 TGF- $\beta$ 의 발현양이 각 3~6배 이상 증가하는 특성을 확인할 수 있었으며, 또한 180분 후 IL-6와 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현양이 유지 및 증가되는 것을 확인할 수 있었다(그림 4a). LL-37의 유무에 의해 변화된 TGF- $\beta$ 와 IL-6의 mRNA 발현양은 주변 APC에 LL-37이 작용하여 유발된 cytokine의 발현에 의한 naive T 세포의 Th17 세포로의 분화에 대한 영향으로 생각되었다.

LL-37 처리 180분 후 IL-17 mRNA 발현양의 증가는 이 실험에서 사용한 세포가 PP에 있는 전체 세포이기 때문에 memory type의 Th17 세포가 LL-37에 반응하여 일어났을 것으로 생각되었으며, Th1 type cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 mRNA 발현에 차이가 없었기 때문에 IFN- $\gamma$ 와 IL-17을 동시에 발현하는 것으로 알려진 세포들과의 연관성은 적은 것으로 생각되었다. 또한, Th2 type cytokine인 IL-4 mRNA 역시 LL-37에 의한 발현의 변화가 없는 것으로 보아 항 펩타이드는 Th1 및 Th2 type T 세포 population에는 아무 영향을 주지 않는 것으로 생각되었다(그림 4a).

점막 면역계의 effector site인 lamina propria(LP)에서 분리한 lymphocyte에 대한 LL-37의 영향을 알아본 바 IL-6 mRNA의 발현이 급격하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. LP에서 IL-6는 Th17 세포 population을 지속적으로 유지시킬 뿐 아니라, dimeric IgA의 secretion을 증



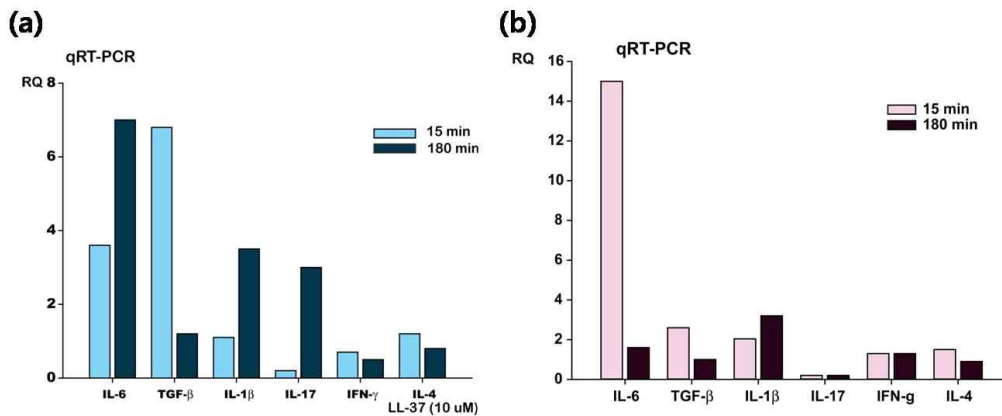


그림 4. Antimicrobial peptide LL-37 induces the expression of cytokines required to Th17 development. Peyer's patch lymphocytes (a) and lamina propria lymphocytes (b) were analyzed by real time PCR after incubation with 10mM LL-37 for 15 or 180 minutes.

가시킴, 이는 Th17 세포에 의해 sIgA 양이 증가한다는 보고와 일치되는 결과임을 알 수 있었기 때문에 LL-37은 LP에서 Th17 세포의 분화 및 유지에 영향을 미칠 것으로 생각되었다(그림 4b). 비록 IL-17 mRNA 발현의 차이는 확인할 수 없었지만, 이는 사용한 세포 population에서 memory Th17 세포의 수가 다른 세포에 비하여 상대적으로 적어서 변화를 감지하기가 어려웠던 것으로 판단되었다.

(나) *In vitro*에서 항 펩타이드 LL-37에 의한 점막 면역세포의 IL-17 발현

점막 면역조직에서 분리한 lymphocyte로부터 LL-37 처리에 의해 Th17 세포의 분화에 필요한 cytokine mRNA가 증가한 것에 근거하여 점막의 whole population으로부터 IL-17 발현량의 변화를 확인하기 위하여 PP lymphocyte를 분리한 후 LL-37(10, 20, 40 $\mu$ g/ml)과 함께 3일간 배양한 후 얻은 culture supernatant로부터 IL-17의 발현량을 Cytokine ELISA를 통해 확인하였다(그림 5).

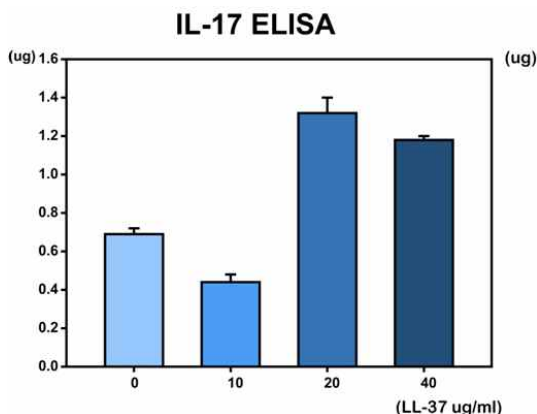


그림 5. IL-17 expression in Peyer's patch lymphocyte is dependent on LL-37 concentration

PP lymphocyte의 경우 LL-37을 20 $\mu$ g/ml 농도로 처리하였을 때 IL-17의 발현이 가장 높았으며, 10 $\mu$ g/ml을 처리하였을 때는 오히려 무 처리군에 비하여 감소하는 양상을 보였다. 반복실험에서도 동일한 양상을 보여 LL-37의 농도의 차이에 의하여 점막에서 Th17 세포 population의 분화를 조절하는 중요한 역할을 수행하지 않을까 추측되었다(그림 6a).

PP lymphocyte에 LL-37(20 $\mu$ g/ml)을 3일간 처리했을 때 발현되는 IL-17의 양이 LL-37을 처리하지 않은 세포에 비하여 많이 발현되는 것을 확인한 ELISA 결과와 일치하게 IL-17을 발현하는 세포의 수가 증가하는 것을 ELISPOT을 통하여 확인하였다(그림 6b). 또한 Th17은

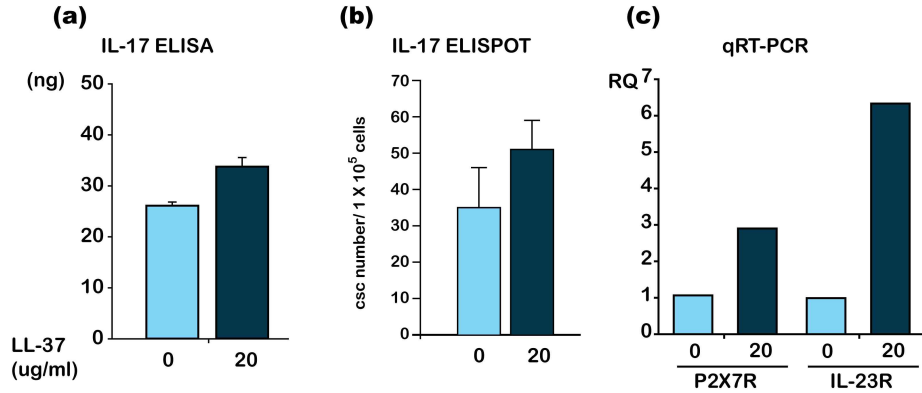


그림 6. Antimicrobial peptide LL-37 regulate the IL-17 producing cell population in Peyer's patch lymphocytes

IL-23 receptor의 발현을 통한 STAT3 signaling을 통하여 pro-inflammatory cytokine의 발현을 유도하여 inflammatory response에 관여하는 pathogenic Th17 population을 유지한다고 알려졌기 때문에 LL-37에 의하여 유도된 Th17의 특성이 pathogenic Th17 cell population 인지 IL-23R 발현 여부를 측정하여 확인하였다. 예컨대, IL-23R에 대한 mRNA의 발현을 qRT-PCR을 통하여 확인한 결과 LL-37(20 $\mu$ g/ml)을 3일간 처리한 세포 population에서 IL-23R mRNA를 발현하는 세포가 증가한 것을 확인할 수 있었다(그림 6c). 이때 mRNA의 발현양은 mouse 18s rRNA를 기준으로 LL-37을 처리하지 않은 세포와 비교하였을 때 증가된 양을 표시한 것으로 LL-37 처리 시 IL-23R을 발현하는 세포수가 6배 이상 증가한 것을 알 수 있었다(그림 6c). 또한 최근 LL-37의 receptor 중 하나로 알려진 P2X7 receptor는 ATP에 의해 Th17의 분화를 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 LL-37처리에 의하여 증가하는 IL-17 발현세포가 P2X7 receptor를 통한 신호전달 때문인지 확인하기 위하여 LL-37 처리에 의하여 유도된 세포 population에서 P2X7 receptor mRNA의 발현 정도를 확인한 바 그 발현이 3배 이상 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 항 펩타이드인 LL-37은 P2X7 receptor를 통한 signal을 통해 Th17 cell 분화에 관련되어 있을 것으로 생각되었다.

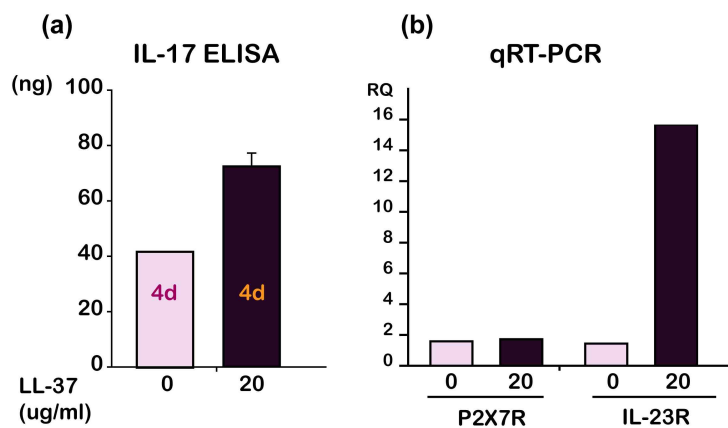


그림 7. Antimicrobial peptide LL-37 regulate the IL-17 producing cell population in lamina propria lymphocyte

한편, 점막 면역계의 effector site인 lamina propria에서 분리된 lymphocyte에서는 LL-37 처리 4일 후에 IL-17의 발현양이 증가하는 것을 ELISA를 통하여 확인할 수 있었다(그림 7a).

LP lymphocyte 중 LL-37에 의하여 유도된 Th17 발현 세포의 특성을 확인하기 위하여 pathogenic Th17 세포에서 발현되는 IL-23 receptor의 mRNA를 qRT-PCR을 통해 확인하고 18s RNA를 이용하여 LL-37 처리 유무에 따라 비교하였다(그림 7b). 그림에서 보는 바와 같이 LL-37 처리에 의하여 IL-23 receptor를 발현하는 세포가 14배 이상 증가한 것을 확인하였으며, 이는 LP lymphocyte에서도 역시 LL-37 처리에 의하여 IL-17을 생산하는 세포가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 한편, LL-37의 receptor로 생각되는 P2X7 receptor mRNA 발현의 변화가 real time PCR에서는 확인되지 않았는데, 이 현상에 대해서는 세 가지 가능성을 생각할 수 있었다. 첫째는 실험에 사용된 세포 population이 전체 세포이어서 LL-37에 의하여 활성화 된 APC의 숫자가 상대적으로 적어 그 변화량이 보이지 않았을 가능성이 있으며, 둘째로는 Th17 세포에 대한 LL-37의 작용이 P2X7 receptor를 통한 것이 아니거나, 셋째로는 LP T cell에서는 LL-37이 직접적으로 영향을 미치지 보다는 다른 경로를 통하지 않을까 하는 가능성을 생각해 볼 수 있었다(그림 7b).

(다) 항 펩타이드 LL-37에 의한 PP lymphocyte의 Th17 세포로의 분화

PP lymphocyte로부터 LL-37 처리에 의한 Th17 세포의 분화를 확인하기 위하여 PP lymphocyte를 분리한 후 LL-37을 3일 간 처리한 후 IL-17을 발현하는 세포 population의 분포를 intracellular cytokine staining을 통한 flow cytometry를 이용하여 확인하였다(그림 8). 실험 결과 LL-37의 농도에 따라 IL-17을 발현하는 population이 변화함을 알 수 있었다. 따라서 점막의 면역 유도 기관인 PP에서 항 펩타이드 LL-37에 의해 Th17 세포 분화의 유도에 따른 점막 면역반응 조절이 가능함을 확인할 수 있었으며, 이는 LL-37과 같은 면역세포 modulator의 경구 백신 보조제로의 이용 가능성을 제시하는 결과라 할 수 있겠다.

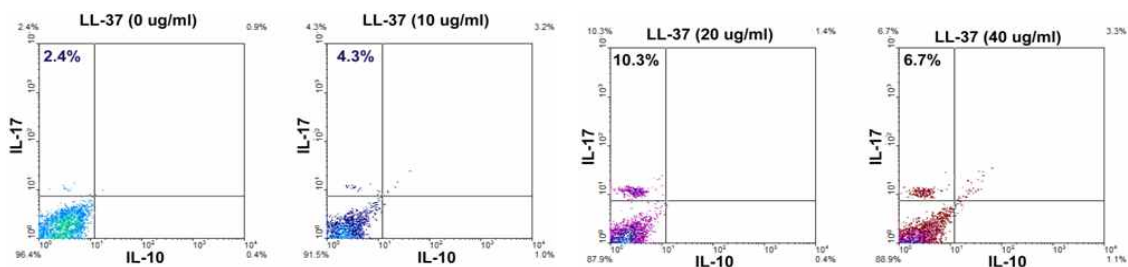
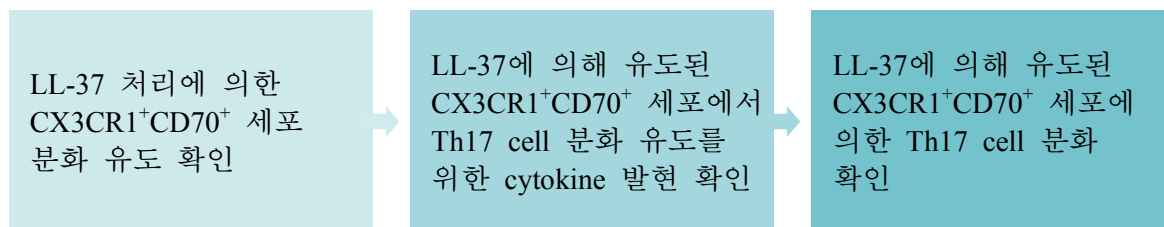


그림 8. Th17 cell population was differentiated by LL-37

(2) 소장 점막면역계의 유도조직에서 항 펩타이드 (LL-37)처리는 CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> 세포를 유도하여 Th17 cell을 유도함을 확인하였다.



(가) 점막의 유도 조직 Peyer's patch의 면역 세포들의 특징

Mucosal DC는 점막의 특별한 기능이나 역할 수행에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있

다. 예를 들어 점막의 DC는 항원에 대한 면역반응을 결정하는 중요한 기능을 하는데, 어떤 DC가 활성을 갖는 지에 따라 Th1, Th2 혹은 Th17 cell의 분화를 유도 할 수 있다고 알려져 있다 (Iwasaki A. 2007). 또한 점막 면역의 주요 활동 인자인 IgA의 isotype class switching에도 DC가 깊게 관여한다. 최근 밝혀진 Th17 cell은 점막에서 항원에 대한 T cell-dependent 와 -independent immune response를 모두 유도하는데 중요한 연결 고리 역할을 수행 할 뿐 아니라 polymeric IgR의 발현을 높여 SIgA의 증가에 관여하는 기능을 보이고 있다. 따라서 최근 경구 백신에서는 이러한 Th17 cell의 분화 조절에 많은 관심을 보이고 있다. Th17 cell 분화에 밀접하게 관여하는 CX3CR1<sup>+</sup> DC는 Th17 cell의 분화를 유도 할 뿐 아니라 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 특징을 가지고 있어 특히 점막 백신 유도에 주요 대상이 될 것으로 기대되지만 아직 CX3CR1<sup>+</sup> DC의 modulation 및 PP에서의 기능 대한 정보는 부족한 실정이다. 따라서 점막 유도조직 PP에서 CX3CR1<sup>+</sup> DC 와 Th17 cell의 분화 및 기능에 대한 연구는 경구 백신의 효율을 높이기 위해 꼭 필요한 기초 연구로 생각되어진다.

(나) 항 펩타이드 LL-37은 PP의 세포들로부터 CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> cell population 증가 유도함

점막의 유도 조직 PP로부터 collagenase와 Percoll gradient를 이용하여 분리한 lymphocyte의 CD4 depletion을 통해 CD4<sup>-</sup> PPL population을 준비했다. 준비된 CD4<sup>-</sup> PPL은 LL-37 1 $\mu$ M 혹은 10 $\mu$ M과 함께 3시간 동안 배양한 후 CD11c와 CX3CR1의 발현을 FACS로 확인하였다. 이전 결과에서 3시간 후 발현된 cytokine이 IL-6와 TGF- $\beta$ 로 Th17 cell 분화와 관련된 특성을 갖는 DC가 증가할 것으로 기대된 것처럼, CD11c와 CX3CR1을 모두 발현하는 세포가 LL-37의 처리농도 증가에 따라 증가한 것을 mRNA (그림 9)와 protein level에서 확인할 수 있었다(그림 10).

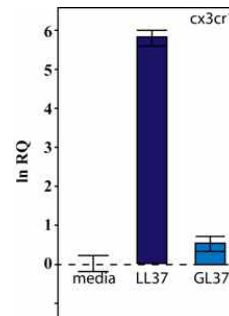


그림 9. CX3CR1 mRNA induced by LL-37 treatment on PPL

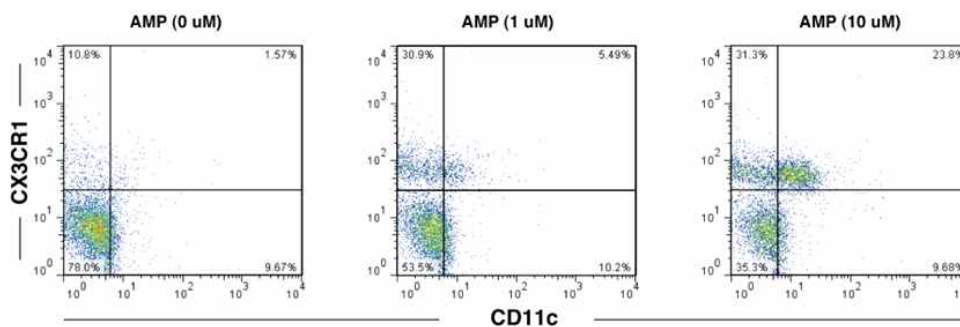


그림 10. CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> PPL modulation by LL-37 treatment

또한 CD70의 발현 특성도 CD4<sup>-</sup> PPL population에서 LL-37에 의해 영향을 받는지 확인하기 위해서 15분과 24시간 동안 배양 후 관찰한 결과 LL-37에 의해 CD70을 발현하는 세포들이 증가함을 확인할 수 있었다(그림 11). 예컨대, CD11c<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell population은 scrambled control peptide GL37과 ATP와 비교했을 때 LL-37만의 특징적인 효과임을 확인할 수 있었다 (그림 11).

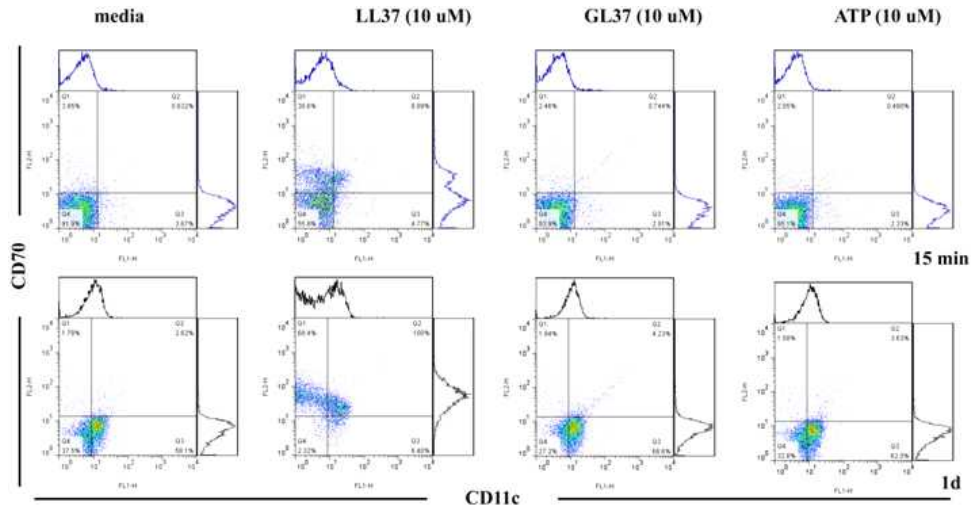


그림 11. Enhancement of CD11c<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell population in CD4<sup>+</sup> PPL conditioned by LL-37

점막의 lamina propria 에서의 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell population이 Th17 cell 분화 유도에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있지만, Peyer's patch에서는 그 특성이 보고된 것이 없었기 때문에 본 실험에서 LL-37에 의해 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell population이 유도 되었는지를 CLSM을 통해 확인하였다(그림 12).

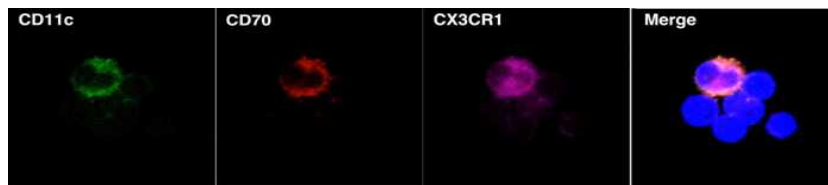


그림12. CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> PP cell population induced by LL-37

(다) 항 펩타이드 LL-37에 의해 유도된 CD11c<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> CD70<sup>high</sup> cell population은 Th2/17 cell 분화 유도 cytokine 분비

이러한 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell들이 이전에 LP에서 보고되어진 특징처럼 Th17 cell 분화 유도에서 역할을 하는지 확인하기 위하여 PPL에서 T cell 과 B cell을 microbead를 이용하여 depletion 한 후 얻은 세포들과 LL-37을 각각 IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, IFN- $\gamma$ , 그리고

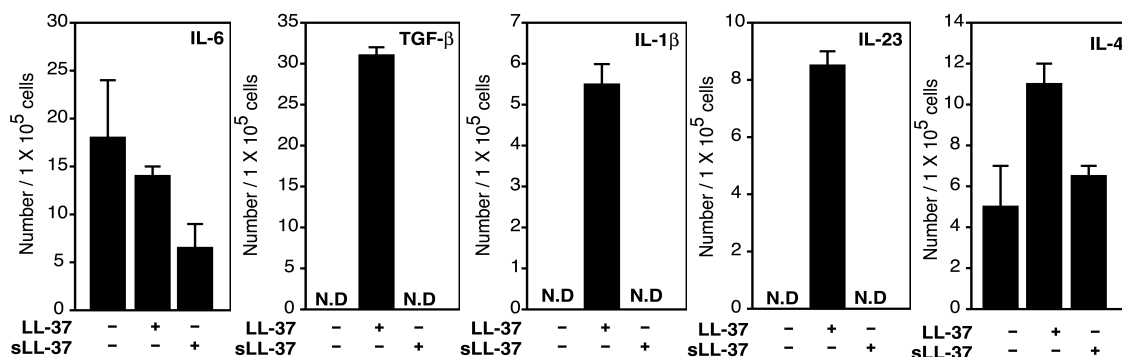


그림 13. Expression of cytokine to polarization of Th17 and Th2 cell in CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> cell induced by LL-37 treatment



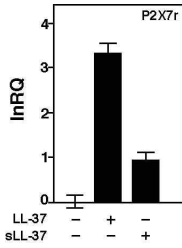


그림 14. Expression of P2X7 receptor known as LL-37 receptor in CD4<sup>+</sup> PPL modulated by LL-37

IL-4 cytokine에 대한 항체가 coating되어 있는 ELISPOT plate에서 12시간 동안 배양 후 각 그 특성을 확인하였다(그림 13).

이러한 특성들이 LL-37에 의한 결과임을 다시 검증하기 위하여 LL-37의 receptor로 알려진 P2X7 receptor의 발현을 real time PCR로 확인한 결과 scrambled peptide인 GL-37을 처리하였을 경우 P2X7 receptor의 발현 유도를 확인할 수 없었는데 비하여 LL-37을 처리하였을 경우 P2X7 receptor의 발현을 확인할 수 있었기 때문에 이러한 결과가 LL-37에 의하여 유도된 효과임을 알 수 있었다(그림 14).

이 결과들을 바탕으로 항 펩타이드 LL-37은 점막 유도 기관의 PP의 세포들로부터 Th17 cell 분화에 깊게 관여하는 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell population의 유도에 중요한 역할을 수행한다는 새로운 사실을 확인할 수 있었다.

(라) 항 펩타이드 LL-37에 의해 유도된 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell population은 *in vitro*에서 Th17 cell의 분화를 유도함

기존의 알려진 점막의 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell들처럼 LL-37에 의해 교육되어진 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> PPL들이 *in vitro*에서 Th17 cell의 분화를 유도하는지 확인하였다. 점막의 면역 유도조직인 PP로부터 collagenase와 Percoll gradient를 이용하여 분리한 lymphocyte는 CD4 depletion을 시켜 CD4<sup>-</sup> PPL population을 준비하였다. 준비된 CD4<sup>-</sup> PPL은 LL-37 10 $\mu$ M과 함께 1시간동안 배양한 후 spleen으로부터 분리된 CFSE로 staining 된 CD4<sup>+</sup> cell population을 5일 동안 함께 배양하였다. 5일째 IL-17A 와 IL-17F의 intracellular cytokine staining을 통해 분화된 Th17 cell population을 확인한 결과 positive control로 Th17 cell 분화를 유도하는 것으로 알려진 IL-6와 TGF- $\beta$ 와 함께 배양한 세포들처럼 LL-37에 의해 교육된 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> PPL과 함께 배양된 CD4<sup>+</sup> T cell들은 IL-17A과 IL-17F를 모두 발현하는 세포로 분화되었음을 알 수 있었다. 따라서 점막의 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> cell들처럼 LL-37에 의해 교육되어진 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> PPL들이 *in vitro*에서 Th17 cell의 분화를 유도할 수 있음을 확인하였다(그림 15).

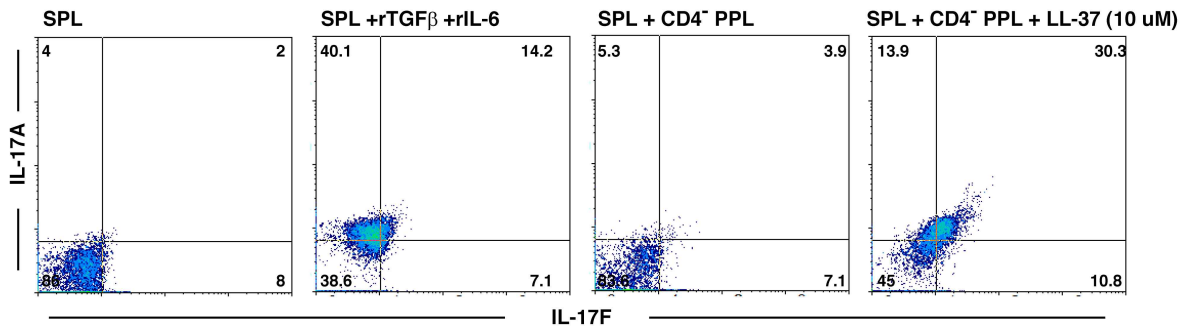
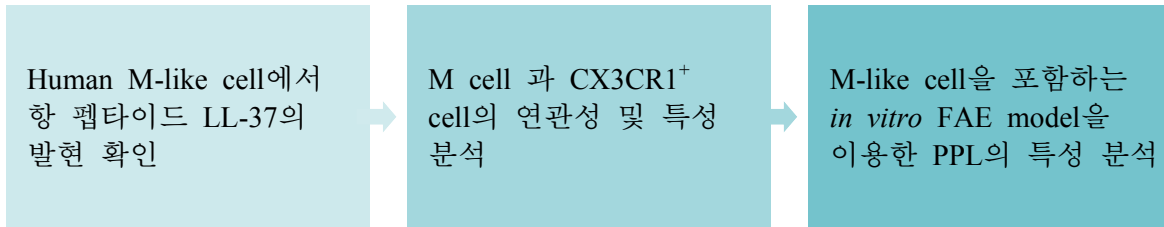


그림 15. Induction of *in vitro* Th17 cell differentiation by CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> PPL educated by LL-37

(3) In vitro human FAE model에서 LL-37의 발현 확인 및 CD11c<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> 세포들의 분화 유도에 따른 IL-17 secretory cell의 증가를 검증함.



(가) M cell에 의한 점막 면역유도조직의 특성화

점막에서의 특별한 면역 시스템은 점막이라는 환경으로부터 교육 되어진 세포들에 의해 이루어진다. 따라서 점막의 면역세포들을 교육할 수 있는 factor들에 대한 연구는 최근 점막 면역 연구에서 중요 흐름중 하나이다. 항 펩타이드는 점막의 paneth cell에서 주로 lumen으로 분비되는 것으로 알려져 있지만 점막내의 면역세포들에 대한 역할은 알려진 것이 부족하다.

점막 유도 조직의 가장 큰 특징은 외부항원의 유입이 자유로운 M cell의 존재이다. 따라서 M cell은 점막 유도조직에서 독자적인 환경을 구성하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 본 3차년도 연구에서는 이러한 M cell에서 이전 연구를 통해 면역세포의 modulation에 관여할 것으로 기대된 항 펩타이드 LL-37이 발현을 기대하였으며 이를 통한 면역세포의 특성분석을 진행하고자 하였다.

(나) Human M-like cell에서 분비되는 물질이 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> 세포 분화 유도함을 확인함.

PP의 가장 큰 특징 중 하나는 외부 항원 유입이 자유로운 특별한 M cell이 존재한다는 것이다. 이러한 M cell은 외부 항원 및 commensal bacteria 유입의 주요 통로이기 때문에 점막 면역반응 유도에서 중요한 위치에 있다. 따라서 commensal bacteria에 대한 mucosal homeostasis를 조절할 것으로 기대되는 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> 세포의 분화 유도에 관여 가능

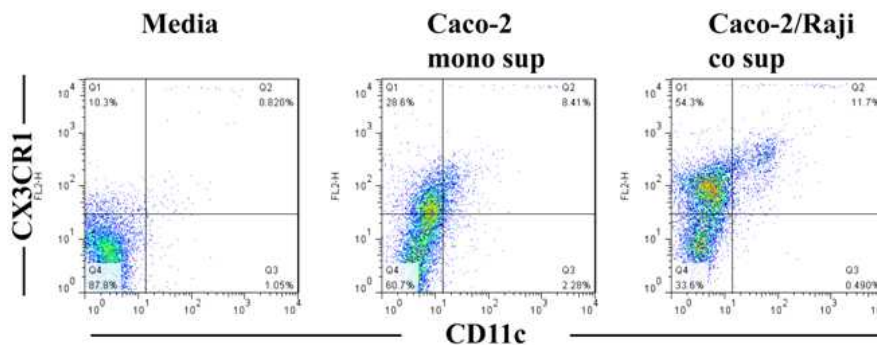


그림 16. Induction of CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> by M-like cell

성을 확인하고자 하였으며, M cell에서 특이적으로 분비되는 분자가 이들 세포의 분화 유도에 직접적으로 관여할 수 있음을 확인할 수 있었다(그림 16).

M cell에서 특이적으로 분비되는 물질 중 CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>high</sup> 세포의 분화 유도에 관여하는 물질이 LL-37일 가능성을 확인하기 위하여 Caco-2와 Raji cell을 이용한 in vitro M-like



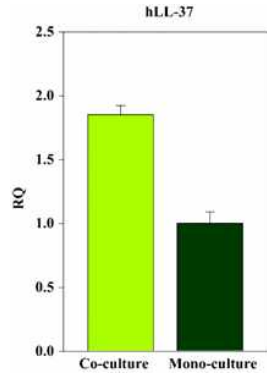


그림 17. Identification of LL-37 mRNA in M-like cell

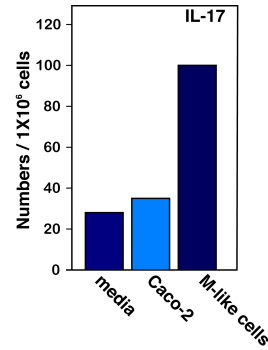


그림 18. Induction of IL-17 secretory cell in PPL by supernatant of M-like cell

cell co-culture model에서 cDNA를 얻은 후 항 펩타이드인 LL-37이 발현되는지 확인한 결과 Caco-2만 14일간 배양한 세포에서보다 M-like cell로 분화가 유도된 세포 group에서 LL-37 mRNA의 발현이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다(그림 17). 또한, M cell에서 분비되는 분자를 포함하는 culture supernatant로부터 modulated된 세포들이 주변 세포로부터 IL-17을 분비하도록 유도하는 것을 확인하였다(그림 18).

(다) Human M-like cell에서 항 펩타이드 LL-37의 발현 확인함

이전 연구로부터 확립되어진 *in vitro* M-like cell culture system으로부터 LL-37의 발현을 mRNA 및 protein level에서 확인 하였다. 그림 19에서 보는 것처럼 항 펩타이드 LL-37 mRNA level은 enterocyte-like cell로 분화된 Caco-2 cell 보다 M-like cell로 분화 유도된 cell에서 3배 이상 증가된 것을 LL-37-specific primer를 이용한 qRT-PCR에서 확인 하였다.

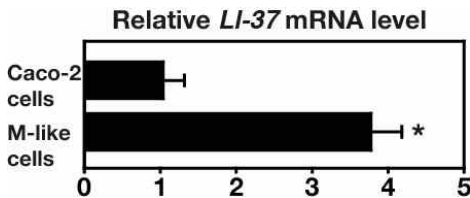


그림 19. Expression level of LL-37 mRNA in M-like cell

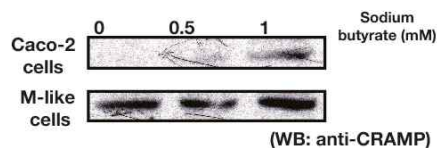


그림 20. Expression level of LL-37 protein in M-like cell

이러한 항 펩타이드의 발현은 Western을 통해 protein level에서 역시 확인 했다(그림 20). 항 펩타이드의 발현은 enterocyte like cell 의 경우 commensal bacteria의 대사산물이 sodium butyrate에 의해 증가되는 것이 관찰됨에 따라 장내 항상성 유지에 밀접하게 연관되어 있는 것으로 기대되어 3차년도 목표 중 하나인 M cell에서의 발현 단백질의 규명을 달성 했다.

(라) *In vitro* FAE model에서 점막 면역세포들의 CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> cell population으로의 특성화

LL-37을 발현하는 M-like cell을 포함하는 *in vitro* follicle associated epithelium (FAE) model에서 점막 면역세포들의 특성화를 확인하기 위해 *in vitro* FAE model을 확립 했다(그림 21).

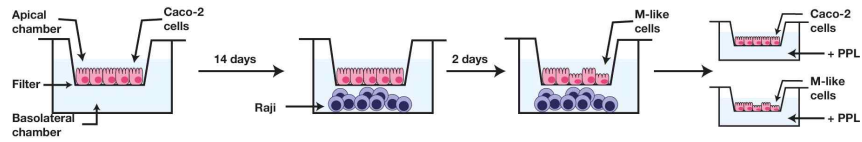


그림 21. *In vitro* FAE model

확립된 *in vitro* FAE model에서 PPL의 CX3CR1과 CD70에 대한 특성분석을 FACS로 진행한 결과 *in vitro* M-like cell을 포함하는 FAE에 modulation된 PPL은 CD70 과 CX3CR1의 발현이 증가되는 것을 확인한 반면 M-like cell을 포함하지 않는 enterocyte에 modulation된 PPL에서는 CD70의 발현의 증가는 보이지 않고 CX3CR1의 증가만 확인 되었다. 따라서 M-like cell로부터 유도되는 환경은 점막의 면역 세포들 중 CD70<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> cell population의 유도과 연관 있을 것으로 기대되었다. 이러한 특성은 splenocyte에서는 보이지 않았기 때문에 점막의 특이적 면역유도 세포와 연관이 있을 것으로 보인다(그림 22). 또한 *In vivo* mouse PP에서 M cell 과 밀접하게 위치하고 있는 CX3CR1<sup>+</sup> cell을 확인 하여 M cell 로부터 유래되는 항 펩타이드가 CX3CR1<sup>+</sup> cell 유도와 연관 가능성을 보다 높게 했다(그림 23).

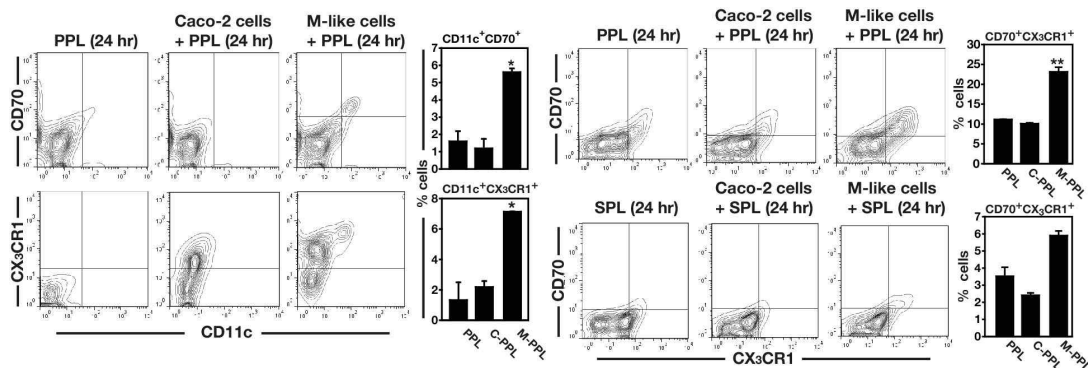


그림 22. Expression of CD70 and CX3CR1 in CD11c<sup>+</sup> cell was modulated by cultured M-like cell

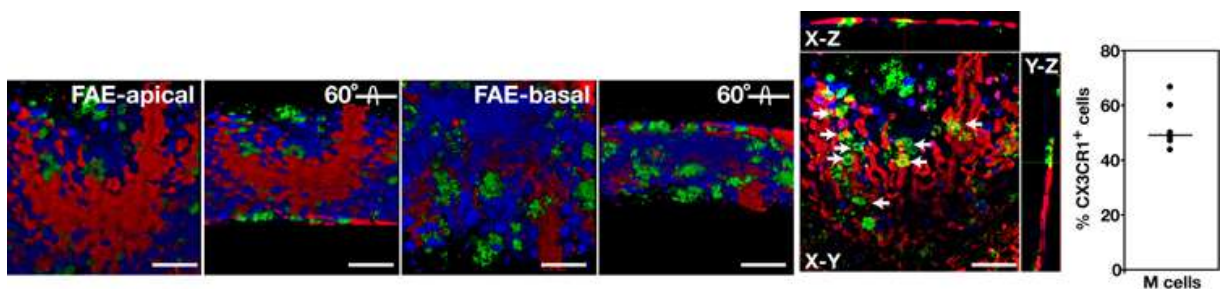


그림 23. CX3CR1<sup>+</sup> cell were localized nearby M cell in PP

CD70<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> cell population은 PP에서는 그 기능이 알려져 있지 않지만, lamina propria에서는 Th17 cell differentiation에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 1, 2차년도 연구에서 항 펩타이드 LL-37에 의해 유도되는 CD70<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> cell population이 Th17 cell 분화 유도와 밀접하게 관련되어있었기 때문에 M-like cell을 포함하는 FAE model에서 PPL들에서 Th17 cell의 transcription factor중 하나인 STAT-3의 phosphorylation 및 IL-17A secretory cell의 변화를 관찰하였다.

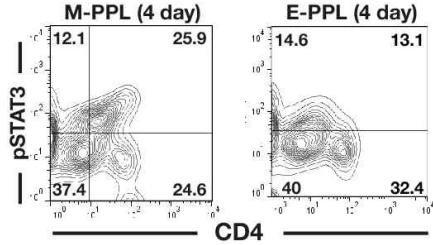


그림 24. STAT-3 phosphorylation of PPL modulated by M-like cell

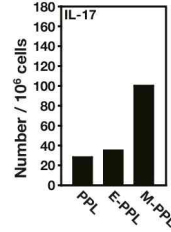


그림 25. IL-17A secretory cell in PPL modulated by M-like cell

그림 24 과 25에서 보는 것처럼 M-like cell을 포함하는 FAE model에 의한 modulation은 PPL중 CD4<sup>+</sup> cell에서 Th17 cell 분화와 관련된 STAT-3의 phosphorylation을 증가시켰으며 이는 IL-17A의 발현하는 세포수의 증가로 연결되었다. 따라서 M-like cell을 포함하는 FAE model에서의 PPL의 modulation은 항 펩타이드 LL-37에 의해 유도된 PPL의 cell들과 특성이 유사하기 때문에 M-like cell로부터 유래되는 항 펩타이드 LL-37에 의한 결과로 해석 할 수 있다.

(마) 점막 유도조직에서 항 펩타이드에 의한 CX3CR1<sup>+</sup> 세포들에 의한 IL-17 secretory cell 증진 검증함

항생제 vancomycin 과 polymyxin B를 이용한 commensal bacteria의 감소는 CX3CR1<sup>+</sup> cell population의 감소를 유도하고 lamina propria에서 Th17 cell을 줄이는 것으로 알려져 있다. 따라서 항생제 vancomycin 과 polymyxin B를 이용한 *in vivo* mouse model을 확립한 후 항 펩타이드의 발현에 영향을 주는 것으로 알려진 sodium butyrate(SB) 나 cholera toxin(CT)의 경구 투여를 통해 M cell 주변의 CX3CR1<sup>+</sup> cell의 변화 및 Th1/2/17 cell의 polarization에 대해 확인 하였다.

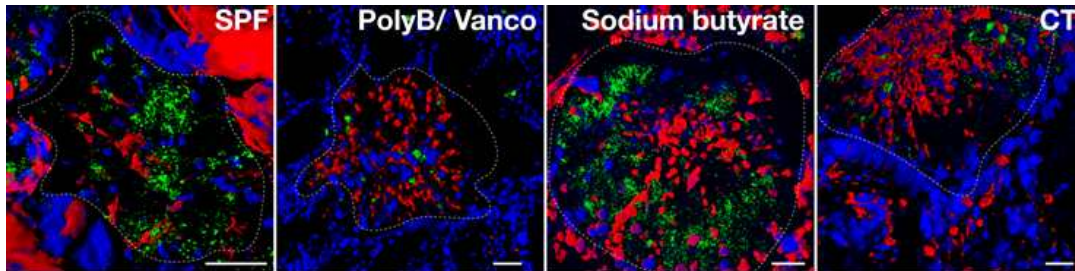


그림 26. CX3CR1<sup>+</sup> cell were localized nearby M cell in PP obtained from mice orally administered with polymyxin B and vancomycin or sodium butyrate, or cholera toxin

그림 26에서 보이는 것처럼 항생제가 투여된 mouse PP의 경우 CX3CR1<sup>+</sup> cell이 M cell 주변에서 감소 된 반면 sodium butyrate가 투여된 mouse에서는 CX3CR1<sup>+</sup> cell이 PP에서 증가한 것으로 보였다. 또한 항 펩타이드의 발현을 감소시키는 것으로 알려진 CT의 투여는 CX3CR1<sup>+</sup> cell의 감소를 유도 하였다. CX3CR1<sup>+</sup> cell수의 변화가 PPL의 T cell에서의 영향을 확인 한 결과 SB의 경구 투여는 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cell을 증가 시킬 뿐 아니라 CD4<sup>-</sup> IL-17A<sup>+</sup> cell 또한 함께 증가시키는 것을 확인하였다(그림 27 와 28). 따라서 M cell로부터 유래되는 항 펩타이드의 발현 및 점막의 commensal bacteria로부터 유래되는 항 펩타이드의 발현은 점막의 유도 조직의 면역세포들을 특성화 할 뿐 아니라 면역반응 조절에도 깊게 관여하는 것을 확인 하였다.

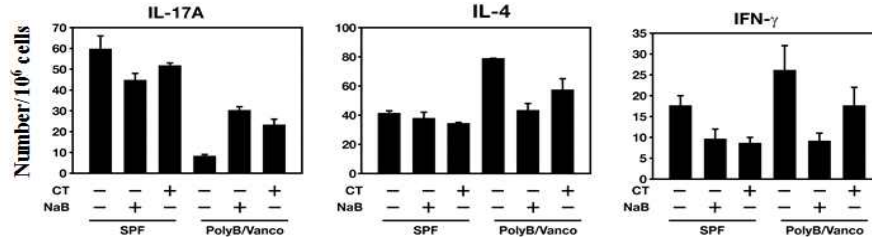


그림 27. Analysis of Th1/2/17 cell in PPL obtained from mice treated by CT or SB

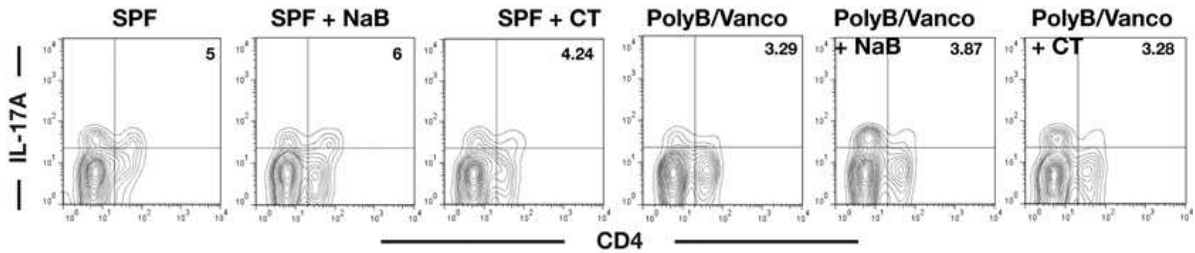
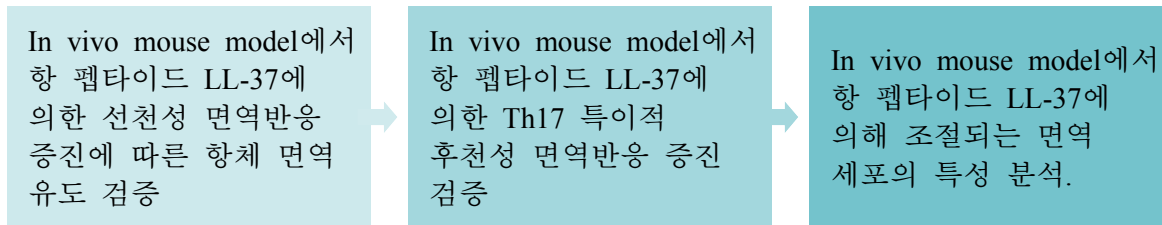


그림 28. Analysis of CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> cell in PPL obtained from mice treated by SB or CT

(4) In vivo mouse model에서 항 펩타이드(LL-37)에 의한 점막 면역 유도조직의 선천 면역계 활성화 증진에 의한 후천성 면역 증진 검증.



(가) 선천성 면역계 조절에 따른 후천성 면역계의 특성화

점막은 많은 균에 직접 노출되어 있기 때문에 유입되는 항원에 대하여 tolerance를 주로 유도하는 환경을 가지고 있다. 점막으로 유입되는 많은 병원균은 선천면역계를 통하여 점막면역 시스템을 조절하는 것으로 알려지고 있다. 예를 들어 *Bacteroides fragilis*는 장내 세균인 동시에 sepsis 유발균으로서 unusual capsular polysaccharide A(PSA)를 분비하여 점막에서 tolerogenic dendritic cell(DC)에 의한 Treg 분화를 유도하며, host 면역체계가 약해질 때 침투하여 sepsis를 유도함으로써 점막면역반응의 조절에 관여한다(Mazmanian et al., 2008). Segmented filamentous bacteria(SFB)는 소장의 ileum Peyer's patch 표면에 colonization하는 공생세균으로서 점막 상피 세포로부터 serum amyloid A의 분비를 유도하여 점막 DC에서 IL-6와 IL-23의 발현을 증진시키는데, 이 두 cytokine에 의해 점막의 Th17 cell 분화가 유도됨이 알려져 있다(Ivanov et al., 2009). Commensal bacteria인 *Clostridium cluster IV* 및 XIVa는 대장 epithelial cell로부터 matrix metalloproteinase 및 indolamine 2,3-dioxygenase의 분비를 유도하여 TGF- $\beta$ 를 활성화함으로써 naive T cell의 iTreg로의 분화를 유도하여 장내 tolerance 유지에 관여한다(Atarashi et al., 2011). 또한 점막에 거주하는 공생 세균의 대사산물은 점막 면역계 조절에 밀접하게 연관되어 있다. 장내세균의 2차 대사산물인 short-chain fatty acid(acetate, butyrate 및 propanoate)

는 점막 상피세포의 증식 및 pro-inflammatory cytokine의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으며, VitA의 대사산물인 retinoic acid는 점막의 Treg cell 생성 및 Th17 cell 억제에 관련하여 장내 항상성 유지에 관여한다(Blais et al., 2007, Mora et al., 2006). 지질 대사산물인 sphingosine 1-phosphate(S1P)은 점막 상피세포에서 발현되는 alkaline sphingomyelin으로부터 생성되어 면역 세포의 이동, 활성화 및 생존을 조절하여 장내 항상성 유지에 관여한다(Gohda et al., 2008). 따라서 선천면역 시스템 활성화에 따른 후천면역 시스템의 조절은 점막 면역시스템 조절에 밀접하게 연관되어 있다. 체내에서 발현되는 항 펩타이드에 의한 선천성 면역계 조절은 전신 면역시스템에서는 알려져 있기 때문에 점막 면역계에서도 그 기능이 기대되고 있다.

(나) 항 펩타이드 LL-37에 의한 점막 면역 유도조직에서 선천성 면역반응 증진 확인함

항 펩타이드 LL-37의 선천면역 유도 가능성은 이전 다른 연구들에서 제시되어 왔으나 점막 면역계에서는 아직 연구된 보고가 없다. 따라서 앞선 연구를 통해 확인한 항 펩타이드 LL-37에 의한 점막 유도조직의 CX3CR1<sup>+</sup> cell의 분화 유도가 선천면역유도에 의한 결과일 가능성을 확인하기 위해 실험을 진행하였다.

점막의 면역 유도조직 peyer's patch에서 collagenase처리에 의해 준비된 세포들과 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질을 함께 12시간 동안 배양 후 세포들에서부터 cytokine과 chemokine의 mRNA의 발현 양상을 PCRarray를 통해 확인하여 95% 이상의 신뢰도를 갖는 결과값을 표1로 나타내었다. 아무것도 처리되지 않은 peyer's patch 세포들이 발현하고 있는 mRNA를 기준으로 LL-37을 포함하지 않는 재조합 단백질 EGFP 혹은 LL-37을 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL37의 처리에 의해 증가하는 mRNA들을 비교하였다(표2).

표2. Mouse cytokines and chemokine genes

Fold regulation			Fold regulation		
Symbol	EGPF	EGFP-LL-37	Symbol	EGPF	EGFP-LL-37
Adipoq	1.0973	51.8964	Hc	1.1411	53.9674
Bmp2	1.0858	51.351	Ifna2	1.9062	36.318
Bmp4	1.1411	53.9674	Ifng	1.4057	44.7018
Bmp6	1.0407	36.9848	Il10	-1.0045	24.9275
Bmp7	1.211	24.4028	Il11	1.1411	53.9674
Ccl1	1.1411	53.9674	Il12a	-1.297	-4.5776
Ccl11	-2.783	12.2041	Il12b	1.1411	53.9674
Ccl12	1.1411	53.9674	Il13	1.1411	53.9674
Ccl17	1.4287	7.501	Il15	-1.2674	26.8436
Ccl19	1.0468	66.8573	Il16	-1.2707	-5.4475
Ccl2	1.5481	40.4948	Il17a	-1.0797	25.5377
Ccl20	1.6599	33.1152	Il17f	1.1701	3.2353
Ccl22	1.2156	2.9401	Il18	1.0328	7.974
Ccl24	-1.2366	37.4233	Il1a	5.9916	12.2562
Ccl3	1.2632	1.4129	Il1b	8.9587	12.8789
Ccl4	-1.2004	1.3725	Il1rn	3.4941	9.2534
Ccl5	-1.6339	2.9949	Il2	1.4297	30.1591



Ccl7	1.1618	53.9674	Il21	-1.3172	33.2534
Cd40lg	-1.4042	6.0282	Il22	1.6857	3.3382
Cd70	1.0864	26.8147	Il23a	-1.1476	32.9452
Cntf	-1.1615	1.3983	Il24	-1.0806	27.7629
Csf1	-1.3412	8.4735	Il27	1.1411	53.9674
Csf2	-1.5795	-1.2695	Il3	1.1411	53.9674
Csf3	2.266	39.7399	Il4	1.51	20.8128
Ctfl	1.1312	46.9509	Il5	-1.4215	26.322
Cx3cl1	1.3998	15.9457	Il6	2.0117	62.3486
Cxcl1	3.7524	46.8963	Il7	1.1411	53.9674
Cxcl10	2.4583	53.9674	Il9	1.0206	45.0723
Cxcl11	1.1411	53.9674	Lif	1.1273	53.317
Cxcl12	-1.1276	55.0322	Lta	-1.6272	4.7635
Cxcl13	-1.6284	27.7301	Ltb	-1.1824	-2.9775
Cxcl16	1.0312	5.9215	Mif	1.154	-6.4612
Cxcl3	10.1647	9.8964	Mstn	1.0087	47.7046
Cxcl5	2.8638	53.9674	Nodal	-1.2807	36.9281
Cxcl9	1.1411	53.9674	Osm	1.1829	3.6968
Fasl	-1.3502	35.0288	Pf4	-1.1844	26.6503
Gpi1	-1.1516	-4.3167	Ppbp	1.1981	44.6548
Spp1	2.3729	6.203	Tnfsf10	1.3603	14.1021
Tgfb2	1.1411	53.9674	Tnfsf11	-2.2071	3.753
Thpo	-1.2936	31.5091	Tnfsf13b	-1.1056	42.7791
Tnf	1.0268	3.3787	Vegfa	-1.6101	-2.5961
Tnfrsf11b	1.1411	53.9674	Xcl1	-1.3279	17.1803

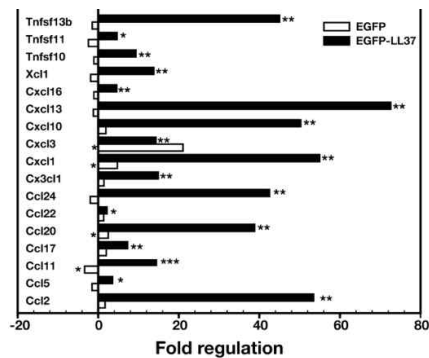
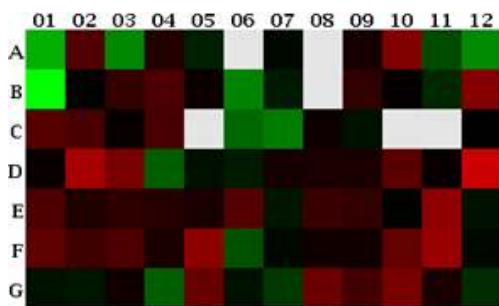


그림 29. Chemokine and cytokine 그림 30. Enhancement of chemokine mRNAs by PCRarray profiling LL-37 conjugated antigen in Peyer's patch lymphocytes

또한 LL-37을 포함하지 않는 재조합 단백질 EGFP에 의해 조절되는 mRNA에 비교하여 LL-37을 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37에 의해 조절 되는 chemokines의 특성을 비교해 왔다(그림29와 30).

그 중 chemokine들의 발현의 증가는 재조합 단백질과 함께 구성되어있는 LL-37이 이전에 알려진 본래의 특성으로 작용하는 것을 CXCL1 과 같은 neutrophil 관련 chemokiens의 증가를 통해 알 수 있다(그림 29). 또한 LL-37을 포함하는 재조합 단백질은 점막 면역유도조직의 세포들로부터 CX3CR1의 리간드 CX3CL1의 발현을 높이는 것으로 보아 LL-37에 의한 CX3CR1<sup>+</sup> cell의 분화 유도는 항 펩타이드에 의한 선천면역 활성화에 의한 결과로 해석 된다(표2). 그 이외에 LL-37을 포함하는 재조합 단백질은 CXCL13 과 BAFF의 발현을 보다 높게 유도하는 것이 관찰 되었는데, 이는 특히 점막 유도 조직 peyer's patch의 germinal center 형성과 밀접하게 연관되어있는 것으로 해석된다(그림30).

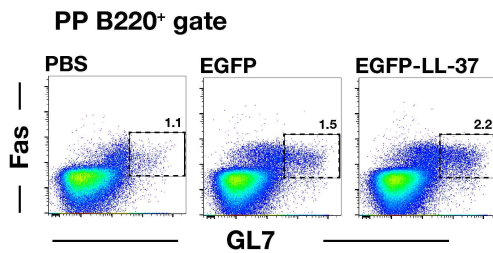


그림 31. Enhancement of peyer's patch germinal center B cell by oral administration with EGFP-LL-37

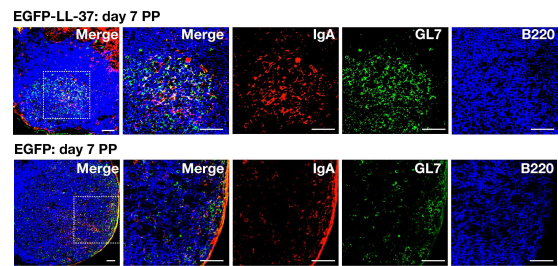


그림 32. Enhancement of peyer's patch germinal center B cell follicle formation by oral administration with EGFP-LL-37

In vitro에서 관찰된 특성이 in vivo에서 유도되는지 확인하기 위해, LL-37을 포함하지 않는 재조합 단백질 EGFP, LL-37을 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37을 각 각 mouse에 경구 투여한 후 7일 후 peyer's patch 세포들로부터 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal center B cell의 분포를 flow cytometry를 이용하여 확인한 결과 LL-37을 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37이 경구 투여된 mouse의 germinal center B cell이 증가된 것을 확인하였다(그림 31). Peyer's patch는 장내세균에 지속적으로 노출되는 환경에 의해 항상 germinal center가 형성 되어 있지만 LL-37을 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37이 경구 투여된 mouse의 peyer's patch에서 GL-7으로 구별되는 B cell follicle이 보다 선명하게 구성되는 것을 CLSM을 이용하여 확인하였다(그림 32).

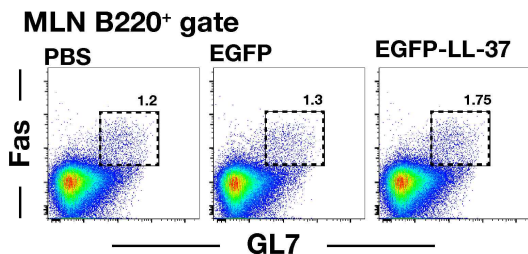


그림 33. Enhancement of mesenteric lymph node germinal center B cell by oral administration with EGFP-LL-37.

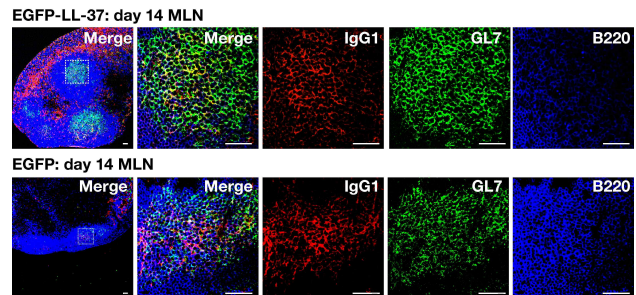


그림 34. Enhancement of mesenteric lymph node germinal center B cell follicle formation by oral administration with EGFP-LL-37.

또한 경구 투여를 통해 유입된 항펩타이드를 포함한 재조합 단백질 EGFP-LL-37은 점막 면



역계에서 뿐만 아니라 전신 면역계의 활성을 유도함을 mesenteric lymph node에서 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal B cell 증진 및 GL7<sup>+</sup> germinal B cell follicle형성 확인을 통해 항 펩타이드 LL-37에 의한 점막 선천면역계 증진을 확인했다.

점막에서 cytokine은 주변 환경의 면역반응을 자극하는 주요 요인 중 하나이다. LL-37 결합 재조합 단백질 EGFP-LL-37을 점막 유도조직의 면역 세포에 12시간동안 함께 배양을 통해 inflammatory cytokine (IL-2, IL-5, IL-17A, IL-21, IL-23a) mRNA의 증가 유도를 PCRarray를 통해 확인 하였으며(그림 35, 표3), culture supernatant로부터 각 cytokine을 BD™Cytometry Bead Array(CBA)로 IL-6, IL-17A의 발현이 LL-37을 포함하는 재조합 단백질에 의해 in vitro에서 점막면역유도세포들로부터 증가하는 것을 확인하였다(그림 36).

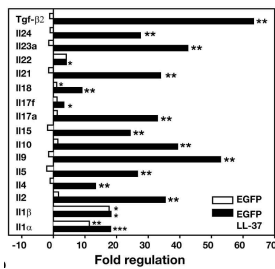


그림 35. Cytokine mRNA profiling by treatment with LL-37 conjugated antigen in PPL

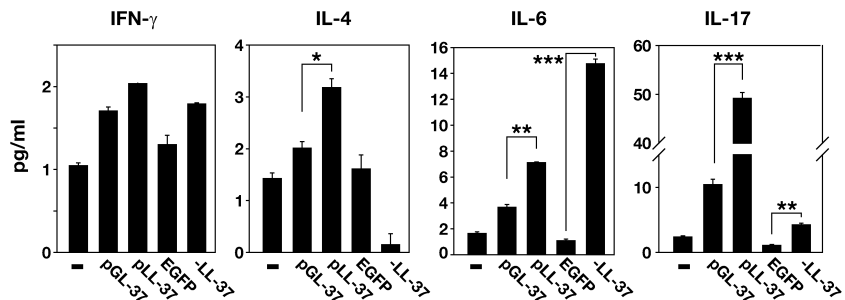


Figure 36. Enhancement of expression level of proinflammatory cytokines in peyer's patch cell by treatment with LL-37 or LL-37 conjugated recombinant protein.

이러한 inflammatory cytokine은 선천성 면역계 활성을 도울 뿐 아니라 후천성 면역계 활성의 중재자 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 선천면역계와 후천면역계는 dendritic cell과 같은 antigen presenting cell에 의해 중재된다. 따라서 앞선 연구에서 확인한 in vitro에서 항 펩타이드 LL-37에 의한 CX3CR1<sup>+</sup> cell의 분화 유도처럼 in vivo에서 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여가 antigen presenting cell을 활성화 할 수 있을 것으로 기대하고 실험을 진행하였다.

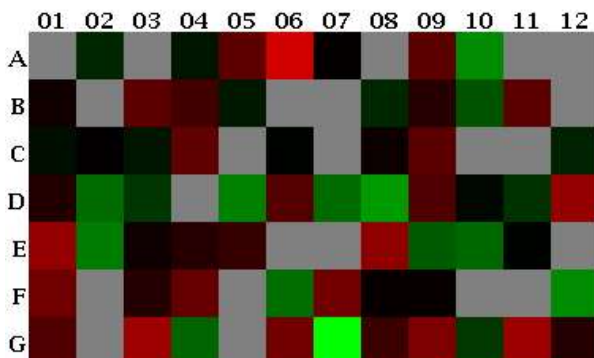


그림 37. Gene regulation by LL-37 in peyer's patch CD11c<sup>+</sup> cell

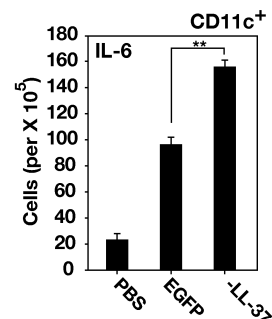


그림 38. IL-6 secretory CD11c<sup>+</sup> PP DCs induced by LL-37 conjugated antigen

Mouse peyer's patch의 CD11c<sup>+</sup> cell은 CD11c MicroBeads를 이용하여 autoMACS로 분리되었다. 분리된 CD11c<sup>+</sup> cell은 항 펩타이드 LL-37에 15분 동안 자극된 후 RNA를 확보하여 cytokine

and chemokine 관련 mRNA의 변화를 PCRArray로 분석하여 proinflammatory cytokine들이 LL-37에 의해 발현 유도됨을 확인하였다.(그림37, 표3). 또한 LL-37을 포함하지 않거나 포함하는 재조합 단백질은 각 mouse에 경구 투여 후 2일에 peyer's patch로부터 CD11c<sup>+</sup> cell을 MACS를 이용하여 확보 후 분비하는 cytokine을 ELISPOT을 이용하여 분석 했을 때 EGFP-LL-37이 경구 투여된 마우스에서 얻어진 CD11c<sup>+</sup> cell이 보다 많은 IL-6를 분비하고 있는 것을 확인하였다(그림38).

표 3. Mouse cytokines and chemokine genes in CD11c<sup>+</sup> cell

Symbol	CD11c <sup>+</sup> LL-37	Symbol	CD11c <sup>+</sup> LL-37	Symbol	CD11c <sup>+</sup> LL-37
Symbol	Fold Change	Symbol	Fold Change	Symbol	Fold Change
Adipoq	0.8529	Cxcl1	0.7956	Il24	0.3029
Bmp2	0.6499	Cxcl10	2.9784	Il27	0.9496
Bmp4	0.8529	Cxcl11	0.8529	Il3	0.8529
Bmp6	0.8042	Cxcl12	0.9766	Il4	3.5516
Bmp7	2.9254	Cxcl13	0.8529	Il5	0.8529
Ccl1	10.901	Cxcl3	2.7787	Il6	1.4901
Ccl11	1.0505	Cxcl5	0.8529	Il7	3.1261
Ccl12	0.8529	Cxcl9	0.8529	Il9	0.8529
Ccl17	2.8298	Fasl	0.6816	Lif	0.2883
Ccl19	0.2068	Hc	0.2948	Lta	3.6151
Ccl2	0.8529	Ifna2	0.5392	Mstn	0.8529
Ccl20	0.8529	Ifng	0.8529	Nodal	0.8529
Ccl24	0.8529	Il10	0.2301	Osm	0.2066
Ccl3	2.8613	Il11	2.5911	Pf4	2.4711
Ccl4	2.0683	Il12b	0.17	Ppbp	0.8529
Ccl7	0.8529	Il13	2.498	Spp1	6.0682
Cd40lg	0.8529	Il16	0.5744	Tgfb2	0.3259
Cd70	0.6312	Il17a	5.47	Thpo	0.8529
Cntf	1.5194	Il17f	5.4368	Tnf	3.6264
Csf1	0.3833	Il18	0.2469	Tnfrsf11b	0.056
Csf2	2.8584	Il2	0.8529	Tnfsf10	1.9438
Csf3	0.8529	Il21	0.8529	Tnfsf11	4.1971
Ctfl	0.8628	Il22	5.2474	Tnfsf13b	0.5274
Cx3cl1	1.0155	Il23a	0.3496	Vegfa	5.907

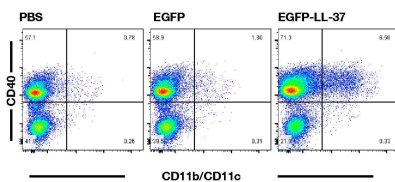


그림 39. Increasing of peyer's patch CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> cell by oral administration with EGFP-LL-37

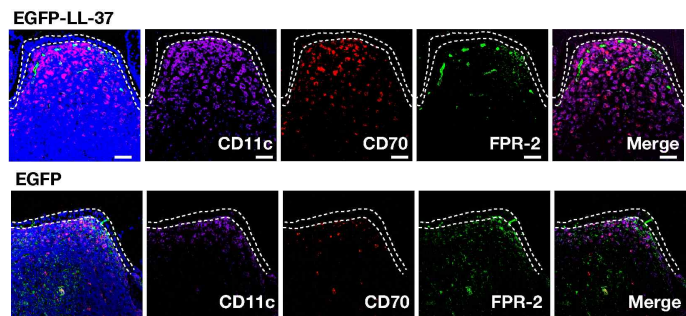


그림 40. Enhancement of CD11c<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> cell recruitment into peyer's patch by oral administration with EGFP-LL-37

항 펩타이드 LL-37에 의한 Peyer's patch antigen presenting cell의 활성화는 EGFP-LL-37이

경구 투여된 mouse의 peyer's patch 세포들 중 CD11b 혹은 CD11c를 발현하는 세포들에서 CD40의 증가를 flow cytometry를 통해 검증하였고(그림 39), CD70의 발현을 CLSM을 이용하여 검증하였다(그림 40). 이때 항 펩타이드 LL-37의 receptor로 알려진 formyl peptide receptor 2가 peyer's patch내의 세포들에서 발현되고 있는 것으로 보아 항 펩타이드에 의한 선천 면역 증진은 chemoattractive effect와 cytokine 분비로 peyer's patch antigen presenting cell을 조절하는 것으로 기대된다. 따라서 항 펩타이드 LL-37은 점막 유도조직에서 chemokien 및 cytokine 유도를 통해 면역 증강을 야기하는 환경을 구성하는 요소로 작용할 것으로 해석된다.

(다) 항 펩타이드 LL-37에 의한 Th17 특이적 후천성 면역반응 증진 검증

면역 활성이 억제되는 점막의 환경은 TGF-β와 같은 regulatory cytokine을 지속적으로 분비하고 있기 때문에 IL-6의 분비는 regulatory T cell의 유도에서 Th17 cell 분화 유도와 밀접하게 연관되어 있다. 따라서 항 펩타이드 LL-37에 의해 활성화된 선천면역계로부터의 IL-6 분비는 Th17 cell 분화 유도와 밀접하게 연결되어 있을 것으로 기대되었다. Peyer's patch로부터 분리된 세포들은 각 농도에 따른 항 펩타이드 LL-37 및 scramble peptide GL-37에 의해 3 시간 동안 함께 배양된 후 다시 72시간 동안 배양 후 PMA, calcium ionophore, 와 BD GolgiStop을 이용하여 stimulation 후 intracellular cytokine staining을 통해 FoxP3<sup>-</sup> IL-17<sup>+</sup> 세포들을 flow cytometry를 이용하여 확인하였다(그림 41). 항 펩타이드 LL-37에 의해 in vitro에서 FoxP3<sup>-</sup> IL-17<sup>+</sup> cell population의 polarization을

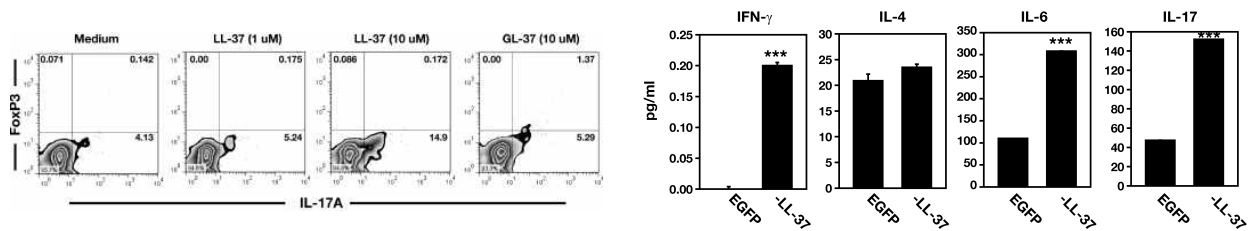


그림 41. In vitro Th17 cell polarization by stimulation with LL-37 peptide in PPL

그림 42. Enhancement of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> PP cell by oral administration with LL-37 conjugated EGFP

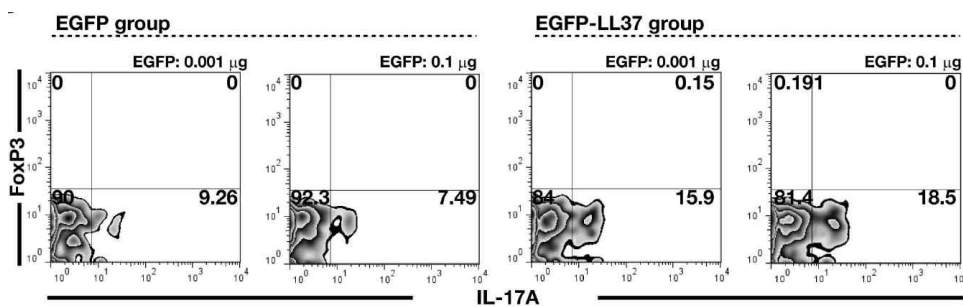


그림 43. Proliferation of memory Th17 cell against antigen at day 7 after oral priming with LL-37 conjugated antigen 유도할 수 있음을 확인했다(그림 42).

항원 EGFP만을 혹은 항 펩타이드가 결합한 항원 EGFP-LL-37의 경구 투여 14일 후 점막 유도조직의 CD4<sup>+</sup> 세포만을 MACS를 통해 분리한 후 항원 EGFP의 재 자극에 의해 분비된 cytokine을 BD™Cytometry Bead Array(CBA)로 분석한 결과 EGFP-LL-37에 의해 분비된 IL-6와 IL-17이 3배 이상 증가함을 확인했다(그림 42). 또한 이 Th17세포들이 항원에 특이적으로 반응

하는지 확인 하기 위해, 분리된 CD4<sup>+</sup> T cell을 CFSE를 이용하여 tagging 한 후 항원을 포함하고 있는 peyer's patch cell과 함께 3일간 배양 후 flow cytometry를 이용하여 검증한 결과 EGFP가 경구 투여된 mouse로부터 얻은 CD4<sup>+</sup> T cell은 항원에 반응하여 증식하지 않지만, EGFP-LL-37이 경구 투여된 mouse로부터 얻은 CD4<sup>+</sup> T cell은 항원이 증가함에 따라 증식하는 것을 확인하였다(그림43).

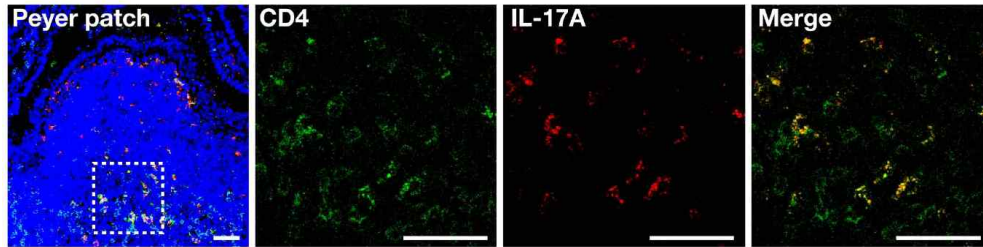


그림 44. Localization of memory Th17 cell in germinal center extrafollicular area after oral priming with LL-37 conjugated antigen

특히 이때 Th17 세포들은 점막 유도조직 PP의 germinal center 근처에 모여 있는 것을 확인 했다(그림 44). IL-17은 germinal center에서 B cell recruitment 및 memory B cell 형성에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 항 펩타이드 LL-37에 의한 선천면역 증진에 따른 Th17 세포의 분화 유도는 항원 특이적 후천성 면역반응 증진을 도울 것으로 해석된다.

(5) 결론 1

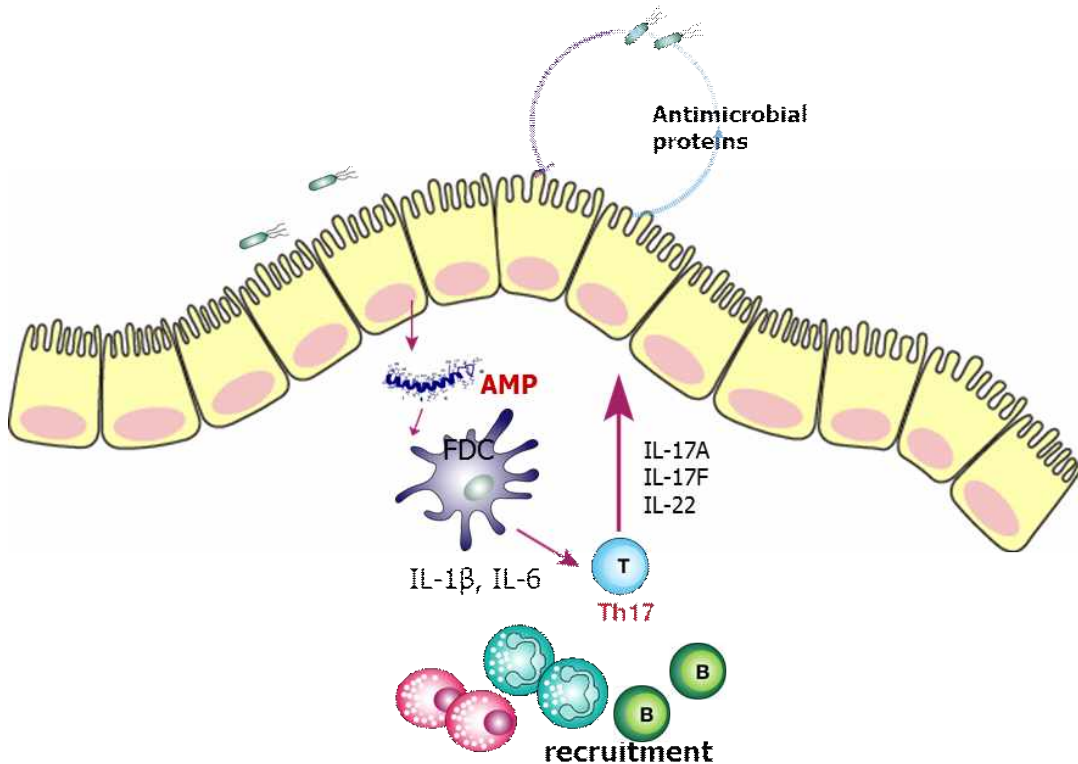


그림 45. Conclusion 1.

본 연구를 통해 항 펩타이드 LL-37은 점막 면역유도조직에서 CX3CR1<sup>+</sup>cell 및

CD11c<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> 세포의 활성화에 의한 선천 면역계 활성을 통해 Th17세포가 우세적으로 polarization 할 수 있는 proinflammatory 환경을 구성할 수 있음을 확인하였다. 또한, follicular dendritic cell에서 LL-37에 대한 receptor FPR-2의 발현확인 및 LL-37 처리에 따른 CXCL13, IL-4, TGF- $\beta$ 의 발현 증진을 확인을 통해 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 peyer's patch 및 mesenteric lymph node에서의 germinal center B cell follicle의 빠른 형성 및 T cell dependent 면역반응 증진이 항 펩타이드 자극에 의한 결과임을 확인 했다. 이러한 결과들을 바탕으로 항 펩타이드 LL-37을 결합한 항원의 경구백신으로의 이용은 항원 특이적 점막 및 전신계 항체 면역반응을 증진 시킬 뿐 아니라 점막 DC 활성화에 의한 경구 내성 극복 및 항원 특이적 면역반응 유도를 효과적으로 이끌어 낼 것으로 기대한다.

나. 항 펩타이드를 이용한 경구 백신 보조제 개발

(1) M cell과 경구백신 보조제

점막은 많은 병원균 및 항원에 노출되어 외부 물질의 유입을 긴밀하게 조절하고 있다. 점막의 M cell은 주변 세포들과 달리 얇은 glycocalyx 층과 짧고 불규칙한 microvilli를 갖는 세포로 점막면역계로의 항원 유입경로인 동시에 병원균의 주요 감염경로이다(Corr et al., 2008). 예를 들어 식중독 원인균(*S. enterica serovar Typhimurium*)은 M cell로의 감염에 type III secretion system을 이용하여 M cell에 우선적으로 감염하는 것으로 알려져 있다(Jones et al., 1994). Listeriosis 원인균(*L. monocytogenes*)은 bacterial protein인 internalin B를 이용하여 M cell에 감염하는 것으로 보고되어 있다(Chiba et al., 2011). 따라서 M cell에서 특이적으로 발현하는 단백질들은 M cell targeting의 주요 대상이 되고 있다. 예를 들어 M cell에서 특이적으로 발현하는 glycoprotein 2(GP2)는 *Salmonella*와 같이 FimH를 발현하는 병원균의 M cell 유입을 도우며(Hase et al., 2009), 브루셀라 원인균(*Brucella abortus*)도 M cell에서 발현되는 cellular prion protein(PrPc)을 감염의 주요 target으로 사용한다(Nakato et al., 2012). 급성 설사를 유발하는 *Y. enterocolitica*는 소장 ileum Peyer's patch M cell의 integrin  $\beta 1$ 을 감염의 주요 target으로 사용하는 것으로 알려져 있다(Clark et al., 1998). 따라서 많은 연구들이 M cell에서 발현되는 특정 단백질의 발견 및 백신 보조제로의 적용하는 연구를 진행하고 있다.

표 4. M cell targeting ligands

Ligands	Receptors on M cell
<i>Ulex europaeus</i> 1 (UEA-1)	$\alpha 1,2$ fucose
<i>Aleuria aurantia</i> (AAL)	$\alpha$ -L-fucose
Galectin-9	N-glycans/repeated oligosaccharide
Peptide Co1 (SFHQLPARSPLP)	C5aR
Antibody NKM 16-2-4	$\alpha 1,2$ fucose-containing carbohydrate
Antibody LM112	Sialyl Lewis A
Antibody 3G7-H9	Glycoprotein 2
$\sigma 1$ protein (reovirus)	$\alpha 2,3$ sialic acid
Invasion ( <i>Yersinia</i> )	$\beta 1$ integrin
Long polar fimbriae ( <i>E.coli, Salmonella</i> )	Unknown
FimH ( <i>E.coli, Salmonella</i> )	Glycoprotein 2/ Uromodulin
OmpH ( <i>Yersinia</i> )	C5aR
LPS	TLR-4
Lipoteichoic acid	TLR-2
Phosphorylcholine moiety of LPS	PFAR
Hsp60 of <i>Brucella abortus</i>	Cellular prion protein
Lipid A domain of LPS (gram negative bacteria)	ANXA5

Bacterial peptidoglycan	PGLRP-1
SIgA	Unknown
c-term domain of enterotoxin ( <i>Clostridiumperfringens</i> )	Claudin 4

(2) 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질은 M cell에서 발현하는 receptor에 의한 M cell targeting 검증

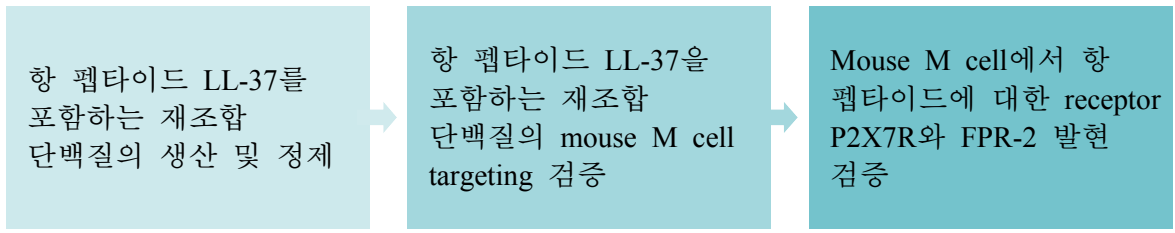


그림 46. 항 펩타이드 LL-37

항 펩타이드 LL-37(그림 46)의 경구투여를 통한 면역반응 유도 특성을 확인하기 위하여 먼저 LL-37유전자를 reporter protein인 EGFP의 C-terminal에 연결될 수 있도록 pCold

vector에 cloning하여 재조합 발현 벡터를 제조하였다. 또한, 면역반응의 control peptide로 사용하기 위하여 *in vitro* cultured M cell로부터 phage display library screening을 통하여 얻은 12개 아미노산으로 구성된 Co1 역시 같은 system에 cloning하여 재조합 발현 벡터를 제조하였다. 이로부터 EGFP, EGFP-Co1, EGFP-LL-37 단백질을 *E. coli* system에서 IPTG를 통해 발현 유도하였고, Ni-NTA resin을 통한 affinity chromatography를 통하여 분리 정제하였다. 정제된 각 단백질은 SDS-PAGE를 통하여 분자량 확인과 정량을 시행하였으며, 실험동물 경구 면을 위한 재조합 항원단백질 확보를 완료하였다(그림 47).

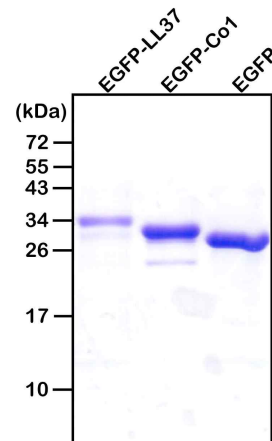


그림 47. EGFP with LL-37 expressed by *E. coli* system was confirmed by SDS-PAGE and coomassie blue staining

LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 M cell targeting을 확인하기 위해, mouse의 ileum에서 PP를 준비한 후 cryosection을 통하여 FAE(follicle-associated epithelium)를 포함하는 slice sample을 준비하였다. 그리고 M cell-specific marker인 GP2를 확인할 수 있는 항체를 이용하여 M cell을 표지하였다. 표지된 M cell에 LL-37을 c-terminal에서 발현하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37이 특이적으로 결합하는지 CLSM을 통하



여 확인한 바 EGFP-LL-37이 GP2와 동일한 위치에 결합하여 LL-37이 융합된 항원의 M cell

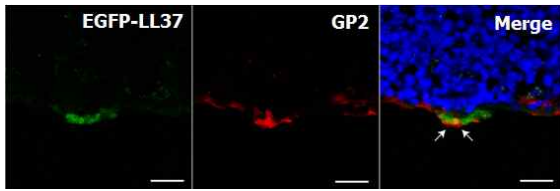


그림 48. *In vitro* mouse M cell targeting of LL-37

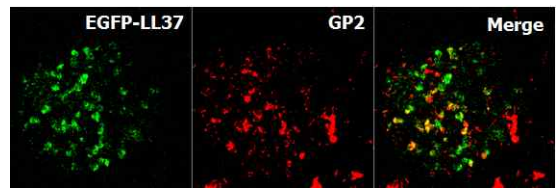


그림 49. *In vivo* antigen delivery by LL-37 into mouse M cell

targeting을 확인할 수 있었다(그림 48). 하지만, 동일한 현상이 LL-37을 포함하지 않는 EGFP에 서는 관찰되지 않아 LL-37을 이용한 M cell targeting 기능을 확인할 수 있었다. 또한 *in vivo*에 서 LL-37의 M cell을 통한 항원 전달능력을 확인하기 위해서 mouse에 EGFP-LL-37을 경구 투 여한 5분 후에 ileum의 PP를 얻은 후 whole mounting을 통해 fix한 후 anti-GP2 항체를 이용하 여 M cell을 표지 하고 CLSM을 통해 M cell을 통한 항원 전달능력을 확인한 결과 LL-37은 항 원을 보다 효율적으로 M cell을 통하여 전달하는 것을 확인할 수 있었다(그림 49).

항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 M cell targeting이 LL-37의 특정 receptor 의 상호작용에 의한 결과인지를 확인하기 위해, LL-37 의 receptor로 알려진 P2X7 receptor와 formyl peptide receptor의 발현을 확인하였다.

먼저 human colon epithelial cell line인 Caco-2와 B cell line인 Raji를 이용하여 먼저 *in vitro* M-like cell의 분화를 유도한 후 human *p2x7r*-specific primer 를 이용하여 mRNA의 발현량을 real time PCR을 통해 확인한 결과 M-like cell이 유도된 sample에서 human *p2x7r* mRNA가 증가한 것을 확인할 수 있었다(그림 50). P2X7R의 발현은 mouse ileum에서 follicular associated epithelium을 포함하는 peyer's patch의 cryoset slice와 whole mount 에서도 관찰 되 었다(그림 51 과 그림 52).

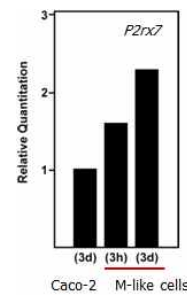


그림 50. Expression of P2X7 receptor in M-like cell

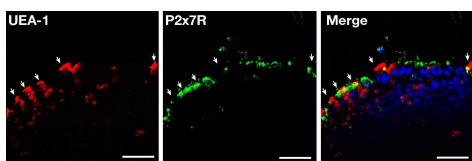


그림 51. The expression of P2X7R was detected on cryoset slice of ileum peyer's patch.

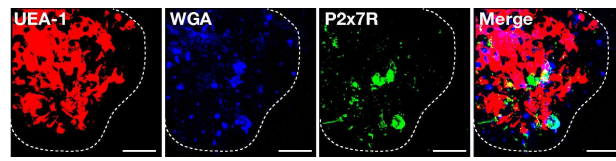


그림 52. The expression of P2X7R was detected on ileum peyer's patch whole mount.

LL-37의 다른 receptor중 하나인 formyl peptide receptor-2의 발현 또한 peyer's patch의 M cell에서 확인 할 수 있었다(그림 53 과 54).

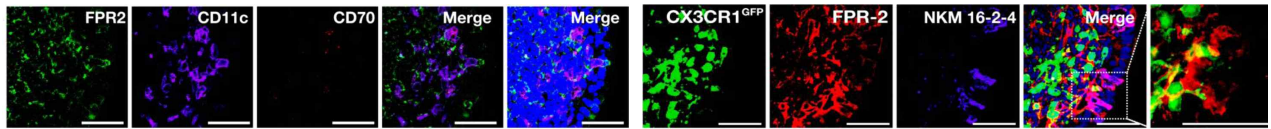


그림 53. Association between FPR-2 and CD11c<sup>+</sup> cell in FAE of PP

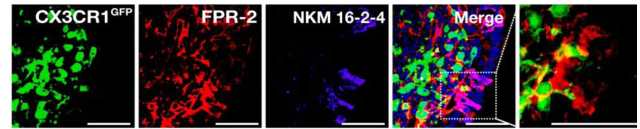


그림 54. Expression of FPR-2 in M cell and its chemotaxis

특히 PP의 FAE에서 발견되는 FPR-2는 점막의 면역 유도과 연관된 CD11c<sup>+</sup> DC와 밀접하게 연결되어있는 것을 확인했다(그림 53). CX3CR1<sup>GFP</sup> mouse의 PP에서 M cell 특이적 항체에 의해 확인된 M cell에서 FPR-2를 발현 하고 있으며 이들은 CX3CR1<sup>GFP+</sup> DC의 활성화에 밀접하게 연관되어 있는 것을 확인 했다 (그림 54).

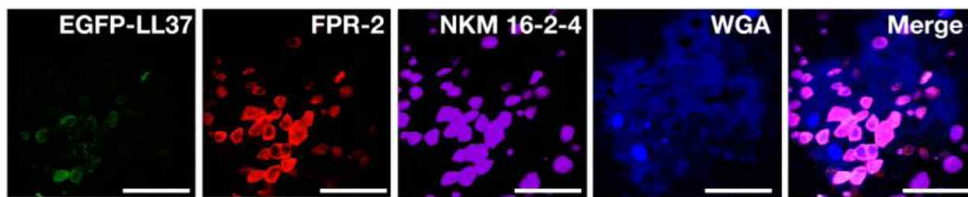


그림 55. *In vitro* interaction between LL-37 conjugated antigen and FPR-2 on M cell apical

M cell에서 발현하는 FPR-2가 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 M cell targeting을 효과적으로 유도 하는지 확인하기 위해, *in vitro* PP whole mount에서 LL-37을 포함하는 재조합 항원이 M cell에 결합하는 것을 확인 했다(그림 55).

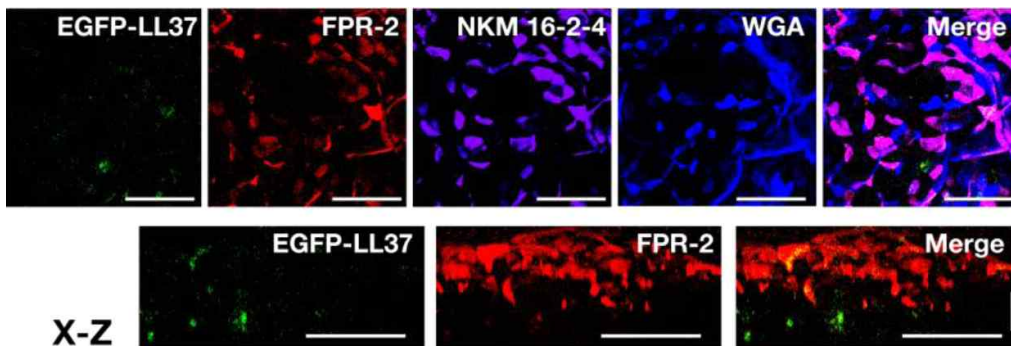
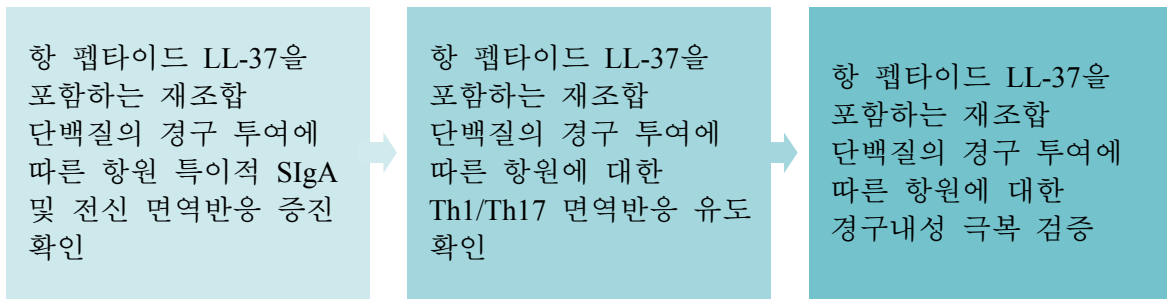


그림 56. *In vivo* M cell targeting by LL-37 conjugated antigen through FPR-2 on M cell

LL-37 결합한 항원의 경구 투여 후 PP M cell에로의 효과적인 전달을 확인했다(그림 56). 항 펩타이드의 경구 백신 보조제의 기능은 항원의 효과적인 전달 기능 또한 갖고 있으며, 점막 M cell에서의 P2X7 receptor와 FPR-2의 발현은 관련 면역세포의 밀집 및 활성화 유도 및 항원 전달과 밀접하게 연결되어있을 가능성을 제시한다.

(3) 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 백신 모델에서 면역 증강 효과 검증



점막 면역계는 일반적으로 외부로부터 유입된 항원에 대한 면역반응의 유도보다는 경구 내성을 유도하는 방향으로 전환 되어 있기 때문에 점막 보조제는 백신을 점막의 면역 유도기관 까지 전달하는 능력과 함께 경구 내성을 극복하게 해야 한다. 앞의 실험 결과들로부터 항 펩타이드 LL-37이 항원을 점막면역 유도조직인 PP의 M cell을 통하여 전달할 수 있음을 확인했기 때문에 EGFP를 이용한 경구 백신 모델을 사용하여 LL-37의 면역 증강효과에 대하여 검증하고자 하였다. EGFP-LL-37 1 $\mu$ g과 10 $\mu$ g을 BALB/c mouse에 2주 간 2번 경구 투여한 후 4주 간 serum과 fecal에서 EGFP에 대한 IgG 및 IgA 항체의 양을 ELISA를 통하여 확인하여 항 펩타이드에 의한 항원에 대한 점막 및 전신 면역반응 유도를 확인하였다(그림 57). 또한 유도된 IgG

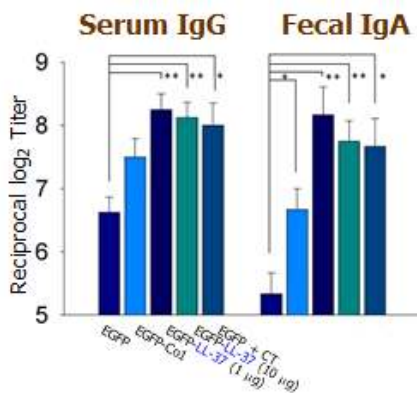


그림 57. Enhanced induction of EGFP-specific serum IgG and fecal IgA in mice immunized orally by EGFP conjugated with LL-37

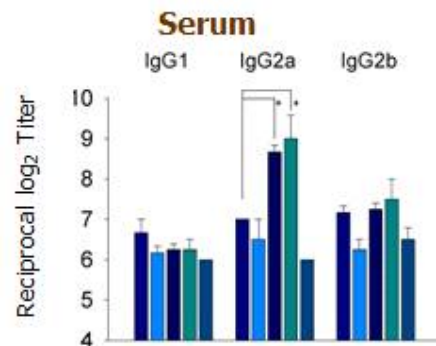


그림 58. Characterization of serum IgG isotype in mice immunized orally by EGFP

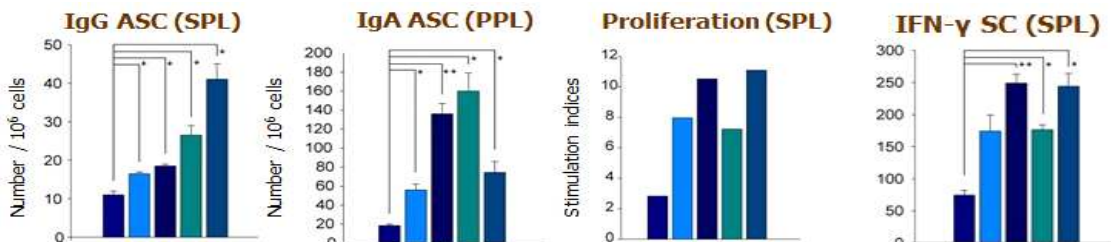


그림 59. Analysis of immune responses in mice immunized orally by EGFP conjugated with LL-37

항체에 대한 특성을 분석하기 위하여 IgG isotype을 분석한 결과 Th1 type의 cytokine에 의해 유도되는 IgG2a의 증가를 확인할 수 있었다(그림 58).

EGP-LL-37로 immunize된 mouse의 spleen과 PP 세포를 분리하여 항원에 대한 반응 특성을 분석한 결과 serum과 fecal의 immunoglobulin 발현 특성과 동일한 반응 특성을 확인할 수 있었

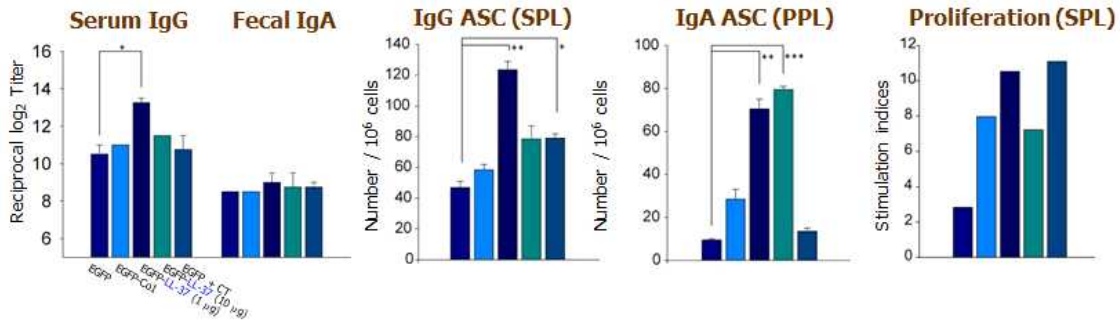


그림 60. Oral priming effects in mice immunized orally by EGFP conjugated with LL-37

으며, *in vitro*에서 항원에 대한 cell proliferation을 확인함으로써 T-cell dependent immune response가 유도되었음을 확인하였다. 또한 serum IgG2a의 증가 특성에 맞게 Th1 type cell 분화 유도 및 분비 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 발현 증가를 확인할 수 있었다(그림 59과 60).

따라서 항 펩타이드 LL-37은 경구 백신 모델에 적용되었을 때 효과적인 항원 전달 능력 및 Th1 type cytokine 유도를 통한 면역 증강 효과 및 항원에 대한 T cell-dependent immune response 유도를 통하여 경구 내성 극복 및 oral priming effect를 이끌어 낼 수 있기 때문에 항 펩타이드 LL-37은 점막 보조제의 좋은 후보물질이 될 것으로 기대할 수 있었다.

항 펩타이드에 의한 면역 증진 효과를 보다 높이기 위해 항 펩타이드를 포함하는 모델 항원 EGFP 및 EGFP, EGFP + CT 그룹은 50  $\mu$ g씩 2번 경구 투여된 mouse로부터 4주 동안 serum과 fecal extract를 확보 했다. 그림 47은 4주째 serum sample에서 EGFP-specific IgG의 level을 관찰 한 것으로 항 펩타이드를 포함하는 항원이 경구 투여된 mouse로부터 얻은 serum이 항 펩타이드를 포함하지 않는 EGFP 나 점막 보조제로 알려진 CT를 같이 투여한 mouse로부터 얻은 serum보다도 높은 EGFP-specific IgG level이 ELISA를 통해 확인 되어 항 펩타이드에 의해 전신 면역 시스템에서 항원 특이적 면역 반응이 높게 유도된 것을 확인 했다(그림 61).

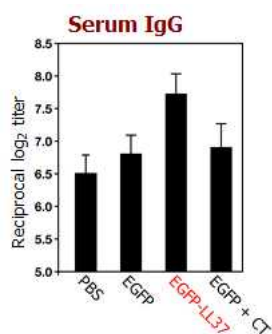


그림 61. EGFP-specific IgG level in serum of mice orally immunized by indicated antigen

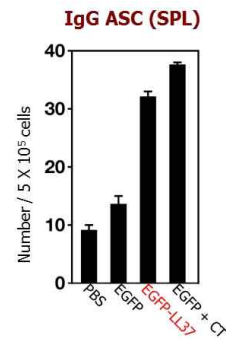


그림 62. Number of EGFP-specific IgG SC in spleen of mice orally immunized by indicated antigen



또한 이러한 결과는 spleen으로부터 확보된 세포들에서 EGFP-specific IgG를 분비하는 세포수의 증가를 통해 검증되었다(그림 62). 점막 면역계에서의 면역반응을 확인을 위해 fecal extract로부터 total IgA의 level을 확인 하였을 때, 4주째에 EGFP-LL-37이 경구 투여된 mouse에서 다른 group의 mouse에 비교하여 6배 이상 증가한 것을 확인하였다(그림 63). 또한 항원 특이적 IgA의 level 역시 10배 이상 증가된 것을 확인했으며(그림 64) 이는 점막 면역계의 유도 조직 PP 및 실행조직 lamina propria(LP)에서 얻은 면역 세포들 중 EGFP-specific IgA or

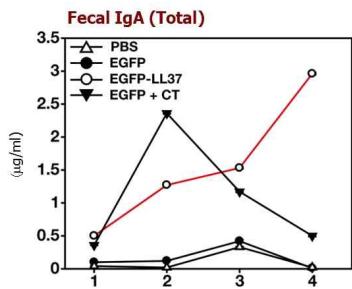


그림 63. Total IgA level in fecal extract of mice orally immunized by indicated antigen

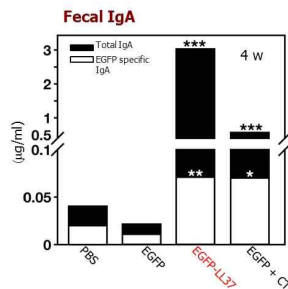


그림 64. EGFP-specific and total IgA level in fecal extract of mice orally immunized by indicated antigen

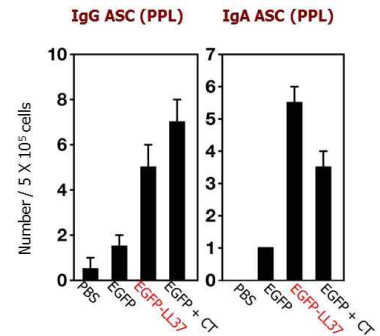


그림 65. Number of EGFP-specific IgG or IgA SCs in PP of mice orally immunized by indicated antigen

IgG SCs 수의 증가에 의해 검증되었다(그림 65) 따라서 점막에서 면역반응이 효과적으로 유도 되었음을 확인했다. 유도된 면역 반응의 특성 분석을 위해 Spleen과 PP로부터 확보된 면역세포들이 분비하는 Th1/2/17 type cytokine을 확인 해본 결과 EGFP-LL37이 경구 투여된 mouse에서 Th17 type cytokine의 분비가 보다 높게 증가되는 것을 관찰 하였다(그림 66 와 67). 또한 항원에 대해 proliferation하는 것을 [<sup>3</sup>H] uptake를 이용하여 확인했다(그림 68). 따라서 항원 특이적 면역반응이 T cell을 통한 메모리 기능을 갖는 세포성 면역반응이 유도 되었을 뿐 아니라 최근 백신 효과를 위해 중요한 기능으로 고려되는 memory Th17 cell이 유도된 것을 확인했다.

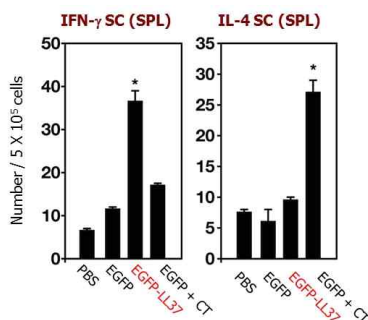


그림 66. Number of IFN-γ or IL-4 SC in spleen of mice immunized by indicated antigen

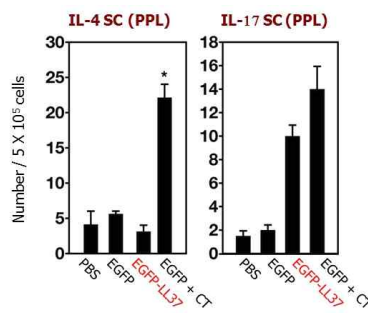


그림 67. Number of IL-4 or IL-17 SC in PP of mice immunized by indicated antigen

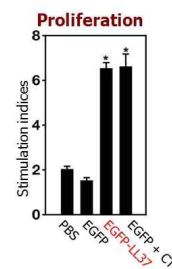


그림 68. SPL proliferation against antigen EGFP

항 펩타이드를 포함하는 항원 EGFP-LL37에 의해 유도된 면역반응이 경구 내성이 유도 되

지 않았음을 확인하기 위해 항원을 복강을 통해 주사 후 전신 및 점막 면역계에서 면역반응의 특징을 확인했다. 확보된 serum에서 EGFP-specific IgG level은 EGFP-LL37이 경구 투여된 mouse에서 EGFP가 투여된 mouse에 비해 2배 이상 증가했다(그림 69). Fecal extract에서 Total IgA 및 EGFP-specific IgA 양은 EGFP-LL37이 경구 투여된 mouse에서 EGFP가 투여된 mouse에 비해 2배 이상 증가했다(그림 70).

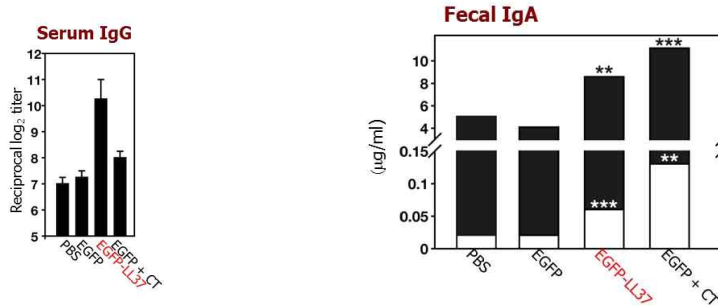


그림 69. EGFP-specific IgG level in serum after systemic challenge with EGFP in mice immunized by indicated antigen

그림 70. Total IgA and EGFP-specific IgA level in fecal extract after systemic challenge with EGFP in mice immunized by indicated antigen

항원 특이적 항체의 증가는 spleen, PP, LP에서 얻은 면역세포들에서 항원 특이적 항체를 분비하는 세포의 증가로 검증했다(그림 71).

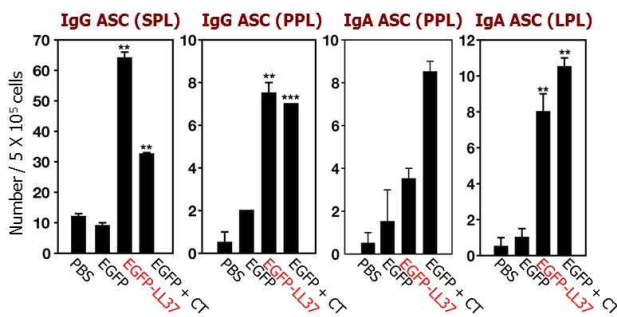


그림 71. Number of EGFP-specific IgG or IgA SCs in spleen, PP, or LP after systemic challenge with EGFP in mice immunized by indicated antigen

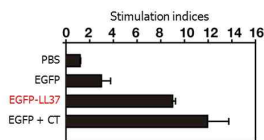


그림 72. SPL proliferation against antigen EGFP after systemic challenge with EGFP

전신 면역계인 spleen 에서의 EGFP-specific IgG를 분비하는 세포는 6배 이상 증가하였다. 점막 면역 유도조직 PP와 실행조직에서는 EGFP-specific IgA를 분비하는 세포가 4배 이상 증가됨을 확인하여 EGFP-LL37이 경구 투여된 mouse에서는 경구 내성이 유도되지 않고 전신 및 점막 면역계 모두에서 효과적인 oral priming을 확인했다. 반면 EGFP 항원만 경구 투여된 mouse group에서는 항원 특

이적 면역반응이 거의 유도 되지 않기 때문에 경구 내성의 가능성이 관찰되었다. 보다 정밀한 확인을 위해 항원에 반응하는 면역세포들의 proliferation을 확인한 결과 이전 결과들과 동일하게 EGFP-LL37 이나 점막 보조제로 잘 알려진 CT를 이용한 EGFP+CT가 경구 투여된 mouse에서 얻은 splenocytes은 항원에 대해 proliferation을 하는 것의 관찰을 통해 경구내성이 유도되지 않음을 검증

한 반면 EGFP만 경구 투여된 mouse로부터 얻은 splenocytes은 항원에 대해 반응하지 않았기

때문에 경구 내성의 유도를 알 수 있었다(그림 72).

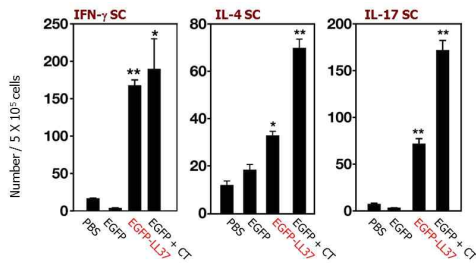


그림 73. Th1/Th2/Th17 type cytokine secretory cell after systemic challenge with EGFP in spleen of mice immunized by indicated antigen

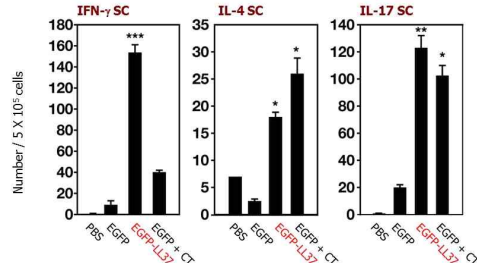


그림 74. Th1/Th2/Th17 type cytokine secretory cell after systemic challenge with EGFP in PP of mice immunized by indicated antigen

유도된 면역반응의 특성을 분석하기 위하여 Th1/Th2/Th17 type의 cytokine을 분비하는 세포들을 spleen 과 PP의 면역 세포들로부터 확인한 결과 EGFP-LL37이 경구 투여된 group은 EGFP만 경구 투여된 group에 비해 Th1 과 Th17 type의 cytokine을 분비하는 세포들이 전신 및 점막 면역계 모두에서 10배 이상 증가 된 것을 확인했다(그림 73 와 74). 이러한 실험 결과들을 바탕으로 항 펩타이드 LL-37은 Th1/Th17 type T cell을 통한 항원 특이적 면역반응을 전신 및 점막 면역계에서 모두 유도 할 수 있는 adjuvant로써의 기능을 확인했다 따라서 항 펩타이드 LL-37은 이후 병원성 항원에 대한 적용을 통해 경구백신 모델에 적용될 수 있음을 확인했다.

(4) Deng기 바이러스 병원성 항원 EDIII을 이용한 경구 백신 모델에서 항 펩타이드 LL-37의 효과적인 점막 보조제로서의 기능 검증

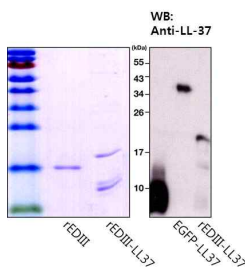
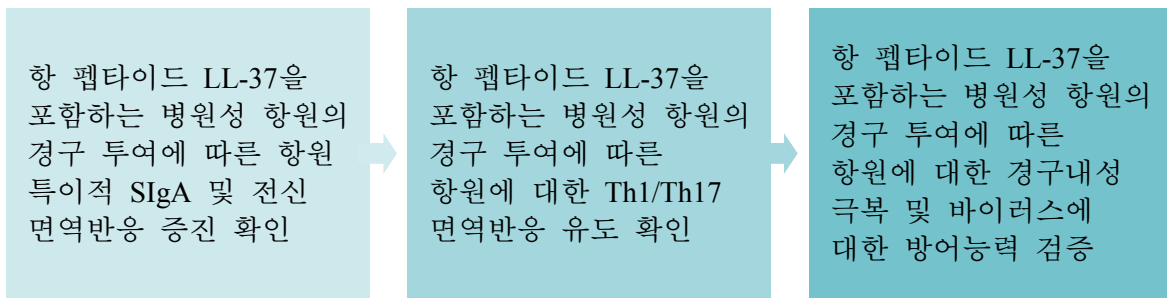


그림 75. Purification of recombinant EDIII and EDIII-LL37 and Western blot by anti-LL37 antibody

항 펩타이드 LL-37을 재조합 단백질 DENV EDIII의 c-terminal에서 함께 발현 되도록 cloning 한 후 E.coli system에서 발현 하여 Ni-NTA를 통해 분리 정제 한 후 SDS-PAGE와 anti-LL37 antibody를 이용한 Western blot을 통해 확인했다(그림 75). 확보된 재조합 단백질 rEDIII, rEDIII-LL37 및 CT을 함께 투여하는 그룹인 rEDIII+ CT는 50 μg씩 일주일에 2번 경구 투여 된 후 4주에 serum과 fecal extract로부터 EDIII-specific IgG 와 IgA의 양을 ELISA를 통해 확인했다(그림 76). 전신 면역계인



serum에서 EDIII-specific IgG의 level은 EDIII-LL37이 투여된 mouse 중 EDIII만 경구 투여된 개체와 비교해서 최대 2배 이상 증가된 것이 확인 되었다. 또한 점막 면역계를 대표하는 IgA level에서는 total IgA양이 2배 이상 증가될 뿐 아니라 EDIII-specific IgA의 양 또한 신뢰도 있게 증가된 것을 확인했다. 항원 특이적 항체의 증가는 각 면역기관으로부터 확보된 면역세포들에서 항원 특이적 IgG 나 IgA를 분비하는 세포들의 분석을 통해 검증 되었다(그림 77). 전신 면역계 spleen에서 EDIII-LL37이 경구 투여된 개체의 경우 EDIII만 투

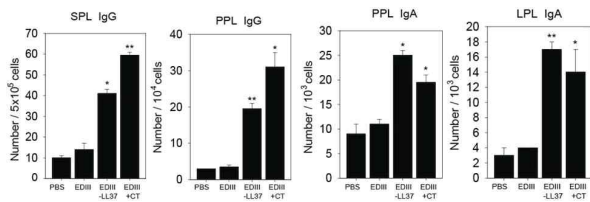


그림 77. Number of EDIII specific IgG or IgA SC in spleen, PP, or LP of mice immunized by indicated antigen

면역계에서 모두 효과적으로 유도된 것을 확인하였다.

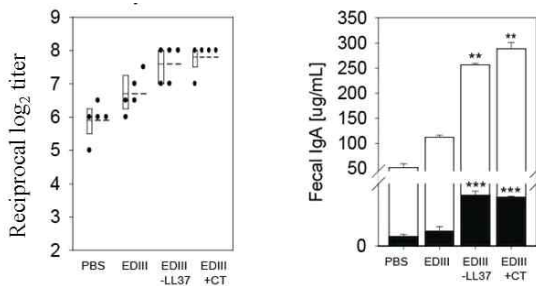


그림 78. EDIII-specific IgG or IgA or total IgA level after systemic challenge with rEDIII in serum or fecal extract of mice immunized by indicated antigen

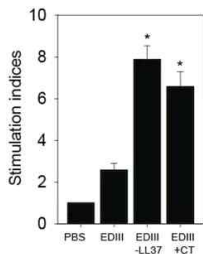


그림 79. SPL proliferation against rEDIII protein

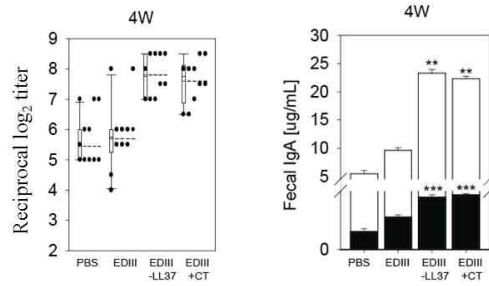


그림 76. EDIII-specific IgG or IgA or total IgA level in serum or fecal extract of mice immunized by indicated antigen

여된 개체에 비해 5배 이상의 EDIII-specific IgG를 분비하는 세포수가 증가 했다. 점막 면역계의 경우 유도 조직 PP에서는 EDIII-specific IgG를 분비하는 세포가 5배 이상 IgA를 분비하는 세포가 2배 이상 증가되었으며 실행조직 LP에서는 EDIII-specific IgA를 분비하는 세포가 4배 이상의 증가가 확인되어 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역반응이 전신 및 점막

경구 투여로 유도된 면역반응이 경구내성의 극복 여부를 확인하기 위해 rEDIII를 복강을 통해 challenge 한 후 serum 과 fecal extract로부터 EDIII-specific IgG 혹은 IgA 양을 관찰 하였다(그림 78). 각 전신 및 점막 면역계로 부터 확보된 면역 세포들 에서 EDIII-specific IgG 혹은 IgA를 분비하는 세포들의 수를 확인했다(그림 78). 그 결과 EDIII가 경구 투여된 개체에 비해 EDIII-LL37이 경구 투여된 개체에서 EDIII-specific IgG level 및 분비세포도 모두 증가한 것을 확인 했다. 또한 점막 면역계의 표시자인 IgA의 양 또한 증가 했을 뿐 아니라 유도 조직 및 실행조직에서 EDIII-specific IgA를 분비하는 세포들 또한 2배 이상 증가한 것을 검증 했다. 따라서 경구 내성의 유도 없이 EDIII-LL37 group이 전신 및 점막 면역계에서 모두 효과적인 항원 특이적 면역반응을 유도함을 확인했으며 이결과는 모델 항원 EGFP에서의 결과와 유사했다.

경구 내성유도에 대한 보다 정확한 검증을 위해 항원

에 대한 면역세포들의 proliferation을 확인한 결과 control group과 큰 차이를 보이지 않는 EDIII group과는 달리 EDIII-LL37 group은 8배 이상 proliferation하는 것은 [<sup>3</sup>H] uptake를 통해 확인함으로써 경구 내성이 유도되지 않음을 확인했다(그림 79). 유도된

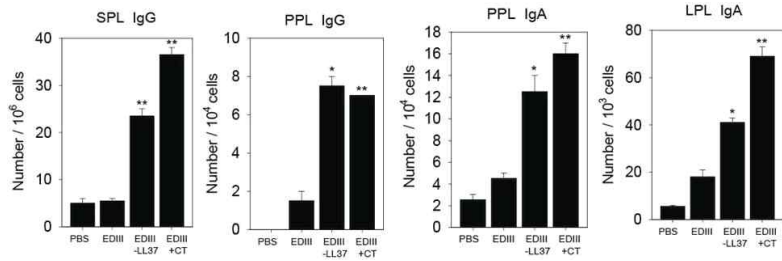


그림 80. Number of EDIII-specific IgG or IgA SCs after systemic challenge with rEDIII in spleen, PP, or LP of mice immunized by indicated antigen

면역반응의 특성 분석을 위해 Th1/Th2/Th17 type cytokine을 분비하는 세포들의 수를 분석한

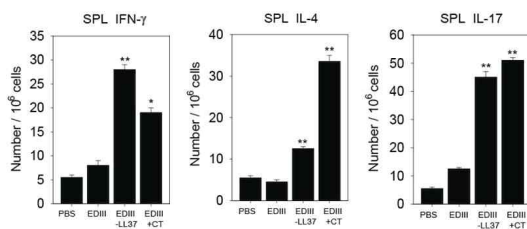


그림 81. Number of Th1/Th2/Th17 type cytokine secretory cell after systemic challenge with rEDIII in spleen of mice immunized by indicated antigen

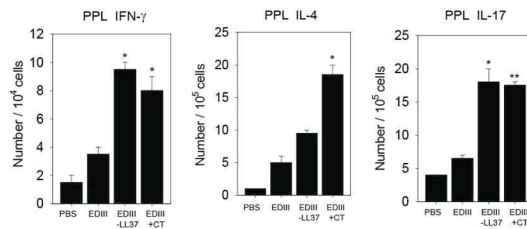


그림 82. Number of Th1/Th2/Th17 type cytokine secretory cell after systemic challenge with rEDIII in PP of mice immunized by indicated antigen

결과 항원에 대해 Th1/Th17 type의 cytokine을 분비하는 세포들이 많은 것을 바탕으로 Th1 type의 세포성 면역반응 및 memory Th17 cell 면역반응이 유도된 것을 확인했다(그림 81 와 그림 82).

이러한 결과들은 모델 항원 EGFP에서의 경향과 유사한 결과들이기 때문에 항원의 특성 보다는 항 펩타이드 LL-37에 의한 immunostimulatory 효과로 해석될 수 있다. 따라서 항 펩타이드 LL-37은 점막 면역 보조제로 경구백신에 효과적으로 적용될 수 있다고 제안할 수 있다.

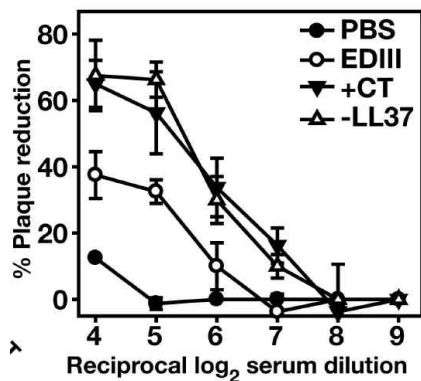


그림 83. Microneutralization plaque assay against dengue virus type-2 using oral immune serum induced by indicated antigen

병원성 항원을 이용한 경구 백신 모델에서 유도된 항체가 바이러스에 대한 중화기능을 갖는지 확인하기 위해 2주간 두 번 경구 투여 후 4주에 항원만을 이용하여 복강에 주사한 후 3일에 각 immune serum을 확보하였다. 얻은 serum을 사람으로부터 분리된 dengue virus type 2와 반응을 시킨 후 C6/36 세포에 감염 정도를 microneutralization plaque assay를 통해 확인했다(그림 83). 항 펩타이드가 결합한 병원성 항원에 의해 유도된 immune serum이 중화 기능을 갖는 항체가 높은 것으로 확인

했다. 따라서 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로써의 기능이 병원성 항원에서도 효과적인 항원

특이적 면역 반응 유도 뿐 아니라 병원성 바이러스의 감염에 대한 방어 기능을 갖는 항체를 형성할 수 있음을 확인하였다.

(5) 결론 2.

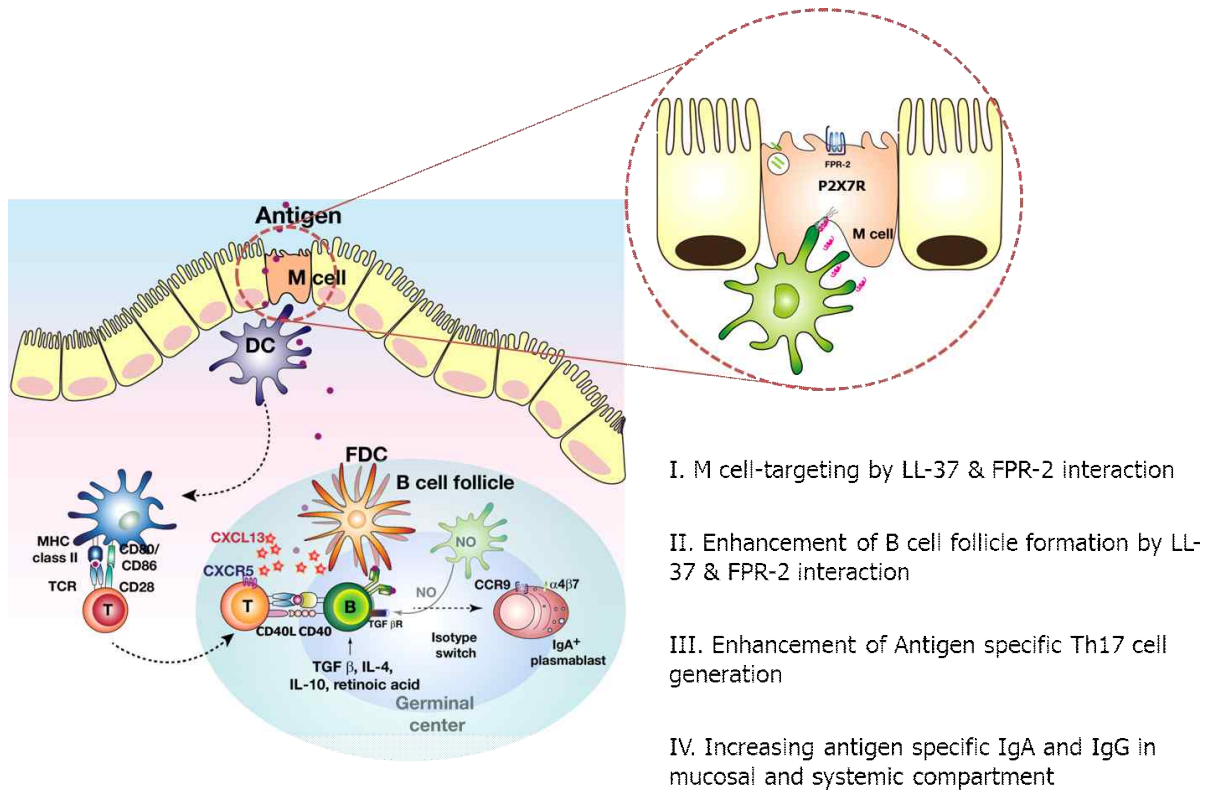


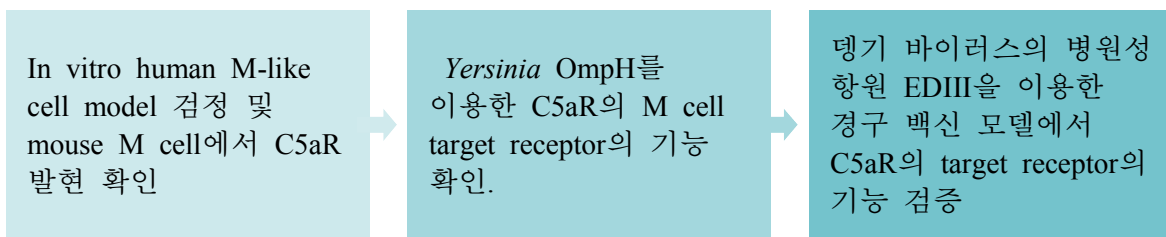
그림 84. 결론 2.

본 연구를 통해 M cell은 항 펩타이드 LL-37에 대한 receptor인 formyl peptide receptor와 P2X7 receptor를 발현하고 있으며, 이는 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 항원의 M cell targeting을 높일 수 있음을 확인하였다. 또한 항 펩타이드를 포함한 항원의 경구 투여는 항원 특이적 면역반응을 점막 및 전신 면역계에서 높고 빠르게 유도 및 Th1/ Th17 면역반응 유도를 통한 항원 특이성이 높은 면역 반응을 유도함을 확인하였다. 또한 경구 백신의 장벽 중 하나인 경구 내성의 유도를 극복하며 효과적인 면역반응을 유도함을 확인하였다. 항 펩타이드 LL-37의 경구 백신 보조제로서의 기능은 Dengue 바이러스의 병원성 항원 EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서도 검증되었다. Dengue 바이러스의 병원성 항원 EDIII에 항 펩타이드를 포함할 경우 M cell targeting을 높일 수 있을 뿐 아니라 점막 및 전신에서 항원 특이적 면역반응을 증진 시키며, Th1/ Th17 면역 반응 증진을 통해 항원 특이적 항체 형성을 높이는 것을 확인하였다. 또한 항원에 대한 경구 내성의 유도 없이 바이러스의 감염을 방어할 수 있는 항원 특이적 중화 항체의 형성의 증가 또한 확인하였기 때문에 항 펩타이드는 경구 백신에서 효과적인 점막 보조제로서의 기능을 수행할 수 있다는 결과를 얻었다.

다. M cell에서 발현 되는 단백질의 특성 분석을 통한 점막의 항원 유입 기작에 대한 이해 및 점막 보조제로의 응용

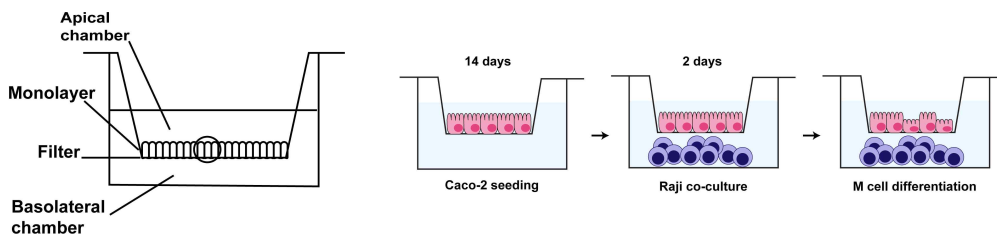
외부 항원 유입을 긴밀하게 조절해야 하는 점막에서 M cell은 특이적으로 항원 유입이 자유로운 특화된 세포로 점막에서 백신 등의 전달을 위한 주요 통로로 간주되어 왔다. 그러나 짧고 불규칙적인 microvilli를 가지며 mucus 층이 얇아 항원과 세포사이의 접촉이 용이할 것으로 보이는 물리적 특징 이외에 M cell에서 항원 유입 기작에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. 최근 M cell에서 항원의 유입 기작을 설명하는 가설 중 특이적 receptor를 통한 선택적 항원유입이 높은 가능성을 보인다고 설명되고 있는데, 대표적으로 glycoprotein 2(GP2)가 이러한 물질로 알려지고 있다. GP2는 M cell-specific antibody에 의해 선별된 M cell에서 발현되는 mRNA를 microarray를 통해 분석하여 확인된 분자로 M cell에서만 발현되며 Type-I pilated bacteria의 FimH와 특이적 반응을 통해 bacteria의 M cell 특이적 유입에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 따라서 M cell에서 발현되는 다양한 target receptor의 개발은 경구 백신 보조제의 중요한 요소로 작용할 수 있다(Pavot, 2012). 이에 본 연구에서는 M cell targeting receptor로 사용할 수 있는 candidate molecule을 확보하고자 연구를 진행하고 있다

(1) M cell에서 complement 5a receptor(C5aR)의 발현 확인 및 M cell targeting을 위한 receptor로서의 기능을 확인함.



(가) GP2 antibody를 이용한 *in vitro* M cell model의 검증

점막 내 외부 항원 유입을 결정하는 M cell은 많은 백신 개발 및 신약 연구의 대상이 되고 있다. 1997년 제안된 human colon cell line Caco-2와 human lymphoma cell line Raji를 이용한 *in vitro* co-culture model은 *in vitro*에서 M cell의 differentiation의 가능성을 제안한 첫 번째 실험인데, 많은 실험실에서 이의 재현에 어려움을 겪고 있다(Kerneis, 1997). 이에 분화된 M cell을 증명하는 여러 marker들을 이용하여 M cell 분화 여부를 확인하고자 하였으나, marker





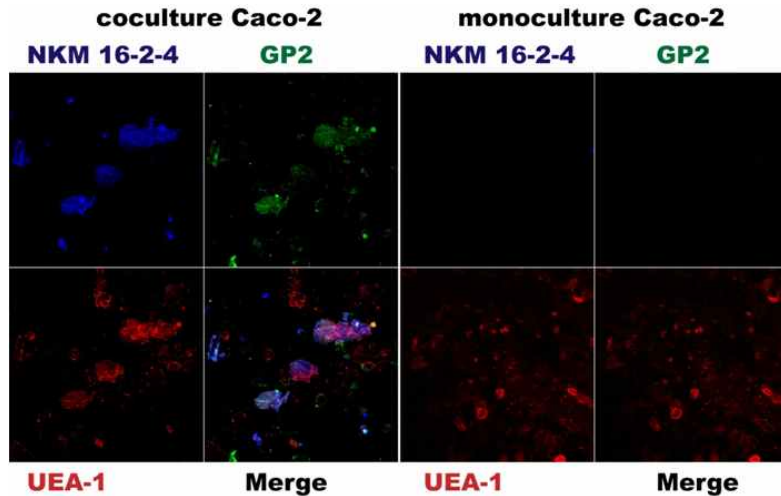


그림 85. *In vitro* M cell model cultured M cell express the GP2 protein in apical surface

도 불확실한 상황이었다. 본 연구팀은 *in vitro* M cell co-culture model을 확립하고 다양한 방법을 통하여 M cell의 특성을 확인한 바 있으나, 최근에 mouse와 human에서 공통적으로 M cell marker로 가능한 glycoprotein-2(GP2)가 보고되어 이에 대한 확인을 시행하였다. 예컨대, *in vitro* co-culture model에서 GP2의 발현을 confocal laser scanning microscopy를 이용하여 확인하였다(그림 85). M cell 특이적인 항체인 NKM 16-2-4와 anti-GP2는 Caco-2와 Raji를 co-culture한 sample에서만 반응하였고 상대적으로 UEA-1은 co-culture와 monoculture sample에 모두 결합하는 특징을 보였다. NKM 16-2-4와 GP2가 함께 겹쳐지는 지역이 M cell 분화 지역일 것으로 추정되었으며, 전체 세포의 20-30% 정도임을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 사용하고 있는 *in vitro* cultured M cell의 특징이 최근 확인된 M cell marker를 발현하는 것을 확인할 수 있어 M cell 분화에 관련된 단백질 분석을 위한 올바른 연구 system을 갖추고 있음을 확인할 수 있었다.

(나) *In vitro* cultured M cell에서 complement C5a receptor(CD88)의 발현

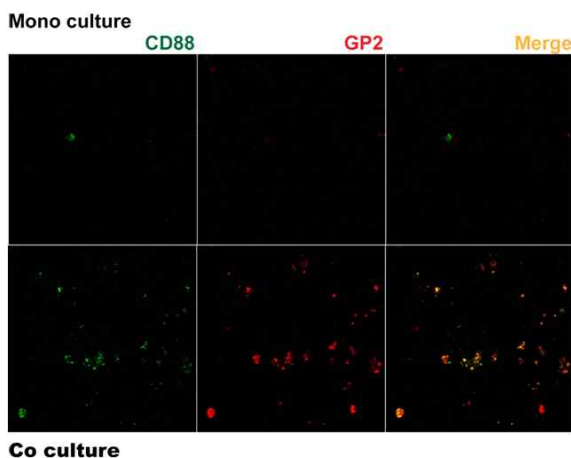


그림 86. Identification of C5a receptor expression in Caco-2 and Raji coculture model

이전 연구에서 *in vitro* cultured M cell model로부터 phage display library panning을 통해 screening한 peptide들 중 Co1 ligand가 항원의 M cell targeting을 통한 전신 및 점막 면역반응을 증가시킴을 확인하였다. Co1 ligand의 작용 특성을 알아보기 위하여 Co1 amino acid sequence를 분석한 결과 M cell invasion pathogen *Yersinia enterocolitica*의 OmpH의  $\alpha 1$ 과 높은 유사성을 갖는 것을 확인하였다. 그런데, *Y. enterocolitica*의 OmpH의  $\alpha 1$  domain은 complement system의 C5a receptor(CD88)에 결합하는 ligand로 보고되어 있어 본 연구팀이 점막 면역 보조제로 선발한 Co1이 CD88을 receptor로 사용할 가능성을 제시하는

흥미로운 정보를 얻을 수 있었다. 따라서 CD88가 *in vitro* cultured M cell에서 발현되는지 알아보려고 하였는데, *in vitro* co-cultured M cell model에서 M cell marker로 제안된 GP2 protein이 발현되는 지역과 CD88이 발현 되는 지역이 겹쳐지는 지역이 Caco-2와 Raji cell이 함께 배양된 sample에서만 보이는 것으로 보아 *in vitro* cultured M cell에서 CD88의 발현 가능성을 확인할 수 있었다(그림 86). 따라서 이후 M cell에서 CD88의 발현이 검증 되었을 때 경구 백신 효능을 높이는 보조제의 새로운 대상이 될 것으로 기대했다.

(다) M cell에서 발현 되는 새로운 target receptor, C5aR

Complement system은 외부로부터 병원균의 침투에 대해 반응하는 가장 첫 번째 면역 반응 system 중의 하나로 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 연결시켜 주는 중요한 연결 고리 역할을 수행한다. 그 중 C5a의 receptor로 알려진 C5aR(CD88)은 면역세포 및 bronchial epithelial cell 등에서 발현되며, sepsis와 asthma 같은 점막 질병에 깊게 연관되어 있다는 연구 보고들이 있으나 아직 M cell에서의 발현 및 기능에 대해서는 확인된 바가 없다. 비록 장 점막, 특히 M cell 에서의 C5aR 발현 및 기능은 아직 알려지지 않았지만 M cell-specific pathogen으로 알려진 enteropathogen인 *Yersinia enterocolitica*의 outer membrane protein(OmpH)의  $\alpha 1$  helix와 점막 내 병원균 *Streptococcus aureus*에서 발현되는 chemotaxis inhibitory protein(CHIPS)는 C5aR을 활성화 시키는 ligand 중 하나로 알려져 있었기 때문에 M cell에서 C5aR의 발현을 예상하는 것은 그리 어려운 상황은 아니었다. 특히 C5aR는 활성화 되었을 때 clathrin-coated vesicle을 이용한 endocytosis를 유도하는 기능을 가지고 있어 M cell에서 항원 유입 시 그 기능이 기대되며, 또한 M cell에서 주변 enterocyte와 달리 독특하게 발현하는 TLR2 혹은 TLR4와 C5aR가 함께 작용하여 이루어지는 complement signaling이 외부 병원균들이 M cell 감염을 위해 사용되어지는 기작으로 생각되어졌다. 그럼에도 불구하고 아직까지 M cell에서 C5aR이 발현된다는 직접적인 증거는 발표된 바가 없었다.

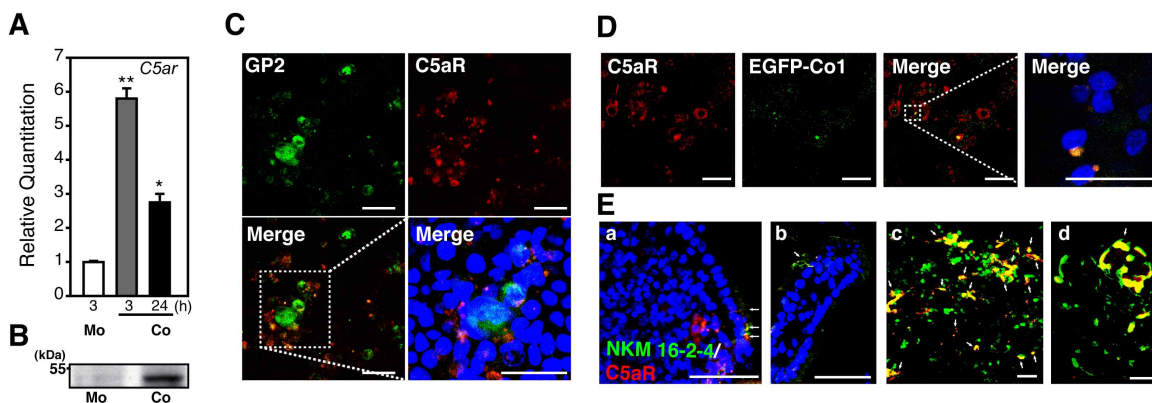


그림 87. C5aR is dominantly expressed in both human M-like cell and mouse M cell

본 과제의 사전 연구 결과 얻은 M cell targeting ligand인 Co1의 특성을 분석하던 중 sequence를 이용한 blast search를 통해 C5aR의 ligand 중 하나인 M cell-specific pathogen, *Y. enterocolitica*,의 OmpH이 가지는  $\alpha 1$  domain과 높은 sequence homology를 가짐을 확인함에 따라 M cell에서 C5aR의 발현 및 C5aR이 M cell targeting ligand Co1의 receptor로서의 역할 가능성을 확인하고자 하였다(그림 87). 먼저 *in vitro*에서 Caco-2와 Raji cell line을 이용하여 확립한 human M-like cell에서 C5aR의 발현을 mRNA와 protein level에서 real time PCR 및

Western과 CLSM을 통하여 M cell에서 특이적으로 C5aR이 발현함을 확인할 수 있었다(그림 87A-C). 또한 C5aR과 Co1이 동일한 위치에서 염색되는 것으로 보아 Co1의 target receptor로 C5aR이 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었다(그림 87D). 아울러 M cell에서의 C5aR 발현이 mouse PP의 FAE 및 villi에서도 확인되었다(그림 87E).

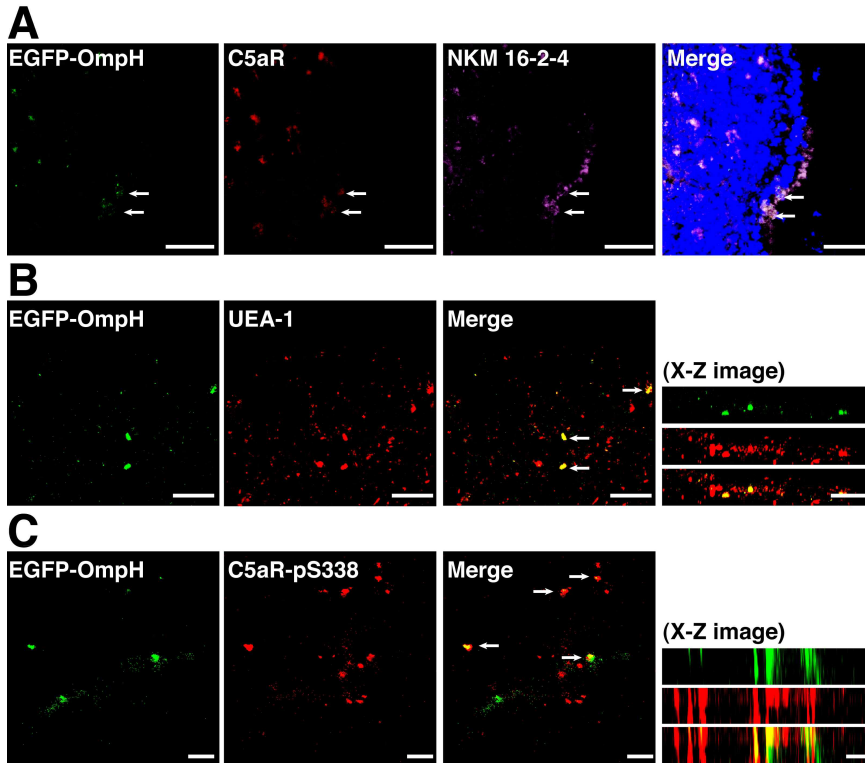


그림 88. OmpH bl1-fused EGFP targeted and transport via C5aR on the M cell of Peyer's patch

M cell에서 발현이 확인된 C5aR을 항원의 M cell targeting을 위한 receptor로 활용이 가능한지 알아보기 위하여 C5aR의 ligand 중 하나인 OmpH a1 helix를 reporter protein인 EGFP의 c-terminal에서 발현되도록 cloning하여 재조합 항원단백질을 준비하였다. 그리고 준비된 EGFP-OmpH는 *in vitro*와 *in vivo* PP의 FAE M cell의 C5aR과 특이적으로 반응하는지 CLSM을 이용하여 확인하였다(그림 88).

*In vitro*에서 OmpH는 mouse PP FAE의 M cell에서 발현되는 C5aR에 targeting됨을 M cell-specific antibody NKM 16-2-4와 함께 확인할 수 있었다. 또한, *in vivo*에서 EGFP-OmpH는 경구 투여된 후 M cell targeting 및 M cell의 C5aR

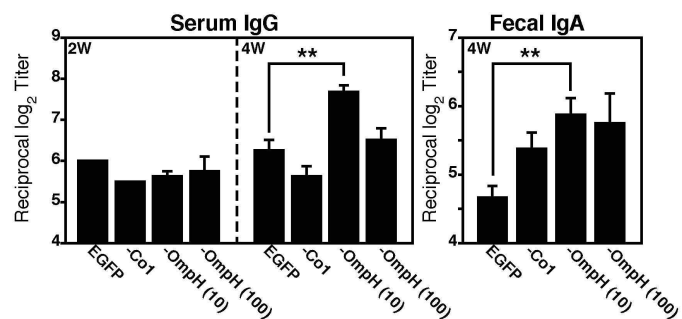


그림 89. Enhanced EGFP-specific serum IgG and fecal IgA in mice immunized orally with EGFP-OmpH



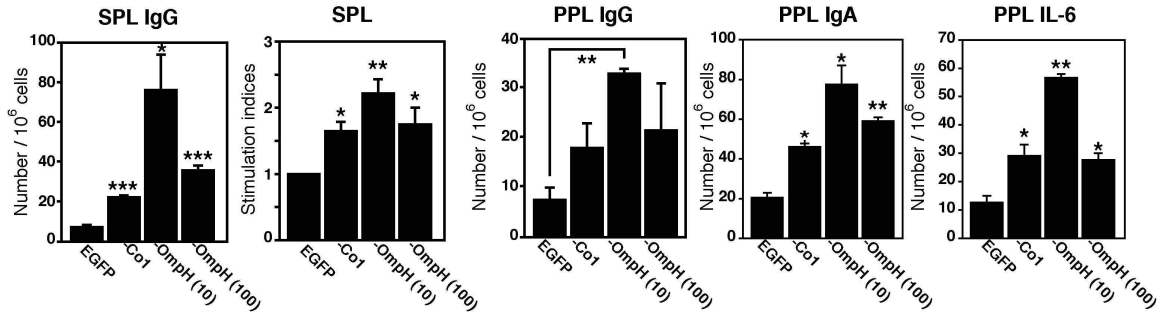


그림 90. Characterization of immune response induced in mice immunized orally with EGFP-OmpH

phosphorylation을 통한 활성을 유도함을 확인함과 동시에 항원의 M cell로의 전달을 통해 M cell target receptor로써의 이용 가능성을 제시해 주는 결과를 얻을 수 있었다.

C5aR가 경구 백신에서 target receptor로써의 기능을 하는지 확인하기 위하여 EGFP 경구 백신 모델에 EGFP-OmpH를 적용하였다. 예컨대, 2주간의 항원 경구투여 후 EGFP 항원에 대한 항체의 양 및 다양한 면역반응 유도 특성을 분석하였다(그림 89 및 90).

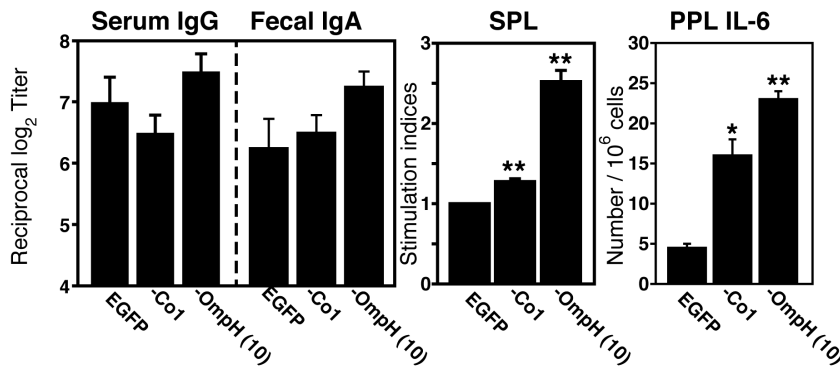


그림 91. Oral priming effect in mice orally administrated with EGFP-OmpH

수 있었으며, *in vitro* stimulation에 대한 proliferation 확인을 통하여 항원에 대한 면역반응이 T-cell dependent 반응을 통하여 유도됨을 알 수 있었다. 더군다나 OmpH ligand가 경구 투여된 mouse에서 IL-6를 분비하는 세포들이 많아지는 특성은 C5aR의 활성화 결과에 의하여 일어나는 특징과 일치하는 특성으로 설명될 수 있어 C5aR가 M cell targeting을 통한 항원 전달 및 IL-6 cytokine의 분비를 통한 immunostimulatory 효과까지 유발함을 확인할 수 있었다. 또한 EGFP-OmpH 재조합 단백질이 2번 경구 투여된 mouse에 항원인 EGFP를 systemic challenge를 통하여 접종한 경우에 유도되는 면역반응의 특징 관찰을 통해 OmpH에 의한 효과적인 oral priming effect가 일어나며, 경구 내성을 유발하지 않고 오히려 이를 극복할 수 있음을 검증하여 경구백신 개발의 매우 중요한 tool로 사용될 수 있음을 제시하는 매우 흥미로운 결과로 생각되었다(그림 91).

결과적으로 OmpH ligand를 이용한 경구백신 모델에서, M cell에서 발현되는 C5aR에의 targeting을 통한 항원전달 및 활성화를 통한 면역증강을 확인함으로써 C5aR가 경구 백신의 좋은 target receptor로 사용할 수 있음을 입증할 수 있었다.

결과를 보면 EGFP 경구 백신 모델 시스템에서 ligand로 사용된 OmpH는 전신 및 점막에서 항원에 대한 높은 면역반응을 유도할 수 있음을 ELISA를 통하여 확인할 수 있었다. 또한, 이렇게 증진된 면역반응은 각 면역 기관의 세포들로부터 다시 확인할

(라) C5aR ligand OmpH를 이용한 경구 백신 모델에서 M cell target receptor, C5aR의 역할 검증

C5aR의 M cell targeting receptor로서의 기능을 검증하기 위해 C5aR knock-out mouse에 C5aR ligand중 하나인 *Y. enterocolitica*의 OmpH를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-OmpH를 경구 투여하였다. 2주간 2번의 경구 투여 4주 후 얻은 serum에서 EGFP-specific IgG level을 확인한 결과 ligand OmpH에 의한 EGFP-specific IgG level의 증가는 normal SPF C57BL/6에서는 관찰 되지만, C5aR knock-out mouse에서는 효과가 보이지 않았다(그림 92). 이는 전신 면역계인 spleen으로부터 얻은 면역세포에서 EGFP-specific IgG를 분비하는 세포에서도 동일하게 확인되었다. 점막 면역계의 유도조직인 PP와 실행조직 LP로부터 얻은 면역세포들로부터 EGFP specific IgA를 분비하는 세포를 확인하였을 때 또한 OmpH ligand에 의한 항원 특이적 IgA secretory cell의 증가는 C5aR knock-out mouse에서는 유도되지 않았다(그림93).

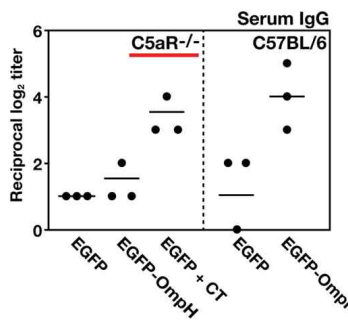


그림 92. EGFP-specific IgG level in serum of C5aR knock-out mice or SPF C57BL/6 immunized by indicated antigen

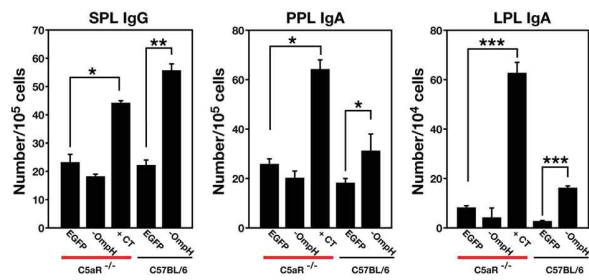


그림 93. Number of EGFP-specific IgG or IgA SCs in spleen, PP, or LP of C5aR knock-out mice or SPF C57BL/6 immunized by indicated antigen

유도된 면역반응의 특성을 확인하기 위해 OmpH의 immunostimulatory effect로 기대되는 IL-6 SC의 유도를 확인 한 결과 C5aR knock-out mouse에서는 OmpH에 의한 변화가 관찰되지 않는 반면 normal SPF C57BL/6 mouse에서는 OmpH ligand에 의해 IL-6 SCs 증가가 확인됐다.

따라서 C5aR의 ligand 중 하나인 *Y. enterocolitica*의 OmpH는 C5aR를 통해 점막의 M cell로 항원을 전달할 수 있을 뿐 아니라 IL-6의 증가를 통해 항원 특이적 면역반응의 유도에 관여할 수 있는 것을 검증했다(그림 94).

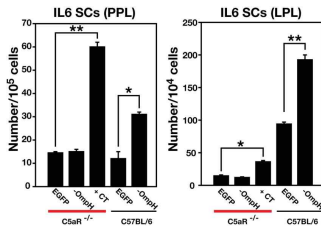


그림94. IL-6 SCs against EGFP in PP or LP of C5aR knock-out mice or SPF C57BL/6 immunized by indicated antigen

(마) 병원성 항원 Dengue virus(DENV) EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 M cell target receptor, C5aR의 적용

M cell target receptor, C5aR를 통한 항원의 M cell targeting을 확인하기 위해 재조합 단

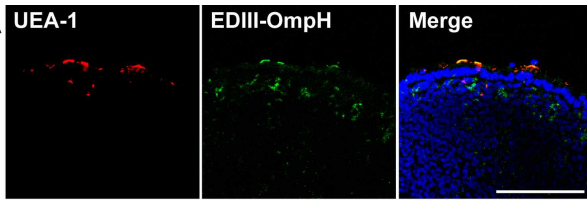


그림 95. Identification of *in vivo* M cell targeting of EDIII-OmpH in cryosectioned PP slice at 20 min after oral administration of EDIII-OmpH

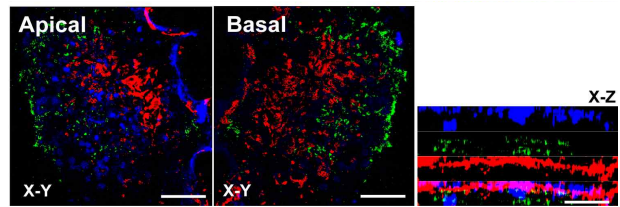


그림 96. Identification of *in vivo* M targeting of EDIII-OmpH in whole-mounting at 20 min after oral administration of EDIII-OmpH

백질 EDIII-OmpH를 확보한 후 mouse에 경구 투여를 통한 *in vivo* targeting을 확인 하였다. 그림 95 과 96에서 보는 것처럼 EDIII-OmpH를 경구 투여 후 20분에 얻은 PP를 cryosection 과 whole mounting으로 준비 후 rhodamine conjugated UEA-1으로 M cell을 anti EDIII antibody로 EDIII-OmpH를 staining 했다. confocal laser scanning microscope system으로 관찰 한 결과 EDIII-OmpH는 mouse PP의 M cell에 보다 효율적으로 targeting 되는 것을 확인했다. 이러한 M cell targeting이 항원 특이적 면역반응유도로 연결될 수 있는지 확인하기 위해 EDIII, EDIII-OmpH, EDIII+CT는 일주일에 한번씩 3번 경구 투여 된 후 4주에 serum 과 fecal을 얻어 EDIII-specific IgG 와 IgA의 level을 확인했다(그림 97). 전신 면역계의 spleen과 점막 면역계의 유도조직 PP와 실행조직 LP로부터 얻은 면역세포들로부터 EDIII-specific IgG or IgA SC을 확인 하였다 (그림 98). EDIII-OmpH가 경구투여 된 개체는 전신 면역계 및 점막 면역계

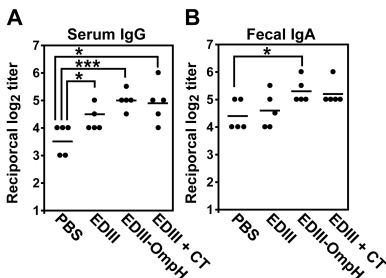


그림 97. EDIII-specific IgG or IgA level in serum or fecal of mice immunized by indicated extract of mice immunized by antigen indicated antigen

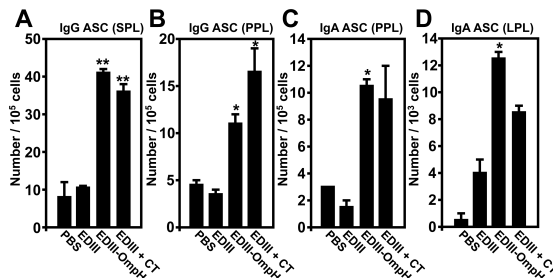


그림 98. Number of EDIII-specific IgG or IgA SCs in spleen, PP, or LP of mice immunized by indicated extract of mice immunized by antigen indicated antigen

모두에서 EDIII-specific IgG or IgA 의 발현을 향상시키는 효과를 얻었다. 이러한 면역반응이 memory를 유지 할 수 있는 T cell mediated immune response임을 검증하기 위해  $[^3\text{H}]$ 을 이용한 EDIII에 대한 splenocyte proliferation 및 Th1/2 cytokine발현 T cell을 확인하였다(그림 99 와 100).

EDIII-OmpH가 경구 투여된 개체에서 얻은 splenocyte는 점막 보조제로 잘 알려진 CT와 함께 경구 투여된 개체로부터 얻은 splenocyte와 유사한 proliferation을 보였으며, Th1 type cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 발현은 확인되지 않았지만 Th2 type의 IL-4 와 IL-6를 분비하는 세포들은 증가하는 특징을 보였으며 이는 EGFP 에 적용되었을 경우와 유사하기 때문에 항원의 특징 보

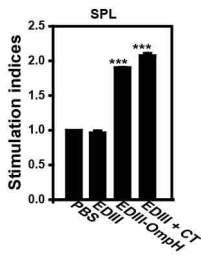


그림 99. SPL proliferation against rEDIII protein

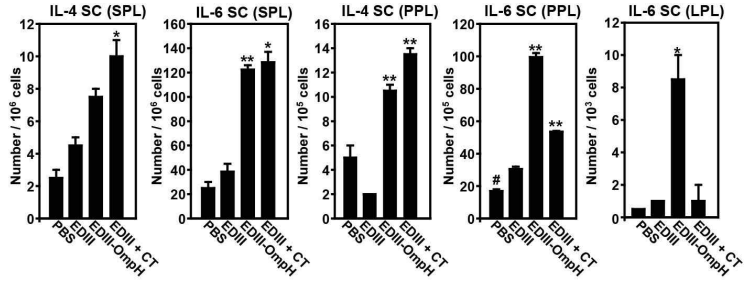


그림 100. Number of Th1/Th2 type cytokine secretory cell in spleen and PP of mice immunized by indicated antigen

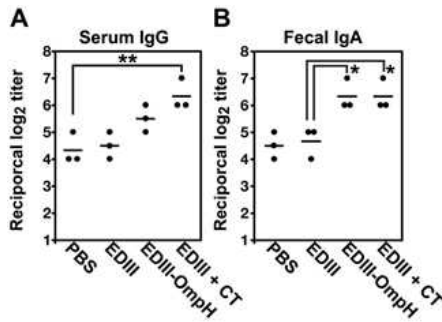


그림 101. EDIII-specific IgG or IgA level after systemic challenge with rEDIII in serum or fecal extract of mice immunized by indicated antigen

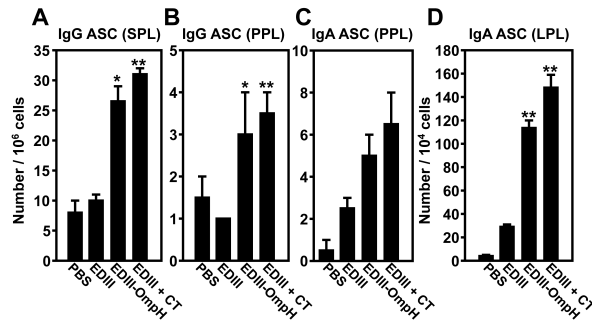


그림 102. Number of EDIII-specific IgG or IgA SCs after systemic challenge with rEDIII in spleen, PP, or LP of mice immunized by indicated antigen

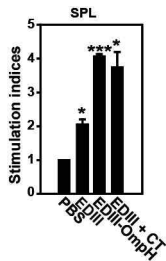


그림 103. SPL proliferation against rEDIII protein

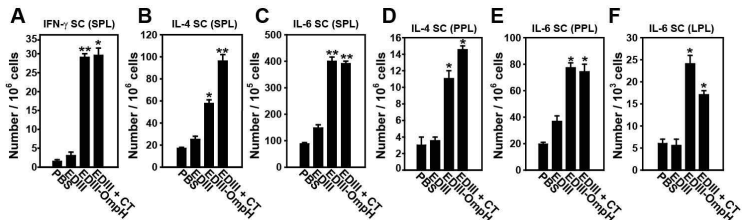


그림 104. number of Th1/Th2 type cytokine secretory cell after challenge with EDIII in spleen and PP of mice immunized by indicated antigen

다는 OmpH에 의한 immunostimulatory effect로 기대된다. 이때 경구 내성유무를 확인하기 위해 EDIII를 복강으로 challenge 한 후 얻은 serum 과 fecal extract에서 EDIII-specific IgG or IgA level을 관찰한 결과 EDIII가 경구 투여된 개체에 비해 EDIII-OmpH가 경구 투여된 개체에서 EDIII-specific IgG 와 IgA level이 2배 증가된 것을 확인했다(그림 101). 전신 면역계 spleen 과 점막의 유도 조직 및 실행 조직으로부터 얻은 면역세포들에서 EDIII-specific IgG or IgA를 분비하는 세포들의 증가 또한 EDIII-OmpH가 경구 투여된 개체에서 높게 관찰되어 경구 내성이 극복을 확인 할 수 있었다(그림 102). 경구 내성 유무에 대한 보다 정밀한 확인을 위해 splenocyte에서 항원 EDIII 에 대한 proliferation을 [<sup>3</sup>H] uptake를 통해 확인 한 결과 항원에 대

한 proliferation이 control group에 비해 EDIII-OmpH가 경구 투여된 group에서 얻은 splenocyte가 적어도 3배 이상 항원에 대해 proliferation 했기 때문에 경구 내성이 극복되었음을 확인했다(그림 103). 또한, systemic challenge 후 전신 및 점막 면역계의 세포들에서 Th1/Th2 type cytokine secretory cell들의 면역반응의 특성 분석을 한 결과 OmpH ligand에 의한 Th2 type 우세적 면역 반응이 확인 되었다(그림 104).

이러한 결과들을 바탕으로 OmpH ligand를 이용한 M cell의 C5aR의 targeting 및 immunostimulatory effect는 점막 보조제로써 병원성 항원을 이용한 경구 백신 모델에 효과적으로 이용될 수 있음을 확인했다.

(2) M cell target receptor C5aR와 병원균 사이의 신호체계 분석을 통한 점막의 항원 유입기작에 대한 이해 증진

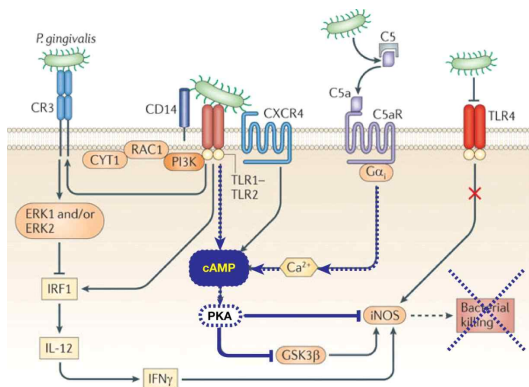
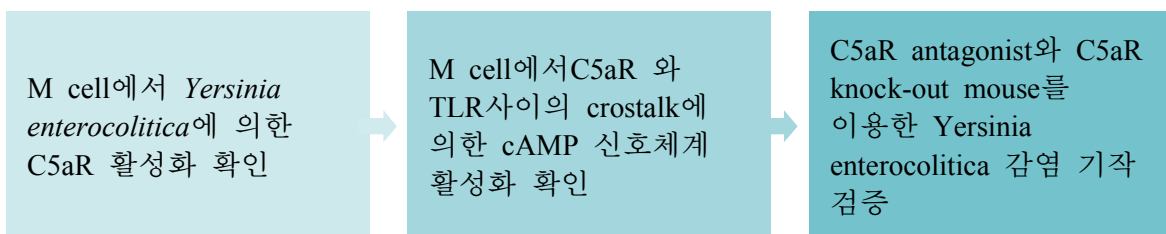


그림 105. Cross-talk pathways between Toll-like receptors and the complement system. (Hajishengallis & Lambris, 2011)

체액성 면역반응의 대표적인 시스템인 complement 시스템에서 C5aR는 여러 병원균에 의하여 활성이 조절되는 것으로 보고된다(Figure 4)(Lee & Kim, 2007; Hajishengallis & Lambris, 2010). 예를 들어 *Staphylococcus aureus*의 CHIPS는 C5aR에 결합하여 chemotaxis 신호전달을 억제한다. *Porphyromonas gingivalis*는 C5로부터 C5a release를 유도하는 효소를 분비하여 C5aR를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. *Y. enterocolitica*의 경우 outer membrane H의 α1 helix가 C5aR의 ligand로 알려져 있으나 아직 정확한 기작에 대한 연구 결과는 보고되고 있지 않다. 면역세포에서 C5aR의 활성화는 TLR-4와 함께 작용할 때 TLR-4에 의한 IL-12 계열 cytokine 발현

을 억제할 뿐 아니라, cAMP 발현을 높여 nitric oxide 발현량을 줄임으로서 세포 내 박테리아 생존을 돕는 역기능이 보고됨에 따라 M cell에서 complement receptor와 TLR사이의 신호 조절이 병원균 감염에 밀접하게 연관되어 있는 것으로 추정되며 이에 대한 이해는 장내 병원균 감염에 대한 치료제 개발에 중요한 기초 자료를 제공 할것으로 기대한다. (Bosmann et al., 2012).



(가) M cell을 통한 병원균 침투 중 C5aR의 발현 및 활성화

Human M-like cell 및 mouse M cell에서 발현이 확인된 C5aR은 ligand에 의해 활성을 가질

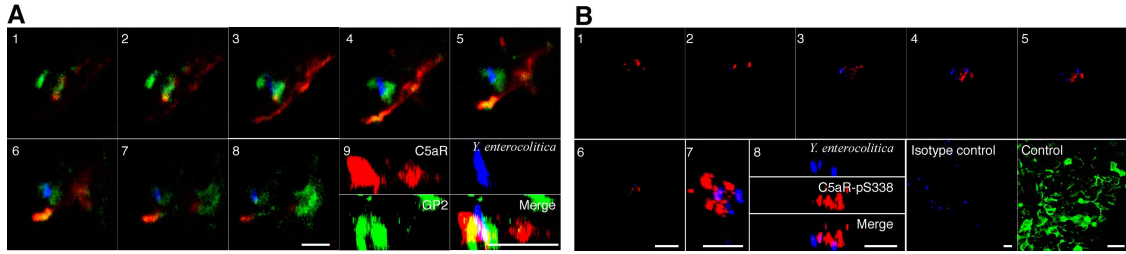


그림 106. C5aR plays a non-redundant role for in vivo M cell invasion by *Y. enterocolitica*

때 S338에 phosphorylation이 되면서 endocytosis를 위한 신호전달이 이루어지는 것으로 알려져 있다. 따라서, M cell에 병원균이 유입되는 동안 C5aR의 발현 및 활성화 여부를 CLSM을 통하여 관찰하였다(그림 106).

먼저 DAPI로 표지된 *Y. enterocolitica*를 mouse에 경구로 투여한 후 M cell을 확인하기 위해 anti-GP2 antibody와 PE로 표지된 anti-mouse C5aR 혹은 anti-pS338 C5aR을 이용하여 M cell을 통한 병원균 유입 시 M cell에서 C5aR가 발현될 뿐 아니라 phosphorylation됨을 확인하였다. 이러한 결과들로 C5aR의 M cell에서의 발현에 대한 검증 및 항원 유입에서 C5R의 중요한 역할을 입증할 수 있어 M cell 항원 유입에 대한 정보를 확보할 수 있는 중요한 단서를 확보하였다

M cell에서 C5aR와 TLR 사이의 상호 신호전달 여부를 파악하기 위해 먼저 M cell에서 C5aR와 TLR의 발현을 확인하였다. Mouse M cell에서 C5aR(green), TLR-1/2, TLR-4 가 모두 PP의 특정 부분에서 발현 되는 것을 확인하였다(그림 107).

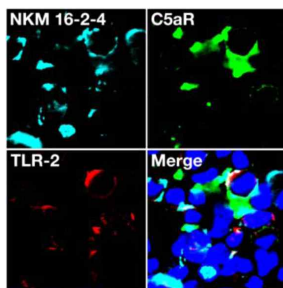


그림 107. Identification of the expression of C5aR, TLR1/2, TLR-4 on mouse follicle associated epithelium of peyer's patch.

Mouse M cell에서 GP2-specific antibody(green)으로 구별 하였을 때, C5aR(red)와 TLR-1/2(purple)이 함께 발현되고 있음을 확인하였으며 Mouse M cell에서 M cell-specific antibody NKM-16-2-4(green)로 구별 하였을 때, C5aR(red)와 TLR-4(purple)가 함께 발현되고 있음을 확인하였다(그림 108 과 그림 109).



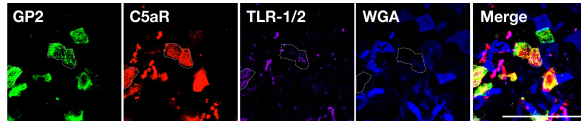


그림 108 Identification of the expression of C5aR, TLR1/2 on mouse M cell.

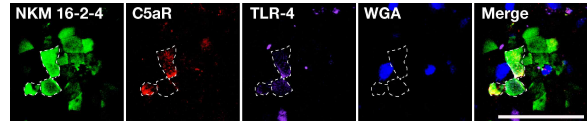


그림 109. Identification of the expression of C5aR, TLR4 on mouse M cell.

*Yersinia enterocolitica*의 감염 동안 M cell에서 C5aR와 TLR의 상호 신호전달을 확인하기 위해 CFSE로 tagging된 *Yersinia enterocolitica*를 이용하여 경구투여를 통해 장내 Peyer's patch로의 감염을 유도한 후 Peyer's patch를 통해 *Yersinia enterocolitica* 유입되는 동안 M cell은 C5aR(red)와 TLR-1/2(pink)를 발현하고 있음을 확인하였을 뿐 아니라 *Yersinia enterocolitica*(green)는 Peyer's Patch의 C5aR와 TLR-1/2(red)를 발현하는 M cell에 보다 우선적으로 감염 하며, 이때 C5aR는 phosphorylation(purple)되어 활성화된 상태임을 확인하였다(그림 110과 그림 111).

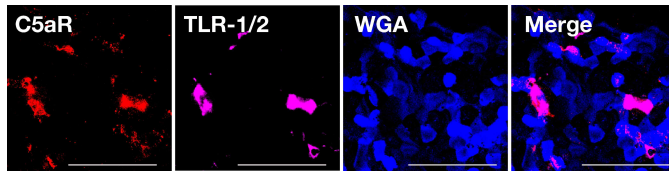


그림 110. Identification of the clustering of C5aR and TLR1/2 during *Yersinia* infection.

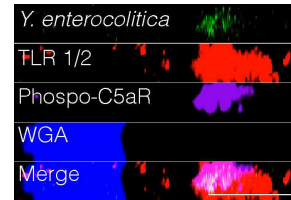


그림 111. Identification of the activation of C5aR during *Yersinia* infection.

따라서, 위의 결과들을 바탕으로 M cell은 C5aR와 함께 TLRs을 발현 하고 있으며, *Y. enterocolitica*의 감염 동안 두 receptor사이의 상호 작용이 이루어지고 있음을 확인하였다.



(3) 결론 3

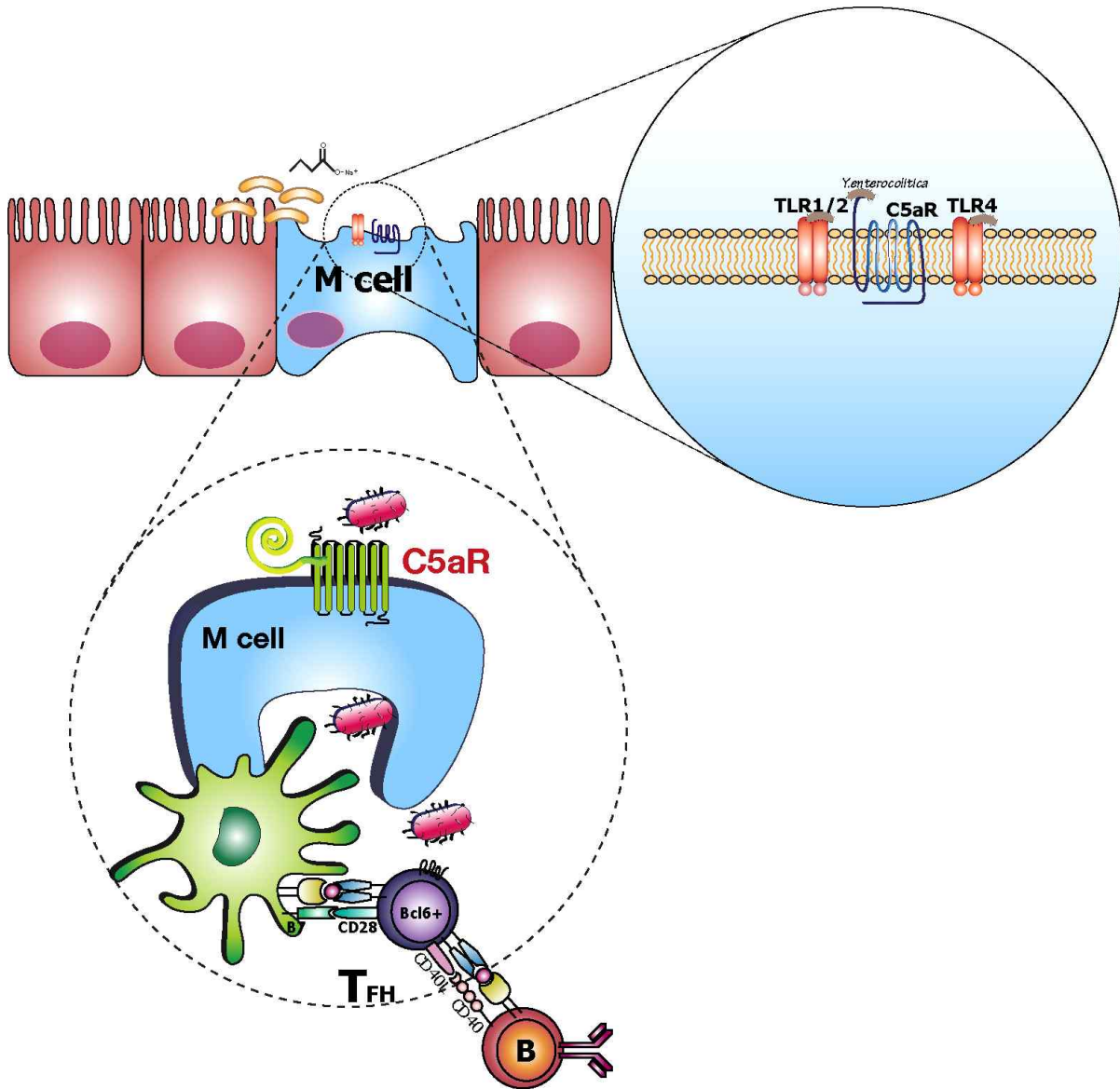


그림 112. 결론 3.

본 연구를 통해 M cell에서 complement 5a receptor의 발현을 처음으로 보고 하였다. M cell에서 C5aR 발현은 두 가지 방향으로 연구되었다. 먼저 M cell 특이적으로 발현하는 C5aR가 M cell target receptor로 기능을 수행할 수 있는지를 확인하였다. C5aR의 ligand로 알려진 *Yersinia enterocolitica*의 outer membrane protein H의  $\alpha 1$  helix를 이용하여 항원의 전달 증진 및 C5aR의 활성화를 검증 하였을 뿐 아니라 함께 전달된 항원에 대한 점막 및 전신 면역계에서 항원 특이적 면역반응의 증진을 확인하였다. 항원에 대한 높은 Th2 면역 유도 및 경구 내성의 극복할 수 있는 면역반응의 유도는 outer membrane protein H의  $\alpha 1$  helix에 의한 C5aR의 targeting이 경구 백신 모델에서 효과적으로 응용될 수 있음을 보여준다. 다음으로 M cell에서 C5aR에 의한 병원균 유입 기작에 대한 이해는 백신의 전달 및 병원균에 대한 치료제 개발에 중요한 정보를 제공할 것으로 기대하고 C5aR에 의한 병원균 *Yersinia enterocolitica*의 감염 경로에 대해 조사 하였다. M cell에서 *Yersinia enterocolitica*는 C5aR 와 TLR의 상호 작용을 유도

하여 cAMP의 발현을 증가시키고 이는 NO의 발현을 억제하여 병원균의 유입을 돕는다는 것을 확인하였다. 따라서 이 기초 연구는 병원균 유입기작에 대한 치료제 개발 및 M cell을 통한 항원 전달을 위한 보조제 개발에 중요한 자료를 제공할 것으로 기대한다.

# 제 7 절 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발

(제 2핵심- 제2세부과제- 고려대학교)

## 1. 외래 단백질 고효율 과발현 및 대량생산을 위한 식물 시스템 개발 (1~2년차)

### (1) hMBP 단백질 발현을 위한 당근 형질전환 벡터 제작

hMBP (human myelin basic protein) 단백질의 cDNA서열과 식물 형질전환 벡터인 pCHF3 벡터를 기본으로 하여 CaMV 35S 프로모터와 뿌리에의 특이적 과다발현 성능이 확인된 고구마의 *ibAGP1* small subunit의 프로모터 (1.9 kb) 그리고 transit peptide (222 bp)를 각각 이용하여 형질전환 벡터를 제작하였다. 이들 벡터를 각각 pCHF3:hMBP, pCHF3:*ibAGP1*-pro-TP-hMBP 그리고 pCHF3:*ibAGP1*-pro-hMBP라고 명명하였다 (그림 1).

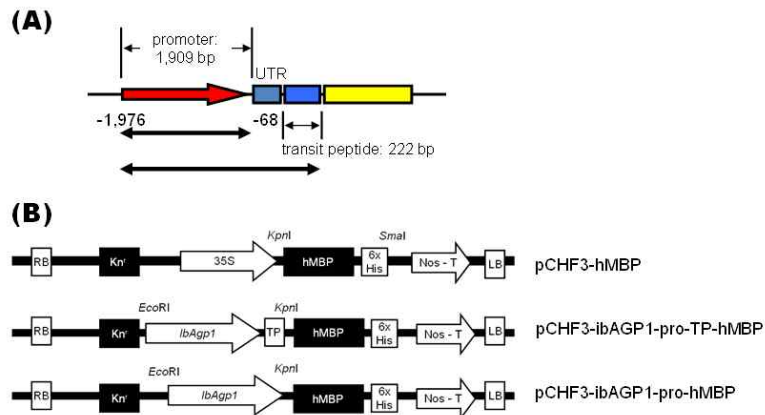


그림 1. (A) 형질전환 벡터 제작에 이용한 고구마 *ibAGP1* 유전자의 프로모터와 transit peptide. (B) 식물체 형질전환을 위해 제작한 형질전환 벡터.

### (2) 애기장대 형질전환

제작한 벡터를 *Agrobacterium*에 도입하였고 floral dipping 방법으로 애기장대에 형질전환하였다. T<sub>1</sub> 단계에서 그 유전자의 삽입을 PCR로 확인하였고 (그림 2) 다음 세대에서 선별을 진행하였다.

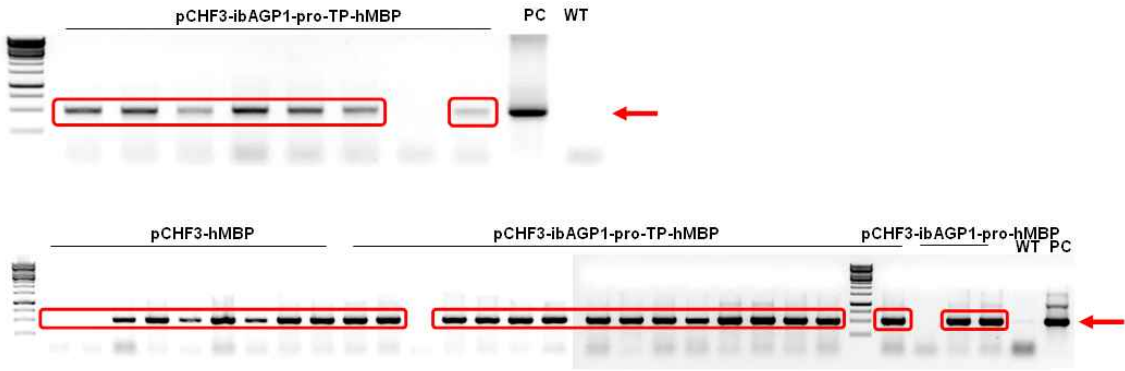


그림 2. 애기장대 형질전환 식물체의 유전자 삽입 확인. WT는 야생형, PC (positive control)는 플라스미드를 주형으로 한 PCR, 빨간 화살표는 예상 증폭 크기 (504 bp).

### (3) 당근 형질전환

상기 벡터로 당근 형질전환체를 제작하였다. 짧게 잘라낸 petiole에 Agrobacterium을 감염시키고 캘러스를 유도하였다 (그림 3). 형질전환 캘러스에서 shoot이 분화되면 배지를 옮겨 가며 계대배양을 계속하다가 흙으로 옮겨갔다. 흙으로 옮겨진 식물체에서 조직을 채취하여 PCR을 통해 유전자의 삽입과 발현을 확인하였다 (그림 4).

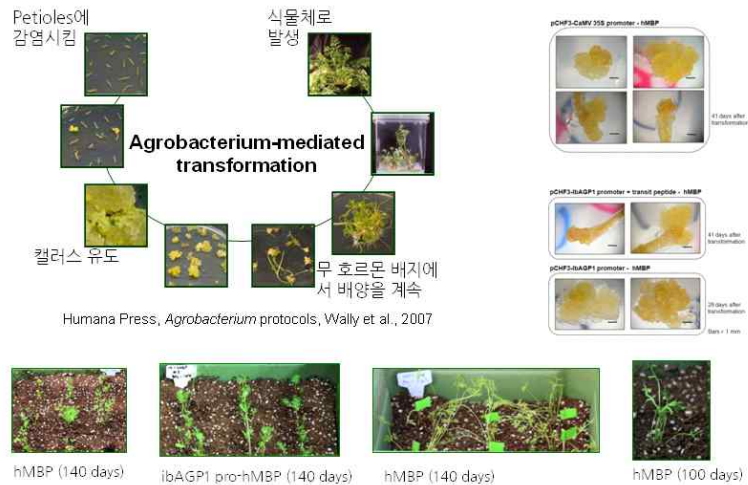


그림 3. Agrobacterium을 이용한 당근 형질전환 방법과 형질전환된 당근 식물체의 분화 과정.

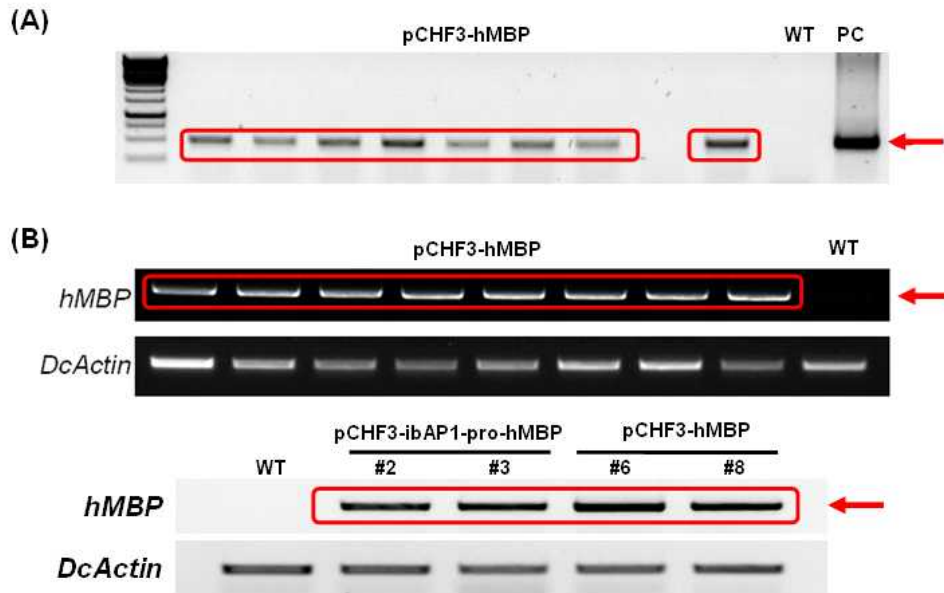


그림 4. 담근 형질전환체에서의 PCR 결과 (A)와 RT-PCR 결과 (B).  
담근의 액틴 유전자 (*DcActin*)는 loading control로 사용.

#### (4) *hMBP* 과발현 형질전환 담배 실험

35S promoter 조절 하에 *hMBP*를 발현하는 pK2GW7:MBP 벡터를 제작하였고 (그림 5A), 이 바이너리 벡터를 LBA4404 *Agrobacterium*에 형질전환하였다. leaf disk 방법으로 담배에 형질전환하여 8개의 independent transgenic tobacco를 육성하였다 (그림 5B). 이들 형질전환 담배 잎으로부터 단백질을 추출하고, MBP 항체를 이용하여 Western blot를 수행하였으나, MBP 발현 band가 검출되지 않았다. 이러한 결과는 본 실험에 사용한 MBP 항체의 검출능력이 떨어지거나, 담배에서 MBP 발현양이 낮은 두 가지 사유 중 하나로 판단되어, 항체를 직접 제작하거나 발현수준을 높일 필요가 있다고 판단되었다.



그림 5. 형질전환담배 제작에 사용한 binary vector (A)와 T<sub>0</sub> 형질전환 담배 (B).

(5) MBP 단백질의 대장균 발현 실험

MBP 단백질이 생체 내에서 안정적으로 발현되는지를 확인하기 위해서 MBP 단백질을 대장균의 세포질, periplasm 및 thioredoxin fusion 형태로 발현시켜 보았다. 세포질에 발현시키기 위해 pET300:MBP를 제작하였고, periplasm에 발현시키기 위해서 pET22b:MBP를, thioredoxin fusion form으로 발현시키기 위해서는 pET32:Trx-MBP 벡터를 제작하였다. 제작한 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) strain으로 형질전환하여 MBP 발현정도를 monitoring 하였다. 먼저 pET300:MBP 발현의 경우, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도시킨 후, 시간별로 발현 양을 western blot으로 조사한 결과 IPTG에 유도된 MBP 단백질이 처리 1시간 정도에서 최대한 발현되다가 점점 발현 양이 줄어들었다 (그림 6 위A). 이는 대장균에서 MBP 단백질이 빠르게 분해되는 것으로 사료된다. 일반적인 Ni<sup>2+</sup> column을 이용하여 affinity 정제를 하면, MBP 단백질이 쉽게 정제되지 않음을 관찰하였다 (그림 6 위B, C, D). MBP 단백질을 대장균의 periplasm으로 발현시킨 경우에도 IPTG 0.5 mM 처리 후 다량의 MBP 단백질의 발현이 유도되었고, 2시간 이후부터 발현 양이 급격히 줄어드는 현상을 보여, 세포질 발현과 같이 대장균 세포내에서 재빨리 분해되는 것으로 사료된다 (그림 6 중간A).

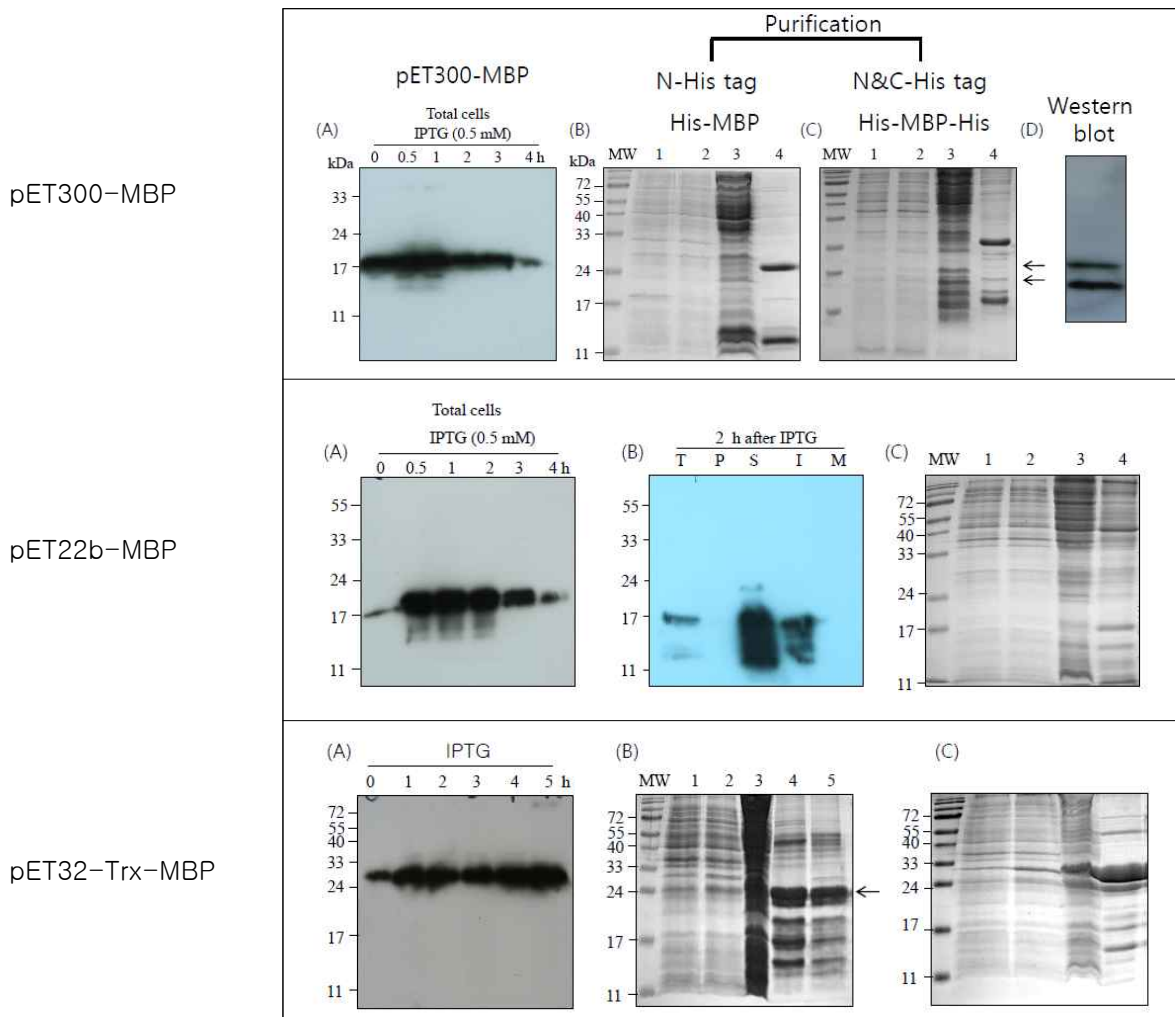


그림 6. MBP 단백질의 대장균 발현 실험.



MBP 단백질이 대장균의 periplasm으로 targeting되는지 보고자 periplasm를 분리하여 western blot를 수행한 결과, MBP 단백질이 periplasm으로 targeting되는 것이 아니라, 대부분이 세포질에 soluble protein으로 존재하고, 약간의 MBP가 insoluble fraction에서 발견되는 경향을 보였다. Medium 내에서는 MBP 발현이 검출되지 않았다 (그림 6 중간B). Ni<sup>2+</sup> column을 이용하여 affinity 정제 시 MBP 단백질이 정제되지 않았다 (그림 6 중간C). 마지막으로 MBP 단백질을 thioredoxin-MBP fusion 형태로 발현시켜 보았다. Thioredoxin 단백질은 11 Kda 분자량으로 targeting 단백질의 solubility를 증대시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Trx-MBP 발현 경우, IPTG 유도 후 5 시간 이후에도 안정적으로 대량 생산되는 특성을 보였으며 (그림 6 아래 A), 일반적인 Ni<sup>2+</sup> column을 이용한 정제의 경우, Trx-MBP 단백질이 정제되지 않았다 (그림 6 아래B). 그러나 6 M urea 용액에서는 Trx-MBP 단백질이 정제되는 것을 관찰하였다(그림 6 아래C).

#### (6) 당근 형질전환체에서의 *hMBP* 유전자 과발현

제작한 각각의 벡터를 도입시킨 당근 형질전환체로부터 PCR 분석을 통하여 형질전환체를 선별하였고 (그림 7A), *hMBP* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다 (그림 7B). *hMBP* 유전자의 발현은 선별된 형질전환체에서 모두 강하게 발현되었으며, 특히 *hMBP* 유전자는 35S CaMV promoter보다 고구마 AGP1 promoter의 조절 하에서 보다 높게 발현되었다.

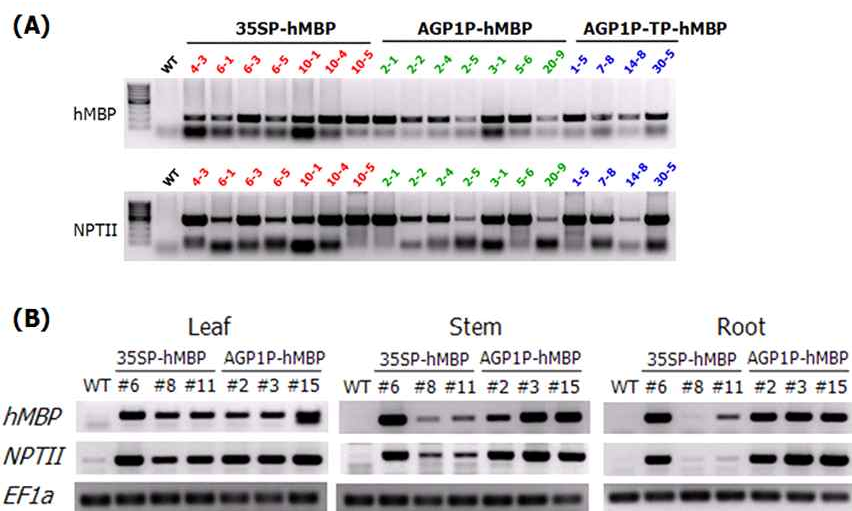


그림 7. (A) PCR 분석에 의한 당근 형질전환체의 선별, (B) RT-PCR 분석을 이용한 *hMBP* 유전자의 발현양상 분석.

#### (7) 당근 형질전환 식물체의 대량생산

PCR과 RT-PCR 분석에 의하여 *35SP:hMBP*에서 총 7라인을, *AGP1P:hMBP*에서 총 8라인을, *AGP1P:TP-hMBP*에서 총 3라인을 선별하였다. 선별된 각각의 당근 형질전환 식물체는 shoot 재



분화 유도를 통한 기내배양을 하여 형질전환 재분화체를 대량으로 획득하였으며 (그림 8A), 이들은 인공토양에 파종한 뒤 온실에서 순화처리를 거쳐서 굵은 당근 뿌리와 T<sub>1</sub> 종자를 수확하였다 (그림 8B).

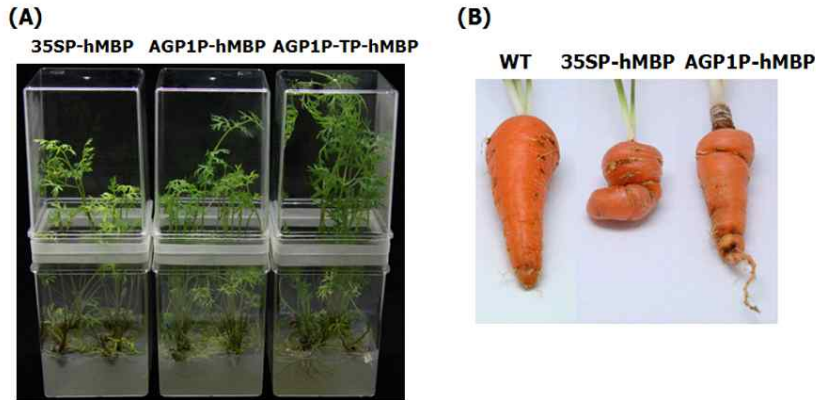


그림 8. (A) 선별된 당근 형질전환체의 기내배양을 통한 대량생산. (B) 온실에서 순화과정을 거쳐서 수확된 당근 뿌리.

#### (8) 당근 형질전환체에서 총 단백질 분리 및 hMBP 단백질의 과발현 여부 조사

당근 형질전환체의 뿌리에서부터 보다 효율적인 총 단백질 추출 방법을 탐색하기 위하여 추출용액의 조성 및 protease inhibitor 유무에 따른 단백질 추출 농도를 비교하였다. 총 단백질의 추출 방법은 그림 9A에 나타내었다. 추출 단계 1에서 추출 용액의 pH와 용해도를 다양하게 바꾸어서 5종류의 추출용액으로 총 단백질을 추출하여 비교하였다. 그 결과 0.1 M sodium acetate (pH 4.5)를 이용하여 총 단백질을 추출하였을 때 당근 뿌리의 단위 생중량 당 4.13 mg으로 총 단백질이 가장 높은 농도로 추출되었다 (그림 9B). 또한 추출된 단백질 용액에 포함되어 있는 염을 제거하고 단백질을 농축하기 위하여 ultra-amicon filter를 이용하여 filtration을 한 경우 훨씬 더 많은 양의 총 단백질을 분리할 수 있었다 (그림 9C).

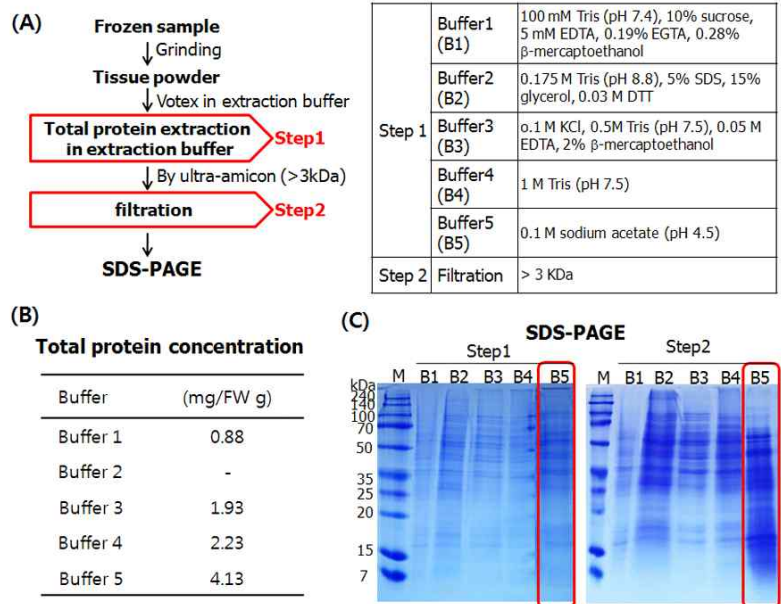


그림 9. (A) 당근 형질전환체 뿌리로부터 총 단백질 추출 방법과 추출용액 조성, (B) 각 추출 용액에 따라 추출된 총 단백질 농도, (C) 각 추출용액에 의해 추출된 단백질의 SDS-PAGE 분석.

또한 총 단백질 추출 과정 동안에 hMBP 단백질의 안전성을 높이기 위하여 protease inhibitor의 유무를 비교하였다. 그림 10에서 보는 것과 같이 protease inhibitor를 처리하여 추출하였을 때 SDS-PAGE에서 더욱 선명한 단백질 영동 패턴을 관찰할 수 있었다. 이들 결과로부터, 당근 뿌리로부터 protease inhibitor를 포함한 0.1 M sodium acetate (pH 4.5) 용액으로 총 단백질을 추출하는 것이 가장 효율적이라는 것을 규명하였다.

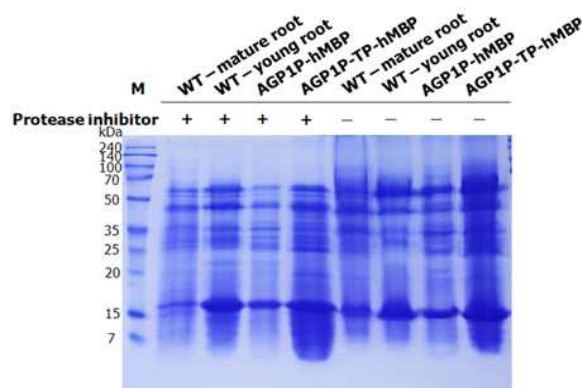


그림 10. protease inhibitor 유무에 따른 총 단백질 추출 조건의 최적화 탐색.

최적화된 추출용액을 이용하여 각각의 벡터로 형질전환된 기내배양 재분화체로부터 총 단백질을 추출하였다 (그림 11A). 각각의 형질전환체 모두에서 선명하고 높은 농도로 총 단백질이 추출되는 것을 확인하였다. 또한 당근 뿌리 (야생형, WT)에서보다 기내 재분화체 (형질전환체)에서 약 4배정도 높은 농도로 총 단백질이 추출되었다 (그림 11B). 이는 굵은 당근 뿌리에

높은 섬유질을 함유하고 있기 때문에 단위 생중량당 총 단백질이 어린 재분화체에 비해서 더 적게 추출된 것으로 사료된다.

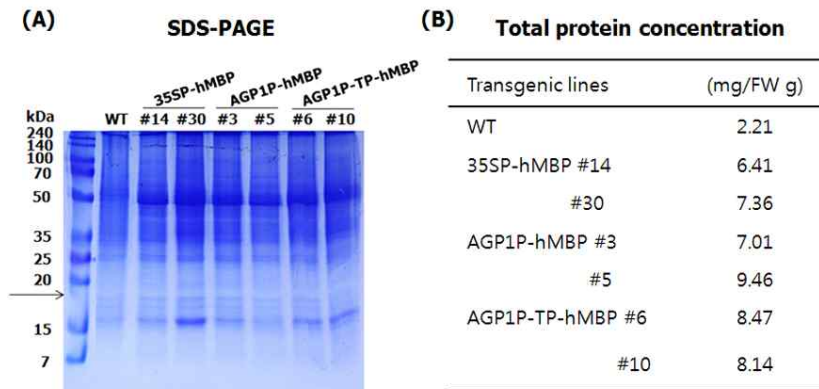


그림 11. 당근 형질전환체로부터 최적 조건으로 추출된 총 단백질의 분리 (A) 및 농도 (B).

당근 형질전환 식물체 내에서 안정적으로 hMBP 단백질이 과발현되는지를 확인하기 위하여 당근 뿌리로부터 총 단백질을 추출하여 western blot을 수행하였다. *hMBP* 유전자의 아미노산 서열로부터 예상되는 단백질 사이즈는 약 18.7 kDa이지만, western blot 결과에서 hMBP 단백질은 이보다 큰 사이즈에서 여러 개의 밴드가 약하게 검출되었다 (그림 12). 이러한 결과는 당근에서 hMBP 단백질의 발현양이 매우 낮고, 당근 생체 내에서 생성된 hMBP 단백질은 다양한 modification이 일어나는 것으로 사료된다.

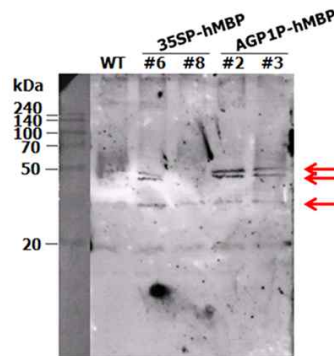


그림 12. 당근 형질전환체에서 MBP 단백질 western blot.

#### (9) MBP 고효율 발현 당근 형질전환체를 위한 코돈의 최적화

*hMBP* 유전자의 usage codon을 분석한 결과 (그림 13), 인간 유래 유전자인 *hMBP*가 당근 식물체 내에서 단백질 발현율이 낮은 것은 각 아미노산에 해당되는 코돈이 당근에서는 사용빈도가 낮아 당근 식물체 내에서 단백질로의 전환이 낮을 것으로 판단되었다. 인간과 당근의 유전자 코돈 사용빈도를 분석한 결과는 그림 13에 나타내었으며, 두 종간에 큰 차이를 보임에 따라 인간 유래 단백질의 발현을 극대화시킬 수 있도록 당근의 전사과정에 맞도록 코돈을 바꿀

필요가 있다. *hMBP*의 코돈을 당근에 맞추어 바꿔서 각 아미노산을 코드하고 있는 코돈의 사용 빈도는 최대 1.97배까지 증가하였다.

a.a	Codon (frequency)		Change rate of frequency	a.a	Codon (frequency)		Change rate of frequency
	Human	Carrot			Human	Carrot	
M	AUG (22.0)	AUG (24.1)	22.0→24.1	L	CUG (39.6)	CUU (22.0)	13.0→22.0
A	GCC (27.7)	GCU (31.2)	14.7→29.0	T	ACC (18.9)	ACU (20.2)	11.4→20.2
S	AGC (19.5)	UCU (18.5)	11.8→18.0	D	GAC (25.1)	GAU (38.6)	19.6→37.8
Q	CAG (34.2)	CAG (18.9)	17.0→17.7	F	UUC (20.3)	UUU (22.6)	18.4→21.4
K	AAG (31.9)	AAG (38.0)	31.2→38.0	I	AUC (20.8)	AAG (38.0)	16.5→25.7
R	AGA (12.2)	AGA (13.1)	10.0→13.1	E	GAG (39.6)	AGA (13.1)	29.8→32.1
P	CCC (19.8)	CCU (18.1)	11.2→16.9	N	AAC (19.1)	AAU (26.2)	17.7→26.2
H	CAC (15.1)	CAU (13.5)	9.1→14.4	V	GUG (28.1)	GUU (25.4)	13.2→25.4
G	GGC (22.2)	GGA (24.2)	16.0→23.7	C	UGC (12.6)	UGC (7.8)	-
Y	UAC (15.3)	UAU (16.4)	13.3→16.4	STOP	UGA (1.6)	UAA (1.2)	

그림 13. 인간과 당근에서 최적 usage 코돈과 당근 MBP에서 변화된 빈도율.

그림 14에서와 같이 당근의 전사과정에 맞추어 코돈의 최적화된 염기서열을 바탕으로 *MBP* 유전자를 합성하였고, 이를 *cMBP*라고 명명하였다.



그림 14. 인간 유래의 MBP 유전자를 당근의 translational machinery에 최적화한 코돈.

(10) 단백질 고생산 벡터 시스템 구축 및 형질전환

당근 식물체 내에서 인간 유래 단백질의 고생산을 위하여 당근의 전사과정에 맞도록 코돈을 최적화한 *cMBP* 유전자를 모든 조직에서 발현이 높은 고구마 AGP1 프로모터 하에 조절되도록 형질전환 벡터를 제작하고 *AGPIP-cMBP*라고 명명하였다. 또한 *AGPIP-cMBP* 벡터를 기본



골격으로 하여 transit peptide를 함께 연결하여 MBP 단백질의 안전성을 증가시킨 벡터와 translational enhancer를 *cMBP* 유전자 앞에 연결하여 translational efficiency를 증가시킨 벡터를 제작하였고 이들을 각각 *AGPIP-TP-cMBP*와 *AGPIP-Eh-cMBP*라고 명명하였다.

식물체 내에서 MBP 단백질 고생산을 위해 제작한 3종류의 벡터를 *Agrobacterium*에 도입하였고 PCR과 sequence 분석을 통하여 형질전환된 *Agrobacterium*을 선별하였다 (그림 15). 형질전환된 *Agrobacterium*은 당근의 유식물체로부터 짧게 잘라낸 petiole에 감염시키고 캘러스를 유도하였으며, 형질전환 캘러스는 다시 shoot 재분화 배지에서 배양되며 당근에 형질전환하였다 (그림 16).

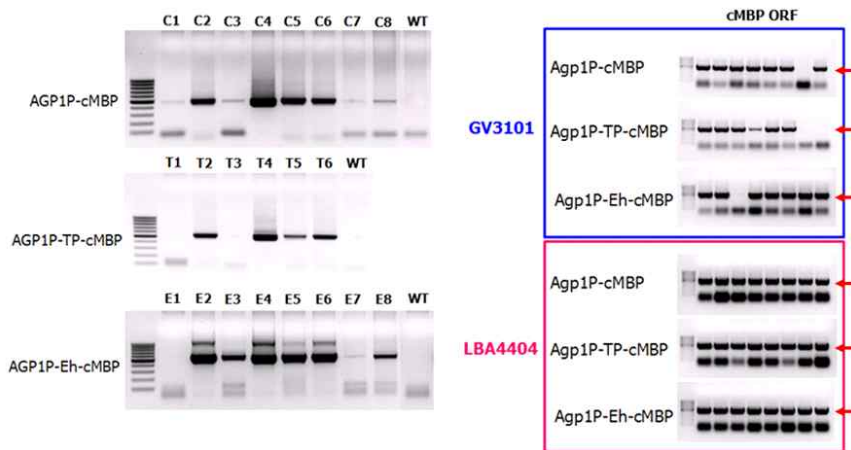


그림 15. 코돈 최적화한 *cMBP*를 포함한 벡터의 형질전환.

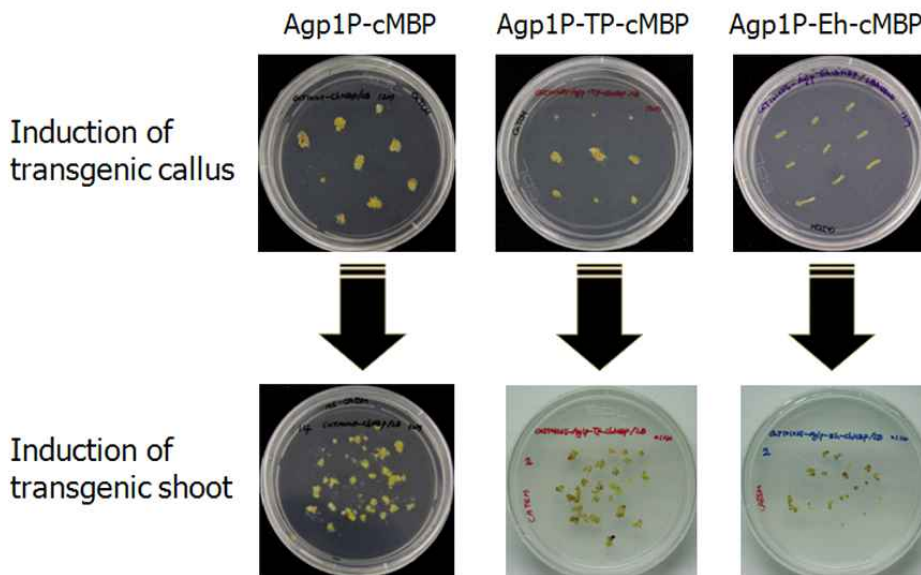


그림 16. *cMBP* 유전자를 포함한 단백질 고생산 벡터의 당근 형질전환.

#### (11) MBP 발현 형질전환 벼 육성

종자 특이 promoter인 Prolamin 조절하에 hMBP 유전자를 native한 형태로 (pIPKb:MBP), plastids targeting 형태로 (pIPKb:TS1-MBP, pIPKb:TS2-MBP), 그리고 thioredoxin fusion 형태로 (pIPKb:Trx-MBP) (그림 17A) 발현하는 바이너리 벡터를 제조하였고, *Agrobacterium*을 이용한 벼

형질전환 방법을 이용하여, T1 종자를 획득하였다 (그림 17B). 이들 종자는 각각의 형질전환 벼의 독립적인 형질전환 T0 라인들로부터 육성되었으며, pIPKb:MBP에서 7계통을, pIPKb:TS1-MBP에서 7계통을 pIPKb:TS2-MBP에서 8계통 그리고 pIPKb:Trx-MBP에서 9계통을 확보하였으며, 이들 독립라인들로부터 각각 T1 종자들을 수확하였다.

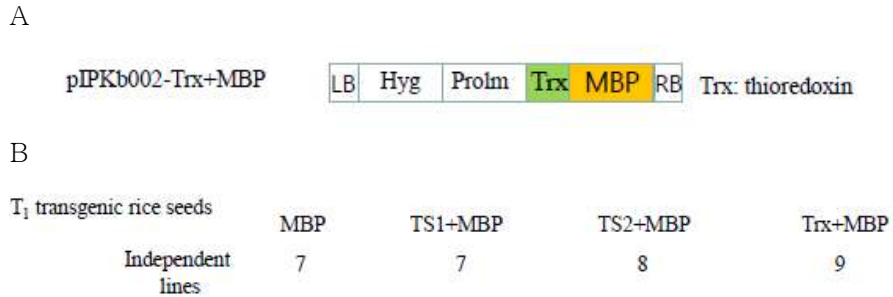


그림 17. 형질전환 벼 제작에 사용한 binary vector pIPKb:Trx-MBP의 모식도 및 각 형질전환 genotype들로부터 획득한 독립 라인 수.

T1 종자들로부터 단백질을 추출하여 앞서 정제한 Trx-MBP 단백질로부터 제작한 polyclonal antibody를 이용하여 western blot 분석을 수행한 결과, MBP 단독발현은 MBP 발현이 거의 검출되지 않았으며, TS 서열첨가와 Trx-MBP에서 예상되는 34 kDa 크기의 MBP 발현이 검출되었다 (그림 18). 그러나 native MBP, TS 부착 MBP 발현에서 검출된 단백질 밴드 크기와 fusion 단백질인 Trx-MBP 간의 단백질 size가 차이가 나지 않는 점을 볼 때, plastid targeting 서열이 종자 발현시 제거되지 않는 것으로 추정되거나, 아니면 MBP 단백질 검출에 사용한 항체가 문제가 있을 것으로 추정되어, 상업적으로 판매되는 MBP 항체, His 항체를 이용하여, 구체적인 발현 유무를 재확인하기로 하였다.

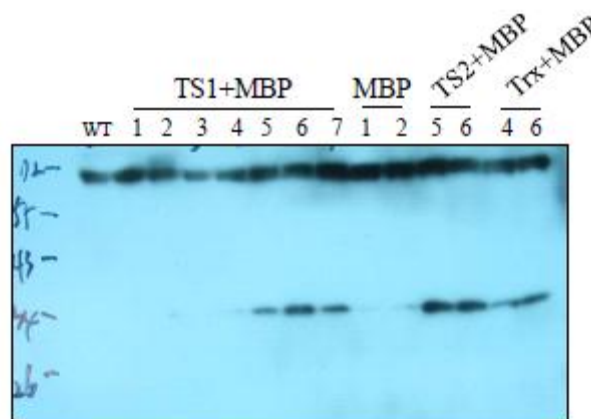


그림 18. 다양한 genotype 형질전환 벼로부터 MBP 발현 측정을 위한 western blot 분석.

자체 제작한 MBP 항체가 아닌 상업적으로 구입이 가능한 Upstate MBP 항체를 이용하여 그림 18과 동일한 sample들을 이용하여 western blot 분석을 실시한 결과, 정제된 20 ng의 MBP

(P)에서만 cross reactivity가 나타나고, 그 외의 형질전환 벼 종자 및 형질전환 담배 캘러스에서 MBP의 발현을 동정할 수 없었다 (그림 19). 본 실험 결과 형질전환 벼 종자 조직에서 MBP 단백질 발현이 되지 않는 것으로 판명하였다. 이는 본 연구자가 Trx-MBP fusion 단백질로 제작한 항체가 MBP 단백질을 정확하게 검출하지 못했음을 보여주며, MBP 단백질이 벼 및 담배의 조직에서 발현되지 않음을 보여준다.

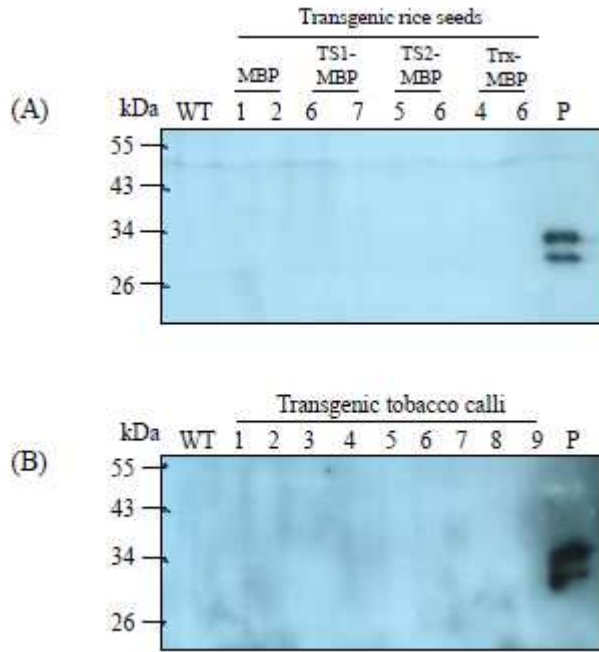


그림 19. Upstate MBP 항체를 이용한 다양한 genotype 형질전환 벼 및 담배로부터 MBP 발현 측정을 위한 Western blot 분석.

또한 MBP 유전자가 형질전환 벼의 종자에서 발현되는지를 확인하고자 RT-PCR 분석을 수행하였다. 종자에서 추출한 total RNA를 주형으로 이용하여, MBP specific primer로 cDNA를 합성하고, PCR 반응을 수행한 결과 형질전환하지 않은 대조구 (WT)를 제외한 모든 형질전환 종자에서 MBP mRNA가 발현되고 있음을 확인하였다 (그림 20). 이와 같은 결과는 형질전환 벼의 종자에서 MBP mRNA가 정상적으로 발현되고 있으나, 단백질의 발현이 억제되거나, 발현된 단백질이 급속히 분해되어 MBP 단백질의 발현이 저하되고 있음을 보여준 것으로 사료된다.

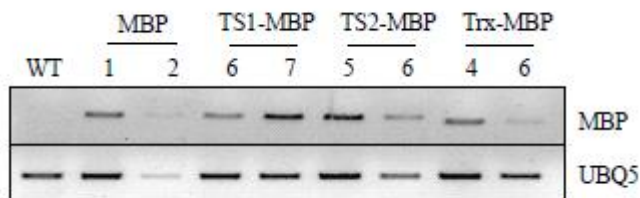


그림 20. 다양한 genotype 형질전환 벼로부터 MBP mRNA 발현을 측정한 RT-PCR 결과.



## (12) Chemical inducible promoter (CIP) 개발

Chemical 처리 즉 MeOH 처리에 의해 발현되는 promoter를 개발하고자, 벼 잎에 1% 메탄올을 처리하여 발현이 유도되는 tryptophan decarboxylase (TDC1) 유전자의 프로모터 부위 (1.7 kb)와 세포분열을 억제하는 티라민을 생성하는 tyrosine decarboxylase (TYDC1) 유전자를 결합하여 (TDC promoter-TYDC) 벼에 형질전환하여, T0 형질전환 벼를 총 14계통을 확보하였다. 항상 발현하는 maize ubiquitin promoter 조절 하에 TYDC 유전자를 발현시키면 (Ubiquitin P:TYDC), TYDC 효소의 발현산물인 tyramine이 과다 생성되어 벼가 왜소화 (dwarf)되는 현상을 보이고, 결과적으로 종자가 거의 맺지 못하는 현상을 나타내게 된다. 그러나 TDC1 promoter 조절 하에 TYDC1 유전자를 발현시키면, 형질전환하지 않은 대조구와 비슷한 크기의 형질전환체가 육성되고, 티라민 함량이 크게 증대하지 않는 T0 식물체 및 T1 종자가 생산되었다. 이들 T0 식물체 중에서 몇 라인으로부터 T2 종자를 육성하였다.

이들 T2 종자를 이용하여, TDC1 promoter 조절기작 및 MeOH 처리에 의한 프로모터의 작용 반응을 tyramine 생성 유무를 통해 조사하였다. 먼저 메탄올을 처리하지 않은 무처리 형질전환 벼로부터 TYDC mRNA 발현을 RT-PCR 로 분석한 결과, 형질전환 벼에서 TYDC mRNA의 발현이 형질전환하지 않은 잎에 비해 2배 정도 증대되어 있음을 볼 수 있었다 (그림 21). 이는 TDC1 promoter가 메탄올을 처리하지 않아도 미미하게나마 발현되는 것임을 보여주는 결과를 볼 수 있었다. 다음으로 homozygous T2 형질전환체의 형태적 특성을 형질전환하지 않은 대조구와 ubiquitin promoter 조절하의 TYDC 형질전환체와 비교하여 본 결과, TDC1 promoter:TYDC 형질전환체는 ubiquitin promoter:TYDC 형질전환체에 비해 현저히 높은 초장 길이를 나타내었으며, 형질전환하지 않은 대조구에 비해서는 2번 line에서 15% 감소되는 경향을 보였고, 그 외 line에서는 거의 비슷한 초장을 보였다 (그림 22A). 분얼수는 ubiquitin promoter:TYDC 형질전환체의 경우, 50 여개의 분얼수를 보였으나, TDC1 promoter:TYDC 형질전환체는 대조구와 비슷한 20-23개의 분얼수를 나타내었다 (그림 22B). 종자 내의 티라민 함량은 ubiquitin promoter:TYDC 형질전환체의 경우 50  $\mu\text{g/g}$  seed로 조사되었으나, 대조구와 와 TDC1 promoter:TYDC 형질전환체는 2-6  $\mu\text{g/g}$  seed 정도로 미약하게 티라민이 생성되었다. 이 결과는 TDC1 promoter:TYDC 형질전환체에서 TYDC의 발현이 TDC1 promoter 조절 하에 있음을 보여 준다.

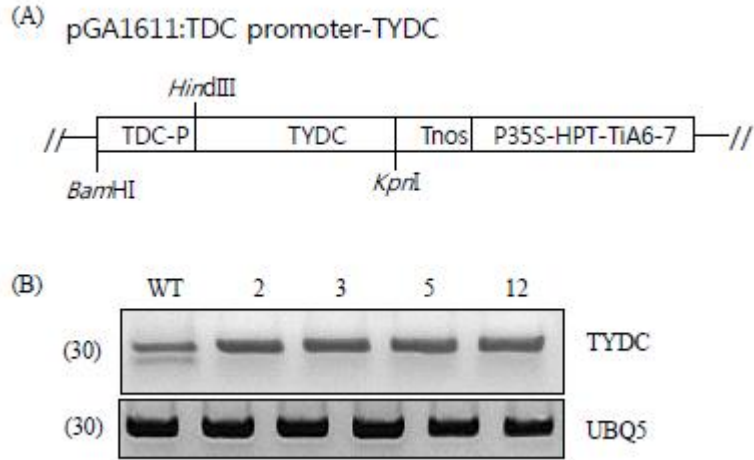


그림 21. Tryptophan decarboxylase 1 (TDC1) promoter 조절 하에서 tyrosine decarboxylase (TYDC1) 유전자의 발현을 측정 한 RT-PCR 결과. UBQ5: ubiquitin gene 5.

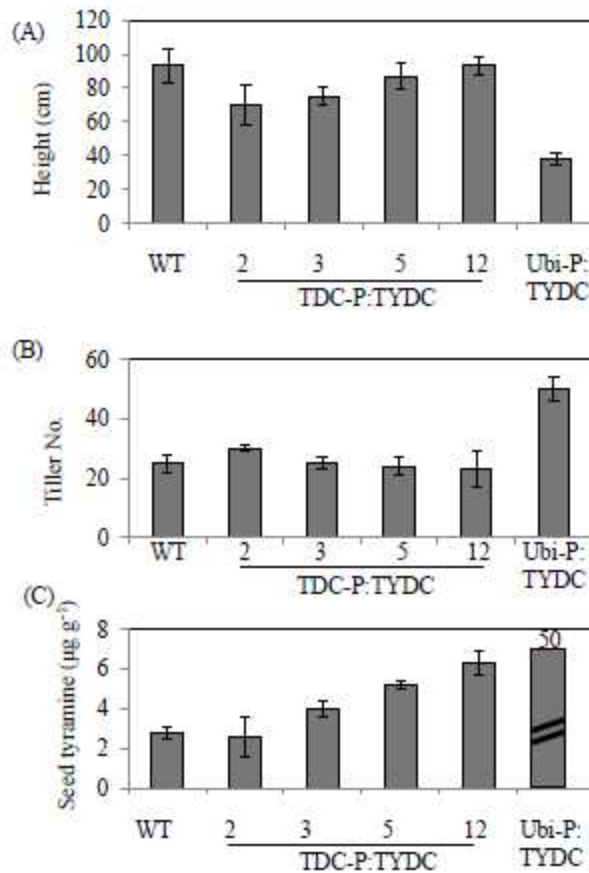


그림 22. Tryptophan decarboxylase 1 (TDC1) promoter 조절 하에서 tyrosine decarboxylase (TYDC1) 유전자를 발현하는 T<sub>2</sub> 형질전환체의 형태적 특성 비교.

## 2. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발 (3~5년차)

### (1) Inducible promoter 탐색

Daminozide는 B9이라고도 불리는 식물생장조절제로, 개화 및 꽃눈의 분화를 조절하며, 색을 더욱 선명하게 촉진하고, 국화에서는 초장의 길이를 조절하는 물질이다. Genevestigator와 Arabidopsis eFP Browser의 database를 이용하여 10  $\mu$ M daminozide의 처리에 의하여 유도되는 유전자를 탐색한 결과, 2개의 유전자 (*At5g11320*과 *At1g48800*)를 선별하였다 (그림 23). 발아 후 7일째 Arabidopsis seedling에 10  $\mu$ M daminozide를 3시간 처리하였을 때, *At5g11320* 유전자의 발현은 약 4.3배 증가하였고, *At1g48800* 유전자는 약 5.2배 증가하였다.

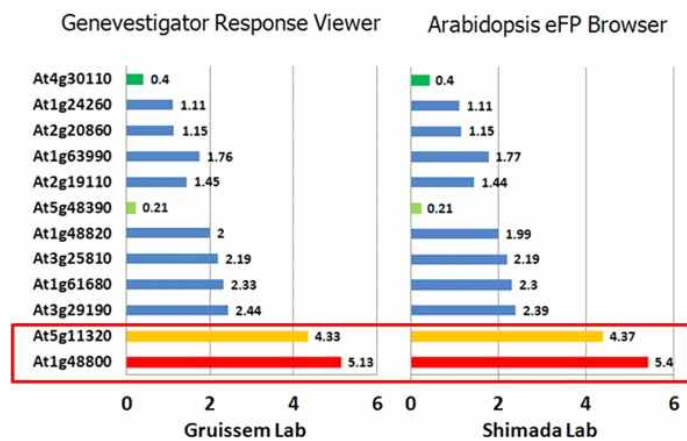


그림 23. Daminozide 처리에 의해 유도되는 유전자의 선별.

### (2) Daminozide에 의해 유도되는 두 유전자의 발현 양상 분석

선별된 2개의 유전자의 조직별 발현양상을 분석하기 위하여 발아 후 30일된 식물체에서의 발현 DB를 관찰하였고 (그림 24), 발아 후 7일 성장한 seedling에서 RT-PCR 분석으로 확인하였다 (그림 25). *At1g48800* 유전자의 발현은 daminozide를 처리하지 않은 식물체에서 petal과 rosette leaf에서 강한 발현을 보였고, seedling에서는 young root에서만 특이적으로 발현하였다. *At5g11320* 유전자의 경우는 식물체와 seedling에서 종자를 제외한 모든 조직에서 발현을 보였으며, 특히 stigma, pollen, shoot apex에서 강한 발현을 보였다.

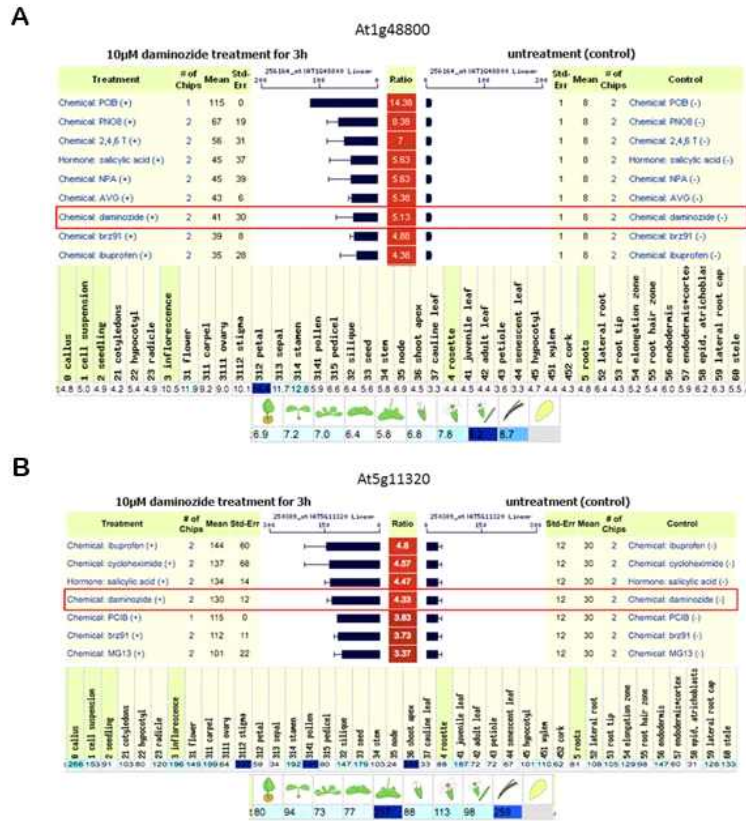


그림 24. 발아 30일후 식물에서의 *At1g48800*과 *At5g11320* 유전자 발현 양상.

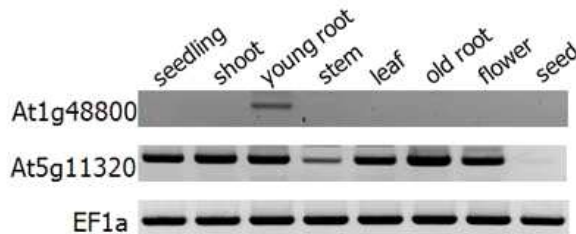


그림 25. 발아 후 7일째 seedling에서 *At1g48800*과 *At5g11320* 유전자의 부위별 RT-PCR 분석.

(3) Inducible promoter 이용 식물 형질전환 벡터 제작 및 형질전환

Daminozide 처리에 의해 유도되는 *At1g48800* (2.42 Kb)과 *At5g11320* (3.98 Kb) 두 유전자 각각의 프로모터 영역에 GUS 유전자를 이용하여 형질전환 벡터를 제작하였다 (그림 26).

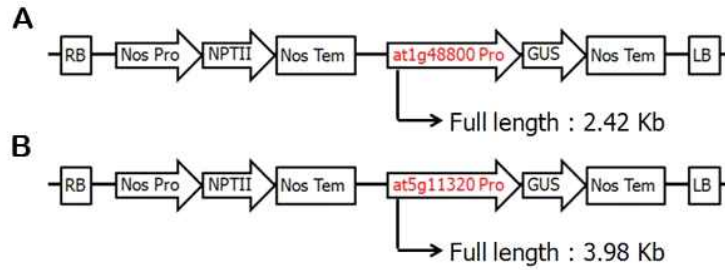


그림 26. Daminozide 유도 식물 형질전환 벡터.

제작한 벡터를 *Agrobacterium*에 도입하였고 floral dipping 방법으로 애기장대에 형질전환하였다. *At1g48800* 프로모터 영역의 형질전환은 유전자의 삽입을 PCR로 확인하여 형질전환체 T<sub>3</sub> 세대를 확보하였으며, *At5g11320* 프로모터 영역의 형질전환도 진행하였다.

#### (4) 형질전환체의 선별 및 inducible promoter 개발

*At1g48800* 유전자의 프로모터 영역의 형질전환체를 선별하기 위하여 RT-PCR 분석 (그림 27A)과 GUS 염색 (그림 27B)을 실시하였다. RT-PCR 분석 결과, 형질전환체 18개의 모든 line에서 GUS 유전자가 발현하였다. 그러나 발아 후 7일째 seedling의 GUS를 염색한 결과, 14번 형질전환체에서만 뿌리에서 GUS의 염색이 관찰되었다. *At1g48800* 유전자는 seedling의 young root 이외에도 성숙한 식물체에서 petal과 rosette leaf에서도 강한 발현을 보였으므로 성숙한 식물체에서 GUS 염색에 의한 형질전환체 선별을 확인해야 할 것으로 사료되었다.

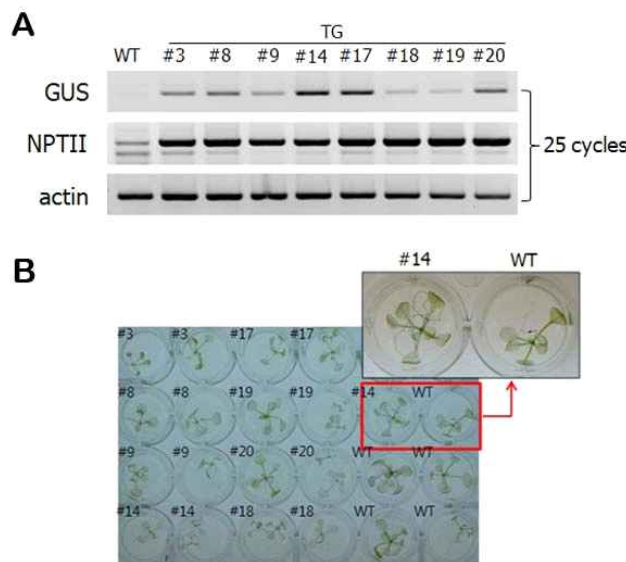


그림 27. *At1g48800* 프로모터 영역 활용 형질전환체 선별 (A)과 GUS 염색 (B).

Daminozide 처리에 의한 inducible promoter 개발을 위하여 *At1g48800* 프로모터 영역의 형질전환체에 10  $\mu$ M daminozide를 발아 후 7일째 seedling에 3시간 처리 후 *At1g48800* 유전자의 발현 (그림 28A)과 GUS 염색 (그림 28B)을 실시하였다. RT-PCR 분석 결과, daminozide 처리에

의한 *At1g48800* 유전자의 발현은 증가된 것으로 보기 어려웠으며, GUS 염색을 실시한 결과, 14번 형질전환체에서만 daminozide 처리 전에 뿌리에서만 관찰되던 GUS 염색이 daminozide 처리 후 배측에서 강하게 염색된 것을 관찰할 수 있었다. *At1g48800* 유전자의 발현은 microarray 분석 database에서 daminozide 처리에 의해 약 5배 이상 증가되었으나, 기본 발현량이 워낙 낮아서 RT-PCR 분석 결과 뚜렷한 차이를 눈으로 구별하기가 쉽지 않았던 것으로 사료되며, 다른 형질전환체 라인의 선별과 성숙한 식물체에서의 daminozide 처리에 의한 GUS 발현 유도를 검증할 필요가 있다고 사료되었다.

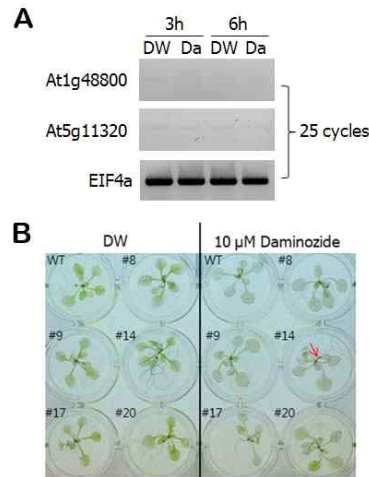


그림 28. Daminozide 처리 후 형질전환체에서의 GUS 유전자 발현.

(5) Root/seed-specific cis-element 탐색

우선 기존에 보고된 참고문헌을 기초하여 종자 특이적 cis-element를 탐색한 결과, 쌍자엽 식물체 (dicot)에서 4개의 주된 cis-element와 단자엽 식물체 (monocot)에서 5개의 주된 cis-element를 탐색하였다 (표 1). 이들 중 쌍자엽 식물체와 단자엽 식물체 모두에서 공통적으로 탐색된 cis-element 2가지 (RY-repeat과 G-box)를 모두 갖고 있는 promoter를 Arabidopsis genome database에서 탐색하였다.

<표 1> 종자 특이적 cis-element

Dicot	Monocot
<b>RY-repeat</b> (CATGCATG)	<b>RY-repeat</b> (CATGCATG)
<b>G-box</b> (CACGCC)	<b>G-box</b> (CACGCC)
E-box (CAGATG)	Prolamin-box (TGTAAGT)
ACGT motif (AACAAA)	AACA motif (AACAAACTCTATC)
	GCN4-like (GLM) element (GRTGAGTCAT)



(6) 공통된 root/seed-specific cis-element를 갖는 유전자 선별

선별된 종자 특이적 cis-element를 갖는 promoter 영역을 탐색하기 위하여 plant promoter database (<http://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp/ppdb/>), PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/>), RARGE (<http://rarge.psc.riken.jp/>) 등의 database를 이용하였다. 우선 각각의 database로부터 promoter 영역에 RY-repeat cis-element를 포함하고 있는 유전자와 G-box cis-element를 포함하고 있는 유전자를 각각 탐색한 결과, RY-repeat만 promoter 영역에 포함하고 있는 유전자 수는 총 10,592개였고, G-box만 포함한 유전자 수는 총 5,033개였다. 이들 유전자를 서로 비교하여 RY-repeat과 G-box 모두를 포함하고 있는 유전자 1,021개를 선별하였다. 선별된 1,021개 유전자 중 기존에 알려지지 않은 종자 특이적으로 발현하는 유전자를 선별하기 위하여 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>)에서 유전자 서열 및 annotation 정보를 얻었으며, Genevestigator (<http://www.genevestigator.com>)에서 조직별 microarray 분석 결과를 얻었고, Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)에서 보고된 참고문헌을 검색하였다. 이외에도 국내외 특허사이트를 참조하여 종자 특이적 프로모터에 관련된 특허를 검색하여 기존에 알려지지 않은 종자 특이적 프로모터를 탐색하였다. 이들 database를 이용하여 현재 1,021개 유전자 중 385개 유전자에 대하여 탐색을 완료하였으며, 이중 기존에 종자 특이적 유전자로 보고가 된 유전자는 총 42개였으며, 약 10개의 유전자는 새로운 종자 특이적 발현 후보 유전자로 선별하였다.

(7) RT-PCR을 통한 뿌리/종자 특이적 발현 검증

여러 가지 database를 이용하여 탐색하여 선별된 종자 특이적 발현 후보 유전자를 총 10개 선별하였으며, 이들 유전자의 부위별 발현 양상을 RT-PCR 분석을 통하여 종자 특이적 발현을 검증하였다 (그림 29). 이들 중 2개의 *At1g22600* 유전자와 *At1g29680* 유전자는 종자에서만 강하게 특이적으로 발현하고 있는 것을 검증하였다.

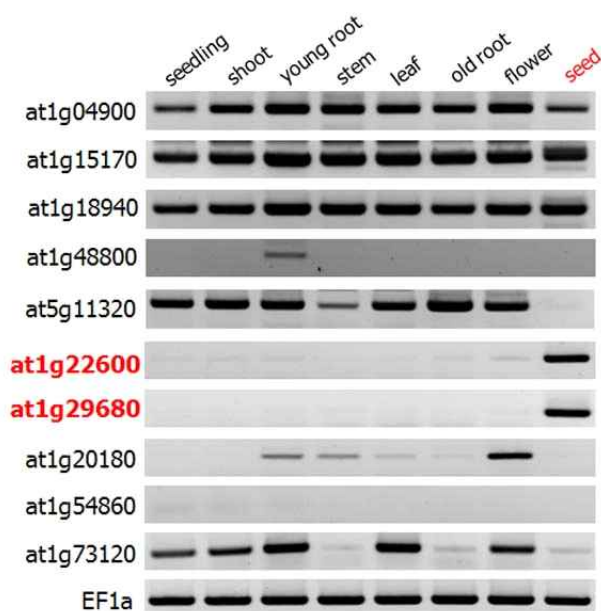


그림 29. 종자 특이적 발현 후보 유전자의 부위별 발현 양상 분석.



## (8) 선별된 유전자의 promoter region 및 기능 분석

선별된 2개의 종자 특이적 발현 유전자의 promoter region을 분석하기 위하여 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) database를 이용하여 각 promoter 영역에 존재하는 cis-element를 탐색하였다. *At1g22600* 유전자 프로모터의 총 길이는 5,113 bp이며, 2개의 G-box, 1개의 RY-repeat, 16개의 E-box, 5개의 ACGT box가 존재하였다. *At1g29680* 유전자 프로모터 영역은 1개의 G-box와 1개의 RY-repeat을 포함하고 있으며 58 bp로 매우 짧았으므로 앞 유전자 (*At1g29690*)의 3' UTR 영역 (290 bp)과 *At1g29680* 유전자의 5' UTR 영역 (30 bp), 첫 번째 exon (259 bp), 첫 번째 intron (83 bp)의 조합으로 프로모터 영역의 분석을 실시하였다.

이들 두 유전자는 전혀 알려지지 않은 새로운 유전자이므로 이들의 기능을 예측하기 위하여 blast 검색, protein domain 검색, transmembrane helix prediction, signal peptide 검색 등을 이용하였다. *At1g22600* 유전자는 blast를 검색한 결과 hypothetical protein으로 homology를 갖는 다른 유전자가 검색되지 않았고, 4개의 transmembrane helix를 포함하고 있었다 (그림 30A). *At1g29680* 유전자도 unknown protein으로 다른 유전자와 homology를 갖고 있지 않으며, transmembrane helix도 포함하고 있지 않으므로 세포질 단백질인 것으로 예측되었다 (그림 30B).

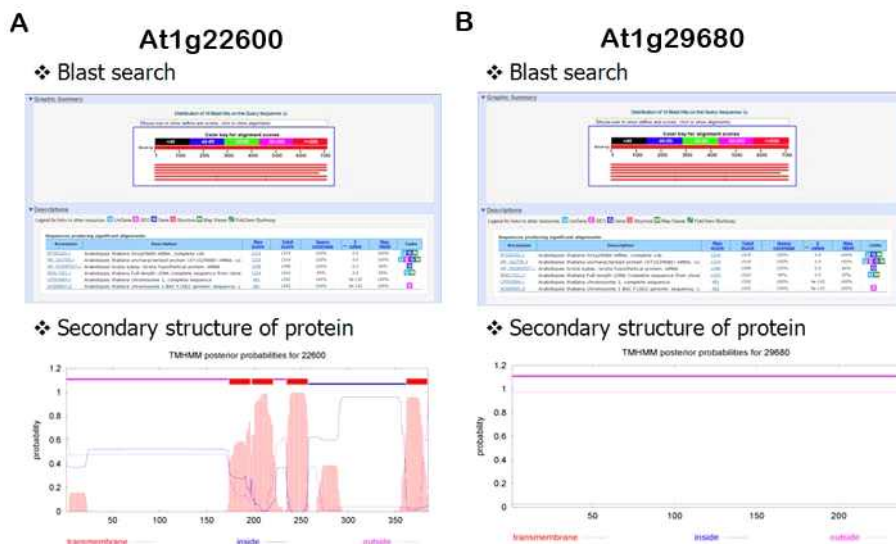


그림 30. 종자 특이적 발현 유전자 *At1g22600* (A)과 *At1g29680* (B)의 blast 검색 및 단백질의 이차구조 분석.

## (9) seed-specific cis-element를 갖는 유전자들의 TAIR/ATTED DB에서의 발현 양상 확인

promoter region에 root/seed-specific cis-element를 가진 유전자의 발현이 종자 특이적인 발현을 할 가능성이 높기도 하지만, 역으로 종자에서만 발현하는 유전자의 promoter가 종자 특이적 발현을 유도할 가능성이 있다. 그리하여 TAIR/ATTED DB에 공개된 affymetrix 25k (ATH1) array 결과를 토대로 종자에서만 발현하는 유전자를 선별하기로 하였다.

그리고 이러한 선별 방법이 신뢰할 수 있는지에 대한 지표로써 중요한 2개의 seed-specific

cis-element를 모두 가지는 10개의 유전자의 조직별 발현 정도가 TAIR/ATTED database의 결과와 일치하는지를 조사했다. 실질적으로 TAIR/ATTED DB의 microarray data에는 발달 단계와 조직에 따른 79개의 조직에서의 유전자의 발현정도를 보여주고 있으나, 간략하게 정리하여 발달 단계는 무시하고 7개의 조직 (seedling, shoot, root, stem, leaf, flower, seed)에서의 발현정도를 표로 나타내었다 (표 2).

〈표 2〉 seed-specific cis-element를 갖는 유전자들의 TAIR/ATTED DB에서의 발현 양상

	seedling	shoot	root	stem	leaf	flower	seed
At1g04900	4	3	3	4	3	3	4
At1g15170	2	4	2	4	3	2	1
At1g18940	4	4	1	4	3	4	1
At1g48800			4		4		4
At5g11320	4	1		4	3	3	1
At1g22600							1
At1g29680							1
At1g20180						1	1
At1g54860						1	1
At1g73120	2		1		4	4	2

표기	발현정도
1	매우 약함
2	약함
3	중등
4	약함
빈칸	안함

RT-PCR 결과와 상이함

그림 30의 종자 특이적 발현 후보 유전자의 부위별 발현 양상과 표 2를 비교해보면, shoot에서 유전자 *At1g73120*의 발현, leaf에서 유전자 *At1g48800*의 발현, seed에서 유전자 *At1g48800*, *At5g11320*, *At1g20180*의 발현만 차이가 날뿐 대체적으로 일치한다. 그리고 특히 선발된 유전자 *At1g22600*과 *At1g29680*의 발현 정도는 전체적으로 일치했다. 따라서 TAIR/ATTED DB를 활용한 종자 특이적 유전자의 선발이 가능하다고 판단되었다.

(10) TAIR/ATTED DB에서 종자 특이적인 novel 유전자 37개 선발

유전자 *At1g22600*과 *At1g29680*과 같이 종자에서만 강하게 발현될 것으로 추정되는 유전자를 약 22,000개의 *Arabidopsis* 유전자들 중에서 115개 선별하였고, 이 중에서 novel 유전자를 37개 최종 선별하였다 (그림 31). 그리고 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) DB를 활용하여 각 promoter 영역에 존재하는 cis-element를 탐색하여 유용한 promoter를 선별하는 과정을 반복한 후, RT-PCR을 통해서 종자에서만 특이적으로 발현하는지를 확인하여 최종 선별하고자 하였다.

(A)

At1g03890	At1g80010	At1g79690	At1g78420	At1g77950	At1g73290	At1g68220	At1g67820
At1g67100	At1g65880	At1g62520	At1g62210	At1g62070	At1g61140	At1g60620	At1g48660
At1g31280	At1g28590	At1g28170	At1g27330	At1g26400	At1g24735	At1g22985	At1g20870
At1g17810	At1g17510	At1g16980	At1g14950	At1g14930	At1g04560	At1g03880	

(B)

At2g03190	At2g15010	At2g19320	At2g23220	At2g23260	At2g23550	At2g23580	At2g23640
At2g25340	At2g27380	At2g33520	At2g34315	At2g36640	At2g41280	At2g44470	

(C)

At3g01570	At3g03230	At3g03620	At3g04190	At3g12203	At3g12960	At3g21860	At3g22500
At3g22640	At3g24650	At3g27785	At3g29260	At3g31955	At3g44460	At3g53040	At3g58740
At3g60730	At3g63040						

(D)

At4g10020	At4g10490	At4g11180	At4g18650	At4g21020	At4g25140	At4g25980	At4g26740
At4g27150	At4g27160	At4g27170	At4g27530	At4g31830	At4g32490	At4g34520	

(E)

At5g04380	At5g07200	At5g07210	At5g07260	At5g07500	At5g08460	At5g10120	At5g10220
At5g11220	At5g16460	At5g18450	At5g22470	At5g22810	At5g38160	At5g38170	At5g38180
At5g38195	At5g39160	At5g40420	At5g44310	At5g44360	At5g45690	At5g47670	At5g49190
At5g50600	At5g50750	At5g51760	At5g53100	At5g54000	At5g54740	At5g55240	At5g55750
At5g62800	At5g65100	At5g66430	At5g66780				

Novel 유전자

그림 31. TAIR/ATTED DB에서 선발한 종자 특이적 유전자 115개 중의 37개의 novel 유전자 예시.

(11) 콩과 옥수수 종자에서 종자 특이적 발현 프로모터의 발현 분석

일시 발현 시스템을 구축하고자 35S promoter:GUS가 포함된 벡터를 이용하여 단자엽 식물인 저장 옥수수와 쌍자엽 식물인 저장 콩에 sonication 10, 20, 30, 60 min과 vacuum 10, 20, 30 min을 처리한 후 GUS 발현을 확인하였다. 종자의 껍질을 제거한 옥수수와 콩에 *Agrobacterium*을 시간별로 접종한 결과 sonication 시간이 길수록 GUS의 발현이 강하게 나타났으며, 그 중 sonication 60분 처리가 가장 좋았으며, vacuum 처리는 control과 큰 차이가 없었다 (그림 32). 따라서 계속된 실험의 저장 옥수수와 콩의 일시적 발현에서 sonication 60분 처리로 하였다.

앞서 cloning하였던 *At1g29680* promoter deletion series인 pro1, pro2, pro3, pro4 (그림 33)를 *Agrobacterium* GV3101에 도입하여 각각의 colony들을 PCR로 확인하였다 (그림 34). 확인된 *At1g29680* promoter deletion series pro1, pro2, pro3, pro4를 단자엽 식물인 저장 옥수수와 쌍자엽 식물인 저장 콩, 미숙 콩 (꽃이 피고 꼬투리가 생긴 후 2-3주)에 일시적 발현을 유도하였다. 35S promoter:GUS (positive control)와 비교해서 deletion pro2가 비슷하거나 높은 GUS 발현을 나타냈다 (그림 35). 또한 종자 특이적 발현을 확인하기 위해 어린 콩의 조직별 (seed, leaf, stem, root) GUS 발현을 확인하였다. 35S promoter:GUS (positive control)에서는 전 조직에서 GUS 발현이 강하게 나타났으나, deletion pro2에서는 약하게 잎, 줄기, 뿌리에서 GUS 발현이 나타나기는 했지만 종자에서 가장 강하게 GUS 발현이 나타남을 알 수 있었다 (그림 36).

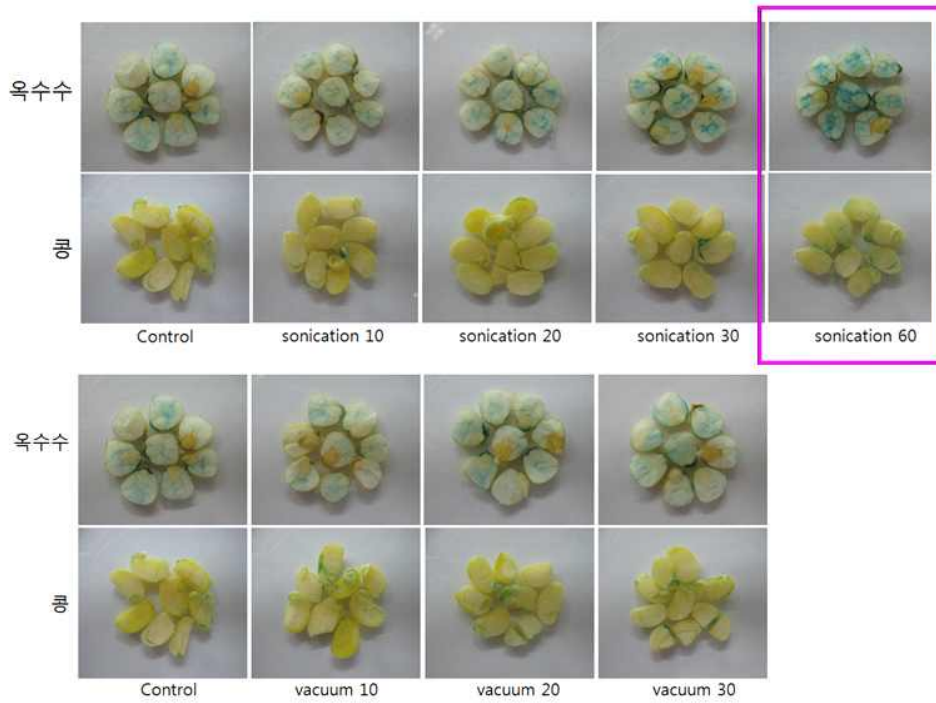


그림 32. 저장 옥수수과 콩의 transient expression 조건 실험.

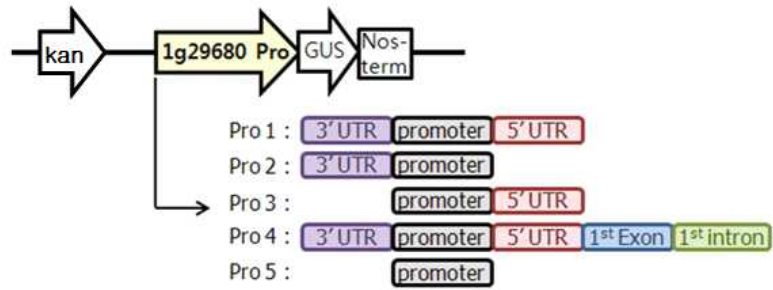


그림 33. pBI101 벡터에 삽입한 *At1g29680* promoter series.

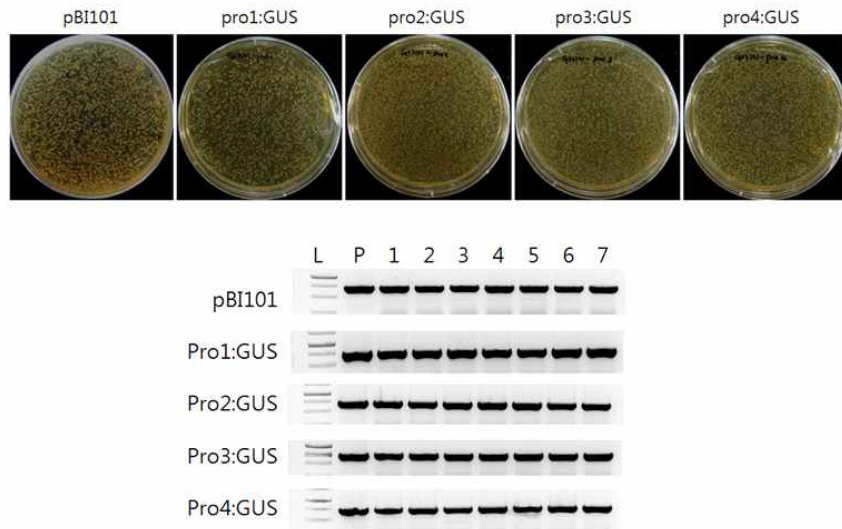


그림 34. *At1g29680* promoter deletion series의 *Agrobacterium* GV3101 도입 및 colony PCR.

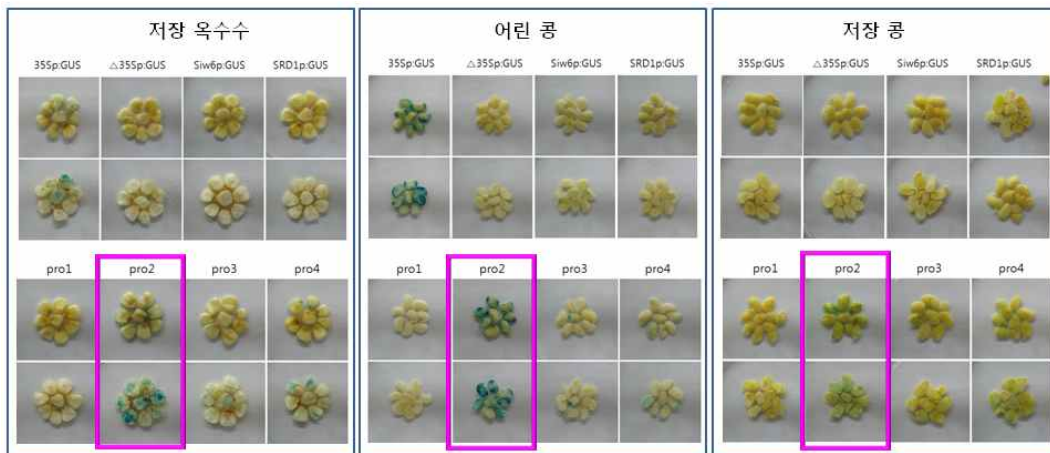


그림 35. 옥수수 (저장 종자)와 콩 (미숙 및 저장 종자)을 이용한 *At1g29680* promoter deletion series pro1, pro2, pro3, pro4의 일시적 GUS 발현.

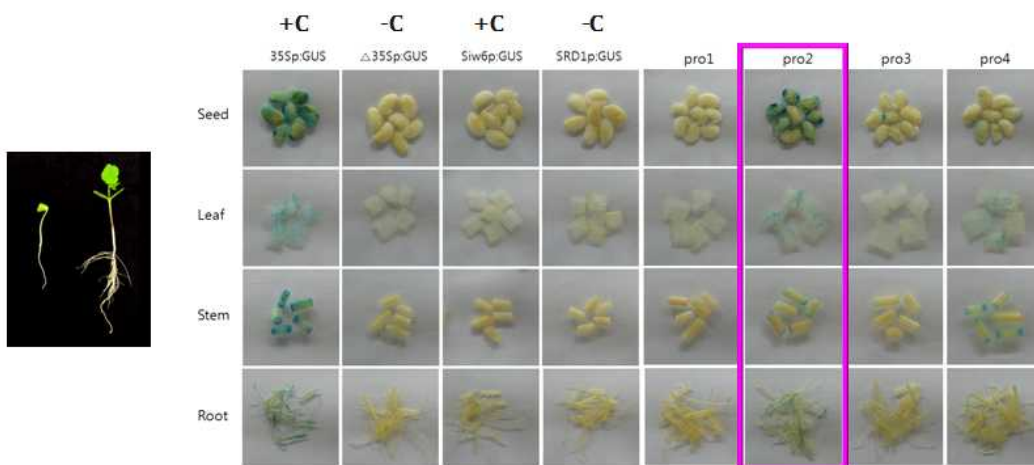


그림 36. *At1g29680* promoter deletion series pro1, pro2, pro3, pro4의 콩 조직별 GUS 발현.



## (12) 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 RT-PCR 분석

앞서 TAIR/ATTED DB에서 종자특이적 발현을 도모할 것으로 예상되는 프로모터를 115개 찾은 후 37개의 novel한 프로모터를 선발하였는데, 그 중에서 조직별 발현 양상 분석에 적합한 유전자 32개를 선발하여 RT-PCR 분석을 하였다.

RT-PCR에 이용할 cDNA를 합성하기 위해 TRI REAGENT® (Molecular Research Center Inc.)를 이용하여, 5주된 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)의 꽃 (flower), 줄기 (inflorescence), 잎 (leaf), 뿌리 (root), 미성숙 종자 (immature seed)와 7주 성장한 애기장대의 성숙 종자 (mature seed)에서 total RNA를 추출하였다. 정량한 total RNA 5  $\mu$ g과 2.5  $\mu$ M anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> primer, 1X (8 mM MgCl<sub>2</sub>) transcriptor reverse transcriptase reaction buffer, 20U protector RNase inhibitor, 1 mM deoxynucleotide mix, 10U transcriptor reverse transcriptase를 전체 20  $\mu$ L가 되도록 잘 섞은 다음 55°C에서 70분간 처리하였다. 이후 transcriptor reverse transcriptase의 불활성화를 위해서 85°C에서 5분간 처리하였다. 위와 같은 방법으로 조직별 cDNA pool을 만들었으며, 이 cDNA pool을 RT-PCR의 주형 (template)으로 사용하였다.

TAIR site의 염기서열을 바탕으로 protein coding region에서 프라이머를 합성하였고, Gene Amp PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 95°C에서 5분간 초기 변성 후, 95°C 20초, 60°C 20초, 72°C 30초를 30회 실시하였다. internal control로는 EF1a를 사용하였고, 조직별 cDNA pool에서 EF1a의 전사 양이 거의 동일함을 확인하였으며, 각각의 유전자 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR를 실시하였다.

RT-PCR 분석 결과 총 28개의 유전자가 종자에서만 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 그 유전자들 중 11개의 pro1, 2, 4, 5, 8, 14, 15, 16, 26, 30, 32 유전자는 성숙종자에서만 발현하였으며, 4개의 pro7, 9, 27, 29 유전자는 미성숙종자에서만 발현했다. 그리고 5개의 pro6, 17, 22, 24, 25 유전자는 미성숙종자에서 강하게 성숙종자에서 약하게 발현되었으며, 5개의 pro18, 19, 21, 23, 31 유전자는 미성숙종자에서 약하게 성숙종자에서 강하게 발현되었다. 또한 3개의 pro10, 20, 28 유전자는 미성숙종자와 성숙종자에서 비슷한 양으로 발현되었다 (그림 37).

RT-PCR 분석 결과에 따라서 활용의 유용도를 고려하여 성숙종자에만 발현되는 유전자의 프로모터와 미성숙종자에서만 발현되는 유전자의 프로모터와 미성숙종자와 성숙종자에서 다 발현되는 유전자의 프로모터를 적절히 섞어서 13개의 프로모터를 선발하였다. 선발 후 각각의 프로모터에 포함되어 있는 기존에 알려진 cis-element를 분석하고 coding protein의 종류를 예측하고 그 단백질이 포함하고 있는 도메인을 조사하고 microarray data와 RT-PCR의 결과가 일치하는지 분석하였다 (표 3).

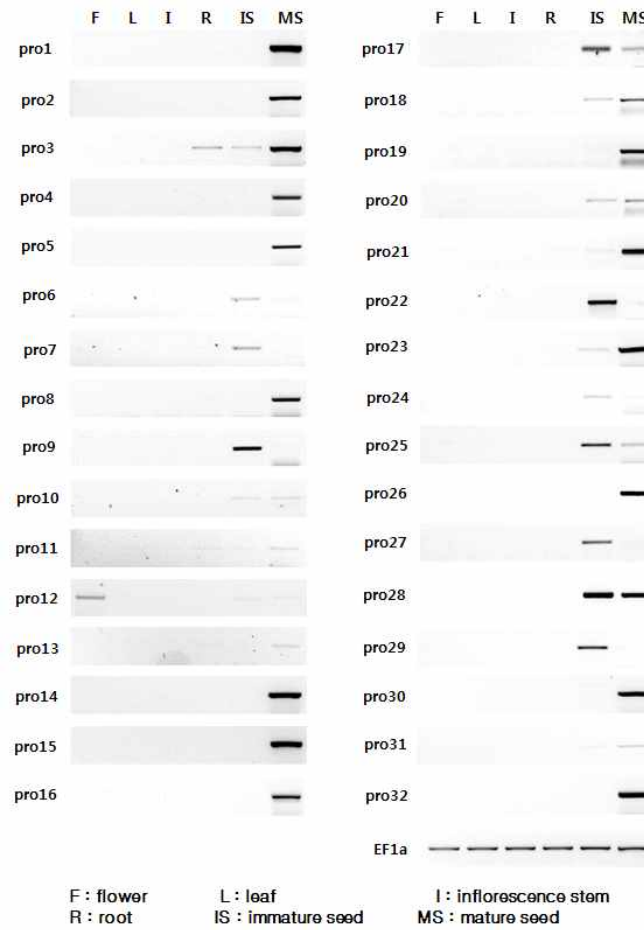


그림 37. RT-PCR 분석.

<표 3> 선발된 프로모터의 신규성 여부

Name	The number of seed-specific cis-element	Description of coding protein	Containing domain	microarray data와 RT-PCR 결과	microarray data와 gus 발현 분석	종자를 제외한 타조직에서의 발현 여부	신규성 여부
pro18	2	unknown	alpha/beta-Hydrolase s domain	불일치	일치	비발현	없음
pro21	0	unknown	not shown	일치	불일치	발현	없음
pro22	2	unknown	transmembrane domain, Aquaporin-like domain	일치	불일치	비발현	있음
pro23	2	unknown	Cu-binding like domain, transmembrane domain	불일치			
pro24	4	unknown	START (STAR-related lipid-transfer) lipid-binding domain	일치			
pro25	1	Ethylene insensitive 3 family protein (EIN3)	EIN domain	일치	불일치	비발현	있음
pro26	4	unknown	not shown	불일치			
pro27	4	Putative adipose-regulatory protein	1-Seipin domain	불일치			
pro28	1	FAD-binding protein	Berberine bridge-like enzyme domain	일치			
pro29	1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Adh-short domain, KR domain	일치			
pro30	4	Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Fe(II)-dependent oxygenase domain	일치	불일치	비발현	있음
pro31	2	Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	not shown	불일치			
pro32	3	unknown	not shown	일치			



(13) 종자 특이적 프로모터의 고등식물 형질전환용 벡터 시스템 개발 및 형질전환

선발한 13개의 프로모터를 TAIR site의 염기서열을 바탕으로 프로모터 region으로 예상되는 부위에서 5' 말단과 3' 말단에 제한효소 인지 시퀀스를 포함하여 프라이머를 합성하였다. 먼저 야생 애기장대의 게놈 DNA (gDNA)를 추출하고, gDNA를 주형으로 하여 준비한 프라이머와 교정 (proofreading) 기능을 갖는 DNA 중합효소인 PrimeSTAR<sup>TM</sup>HS DNA Polymerase (TAKARA BIO INC.)를 이용하여 프로모터 부위를 증폭하였다. 그리고 이때 PCR 반응은 Gene Amp PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 95°C에서 5분간 초기 변성 후, 터치-다운 (touch-down) PCR 방법으로, 95°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 프로모터의 길이에 따라 1분에서 3분사이로 2°C씩 낮춰서 3회 실시하고, 95°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분~3분으로 27회 실시하여 전체 30회 PCR을 수행하였다.

PCR로 얻은 산물이 예상 크기와 일치하는지를 agarose 젤 상에서 확인하고, 이 PCR 산물을 pro18, 21, 22, 23, 28은 제한효소 *Hind*III와 *Xba*I로 말단을 자르고, pro24, 27, 29, 31은 제한효소 *Hind*III와 *Bam*HI로 말단을 잘랐으며, pro25, 26, 30, 32는 제한효소 *Sa*I과 *Xba*I로 자른 다음 GUS 유전자를 가지고 있는 pBI101 벡터에 클로닝하였다 (그림 38). 이후 프로모터 별로 여러 개의 대장균 (*E. coli*) 콜로니로 colony-PCR을 수행하여 PCR 산물이 삽입된 것이 확인된 클론을 각각 하나씩 골라서 sequencing으로 정확한 염기서열이 클로닝되었음을 확인하였다.

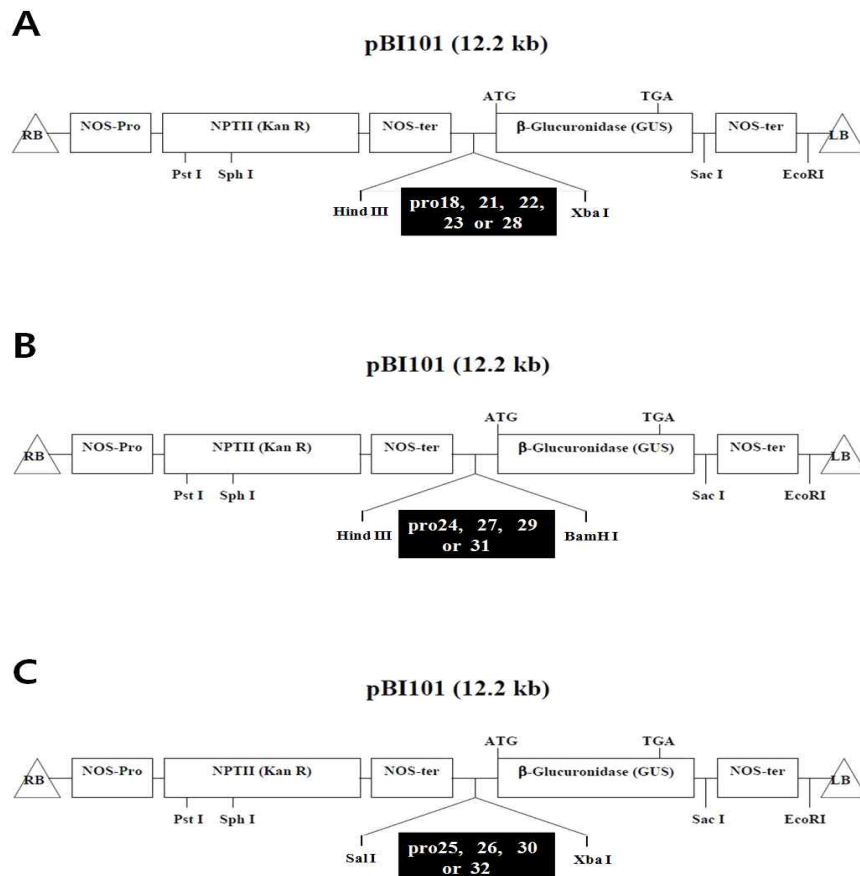


그림 38. GUS 유전자를 포함하는 pBI101 벡터에 클로닝.

확인된 클론의 벡터를 *Agrobacterium* GV3101)에 형질전환 한 후 colony-PCR을 통해서 확인

을 하였고, 형질전환된 아그로박테리움에서 다시 plasmid를 추출하여 정확한 벡터인지를 확인하였다 (그림 3).

두 번 확인을 거친 *Agrobacterium*으로 꽃 침지 (flower dipping) 방법으로 애기장대에 형질 전환하였고 항생제 카나마이신이 함유된 배지에서 선별하였다. 그 결과 pro18, 21, 22, 25, 30 프로모터를 포함하는 클론이 형질전환된 애기장대가 먼저 선발되어서 5종류의 형질전환체를 우선적으로 GUS 발현 분석을 하였다.



그림 38. *Agrobacteria*에서 추출한 plasmid를 PCR로 최종 확인.

#### (14) 형질전환체에서 발현 분석

선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 종자를 제외한 식물체의 각 조직은 1 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoly- $\beta$ -glucuronidase), 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담가 39°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올을 첨가하여 2시간 동안 클로로필을 제거하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올에 보관하면서 관찰하였다. 그 결과 pro18, 22, 25, 30 프로모터는 종자를 제외한 전조직-잎, 줄기, 꽃, 뿌리에서 GUS를 전혀 발현시키지 않았으나, pro21 프로모터는 뿌리에서 GUS를 발현시켰다 (그림 39).

또한 형질전환 식물체의 종자를 GUS 유전자의 기질인 X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indoly- $\beta$ -glucuronidase)가 들어있는 수용액에서 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 에탄올과 acetic acid를 9:1의 비율로 섞은 용액으로 25°C에서 24시간 동안 1차로 색소를 제거한 후, 90% 에탄올에서 30분 동안 세척하는 과정을 2회 반복했다. 그리고 1 ml의 30% glycerol에 2.5 g의 chloral hydrate을 첨가한 용액으로 25°C에서 24시간 동안 2차로 색소를 제거한 후에 Nomarski 렌즈를 이용하여 광학현미경 (Olympus model BX-51) 하에서 GUS의 활성을 관찰하였다. 이러한 관찰 결과 pro18은 Chalazal endosperm에서 GUS를 강하게 발현하게 하고, pro21은 Chalazal endosperm과 일부 embryo에서, pro22는 procambium과 radicle에서, pro25는 embryo에서, pro30는 embryo와 inner integument에서 GUS를 강하게 발현하게 하였다 (그림 40A). 각각 종자 내부 명칭 및 해당 위치는 그림 40B를 참고하였다.

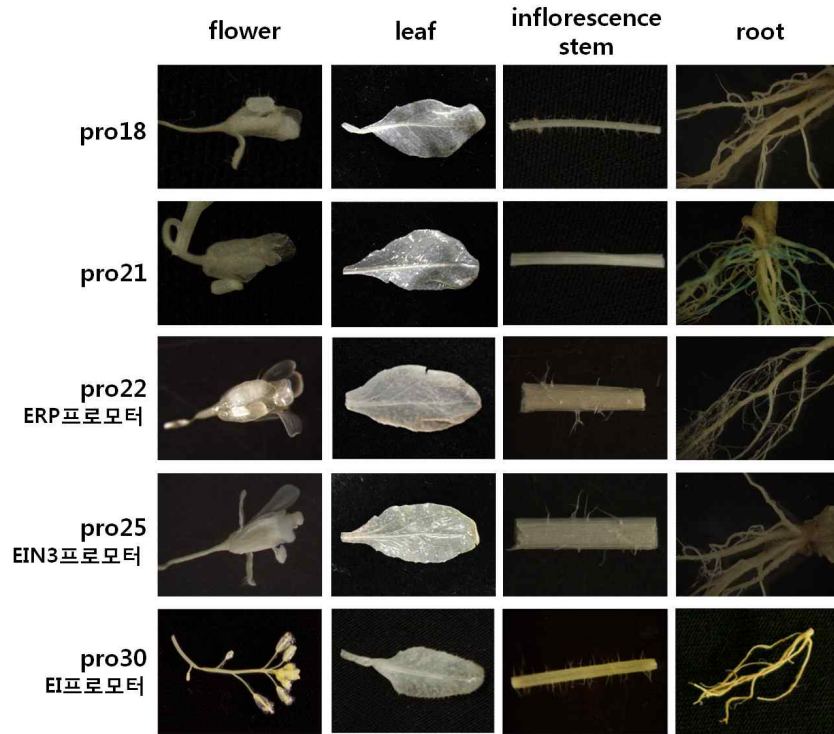
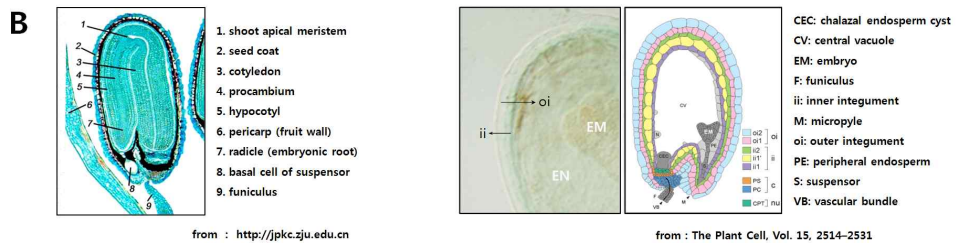
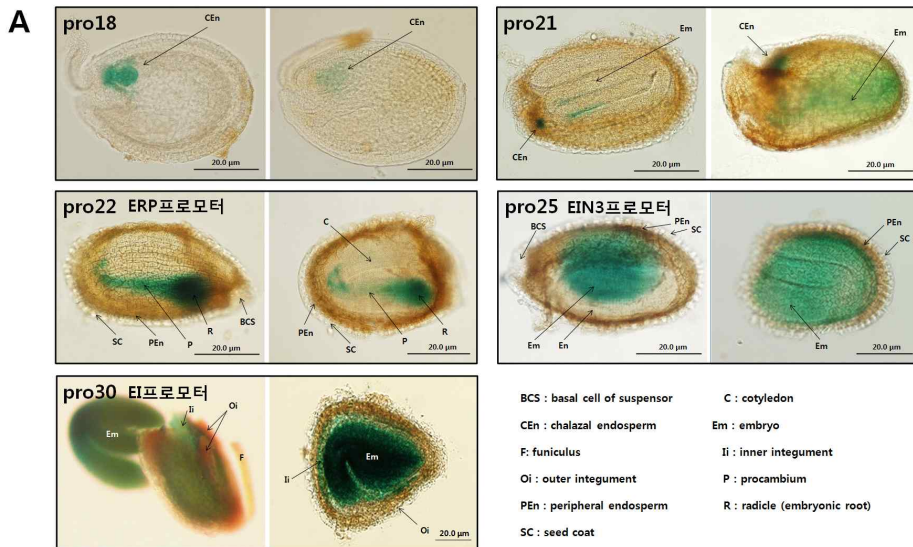


그림 39. 5개 프로모터 각각에 대한 종자를 제외한 아기장대 형질전환체에서의 GUS 발현.



from : <http://jpkc.zju.edu.cn>

from : The Plant Cell, Vol. 15, 2514-2531

그림 40. 5개 프로모터 각각에 대한 종자 내부에서 GUS의 발현.

(15) 고효율 발현 종자 특이적 프로모터 개발

(가) Ethylen insensitive 3 family protein (*AtEIN3*) 유전자의 프로모터

5개의 종자 특이적으로 발현하는 유전자의 프로모터 중 *AtEIN3* 유전자 프로모터는 식물체의 배 (embryo) 조직에 특이적으로 발현을 유도하는 것으로 나타났다. 형질전환 식물체와 종자를 GUS 유전자의 기질인 X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-glucuronidase)가 들어있는 수용액에서 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음 GUS 염색을 관찰한 결과 그림 41과 같이 종자를 제외한 전 조직, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃에서 GUS 염색이 관찰되지 않았으며, 배가 발달하고 있는 종자 내부에 그림 41처럼 배 발달 단계 모두 GUS 염색이 관찰되었다. 이러한 결과는 *AtEIN3* 프로모터가 종자 내 배 (embryo) 조직 특이적으로 프로모터 활성을 보임을 나타내며 이 결과를 특허 출원하였다 (그림 41). 또한 T<sub>2</sub>에서 3:1 비율을 확인하였다 (그림 42).

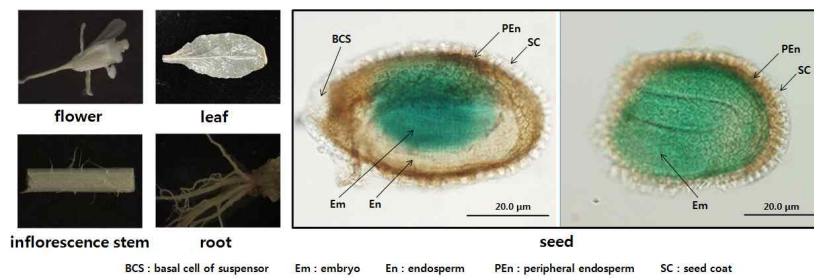


그림 41. 배 (embryo) 조직 특이 프로모터 특허출원 [출원번호: 10-2013-0000061].

(나) Embryonic Procambium and Radicle-specific (*EPR*) 유전자의 프로모터

*AtEPR* 유전자 프로모터는 식물체 배 (embryo) 조직의 procambium과 radicle 부위에 특이적으로 발현을 유도하는 것으로 나타났다. 형질전환 식물체와 종자를 GUS 분석한 결과 그림 42와 같이 종자를 제외한 전 조직, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃에서 GUS 염색이 관찰되지 않았으며, 종자에서는 종자 내부의 배 (embryo) 조직의 procambium과 radicle에서 특이적으로 GUS 염색이 관찰됨을 확인할 수 있었다. Procambium 조직보다는 radicle 조직의 GUS 염색이 상대적으로 매우 강함을 확인하였다. 이러한 결과는 *EPR* 프로모터가 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 등의 조직에서는 프로모터 활성이 없으며, 종자의 배 (embryo) 조직의 procambium과 radicle 부위에 특이적으로 강한 프로모터 활성을 보임을 나타낸다.

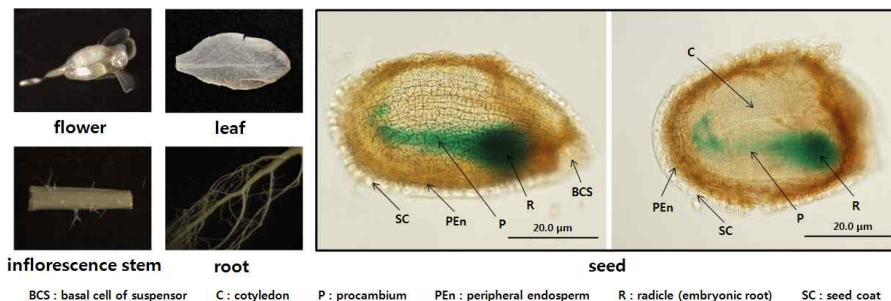


그림 42. 배(embryo)조직의 전형성충 및 유근 특이 프로모터 특허출원 [출원번호 : 10-2013-0000063].



(다) *AtFeII\_Oxy* (Arabidopsis FeII oxygenase) 유전자의 프로모터

*AtFeII\_Oxy* 유전자 프로모터는 식물체의 배 (embryo)와 내피 (inner integument) 조직에 특이적으로 발현을 유도하는 것으로 나타났다. 형질전환 식물체와 종자의 GUS 분석한 결과 그림 43과 같이 종자를 제외한 전 조직, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃에서 GUS 염색이 관찰되지 않았으며, 종자에서는 종자 내부의 배 (embryo) 조직과 종자 내피 (inner integument)에서 특이적으로 GUS 염색을 확인할 수 있었다. 미성숙 종자에서는 내피에서만 GUS염색이 관찰되다가 배(embryo)가 성장하여 자엽이 형성되는 시기부터는 GUS 염색이 매우 강함을 확인하였다.

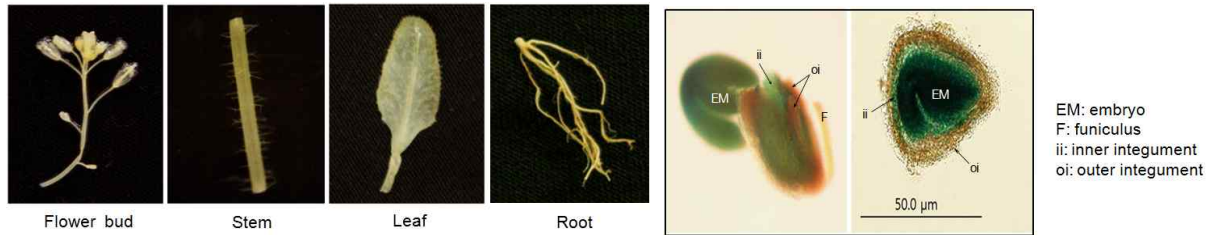


그림 43. 배(embryo)조직과 종자 내피(seed inner integument) 특이 프로모터 특이출원 [출원번호 : 10-2013-0006168].

(라) *ENS* (Endosperm-specific) 프로모터

TAIR/ATTED DB와 RT-PCR 분석 결과에 따라 종자 특이적 발현을 도모할 것으로 예상되는 13개의 프로모터 중 배유 (endosperm) 조직에 특이적으로 발현되는 프로모터를 선발하였다. 유전자 프로모터 -552 bp 부위를 확보하여 애기장대 형질전환체를 구축한 후 조직별 GUS의 발현을 관찰해 보았다. 그 결과 그림 44와 같이 종자를 제외한 전 조직, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃에서 GUS 염색이 확인되지 않았으며, 종자에서는 종자의 배가 발달하는 동안 종자내의 배유 (endosperm) 조직에서만 GUS 염색이 관찰되었으며 (그림 45), 배 (embryo)가 완전히 성장하여 배유가 사라진 종자에서는 GUS 염색을 확인할 수 없었다. 이 결과는 *ENS* 프로모터가 배유 (endosperm) 조직 특이적으로 강한 프로모터 활성을 보임을 추정할 수 있었다.

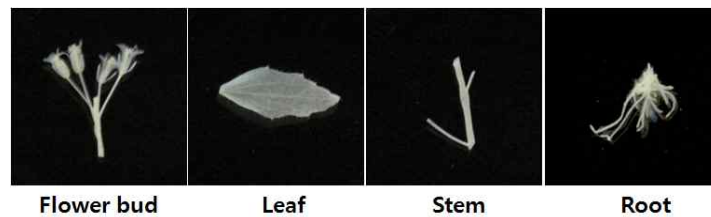


그림 44. 종자를 제외한 애기장대 형질전환체에서의 GUS 발현.

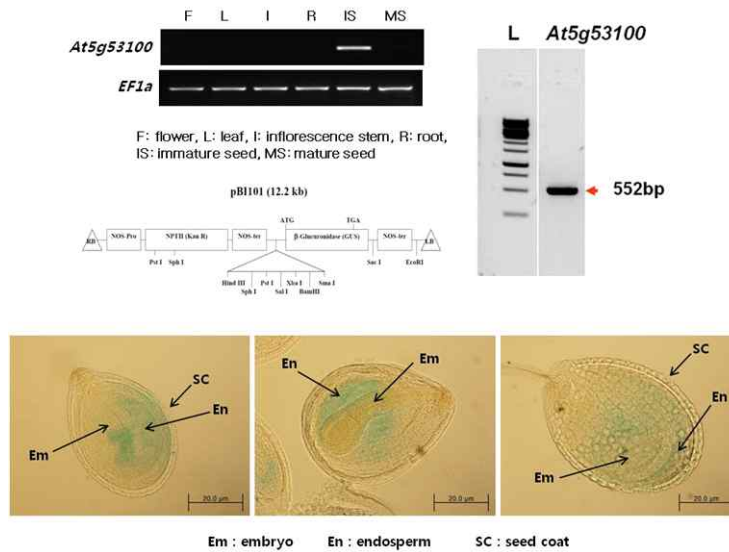


그림 45. 종자 배유 (endosperm) 조직 특이 프로모터 특허출원  
[출원번호 : 10-2013-0040120].

(마) *EM* (Embryo-specific) 프로모터

13개의 프로모터 중 *EM* 프로모터는 배 (embryo) 조직에 특이적으로 발현되는 것으로 확인되었다. 유전자 프로모터 -882 bp 부위를 확보하여 애기장대 형질전환체를 구축한 후 조직별 GUS의 발현을 관찰해 보았다. 그 결과 그림 46과 같이 종자를 제외한 전 조직, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃에서 GUS 염색이 확인되지 않았으며, 종자에서는 배 발달 초기에는 GUS염색이 관찰되지 않다가 배 (embryo)가 성장하면서 GUS 염색이 나타나기 시작하였으며, 배가 완전히 성숙된 종자의 자엽에서는 GUS 염색이 강하게 타나났다 (그림 47). 이 결과로 *EM* 프로모터가 완숙한 종자의 배 (embryo) 조직에 특이적으로 강한 프로모터 활성을 보임을 추정할 수 있었다.

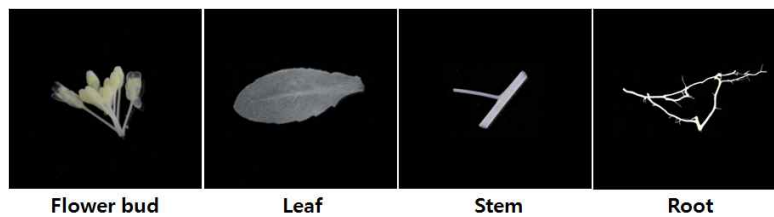


그림 46. 종자를 제외한 애기장대 형질전환체에서의 GUS 발현.



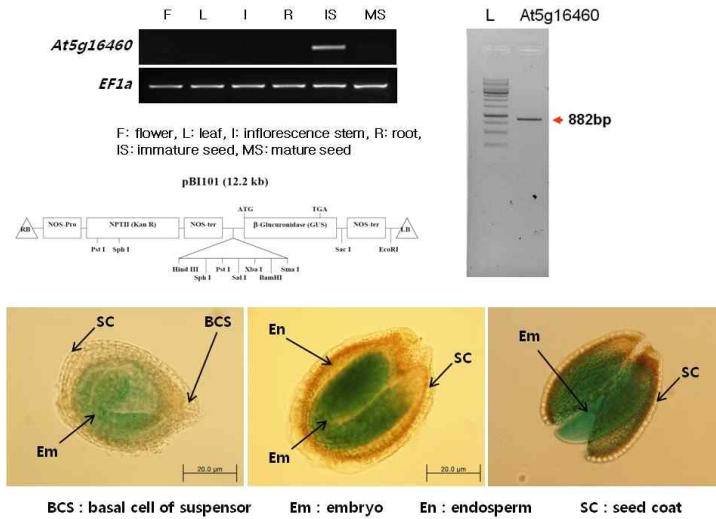


그림 47. 완숙된 종자의 배 (embryo) 조직 특이 프로모터 특허 출원 [출원번호 : 10-2013-0040124].

(바) 상처 스트레스 및 주병 (funiculus) 특이적 프로모터

At5g55750 유전자 프로모터 -1200 bp 부위를 확보하여 애기장대 형질전환체를 구축한 후 조직별 GUS 발현을 관찰해 보았다. 그 결과 꽃, 잎, 줄기, 뿌리에서 상처 스트레스를 받은 부위에 GUS 염색이 나타남을 확인할 수 있었다 (그림 48). 추가 실험으로 잎의 가운데 부분을 핀셋과 압정으로 상처를 낸 후 GUS 분석을 한 결과 상처 스트레스를 받은 부위에만 GUS 염색이 나타났다. 종자에서는 종자와 종자의 꼬투리를 연결하는 종자의 주병 (funiculus)에서 특이적으로 GUS 염색을 확인할 수 있었다. 종자의 배가 발달하는 동안에서도 종자의 주병에서만 GUS 염색이 관찰되었으며, 배가 완전히 성장하여 자엽이 형성된 종자에서도 주병외의 다른 부분에서 GUS 염색을 확인할 수 없었다 (그림 49). 즉, At5g55750 프로모터가 상처 (wounding) 스트레스 조직과 종자의 주병 (funiculus)에서 특이적으로 강한 프로모터 활성을 보임을 추정할 수 있었다. 상처 스트레스에서의 시간대별 발현양상을 알아보기 위해 real-time PCR을 이용하여 정량적 분석을 수행하였다. 4주된 애기장대의 잎에 압정으로 30번씩 상처를 낸 후 0, 1, 3, 6, 9 시간대별로 RNA를 추출하였다. Real-time PCR은 Light cycler® 480 SYBR Green I Master Kit (Roche, Germany)에서 제공하는 방법에 따라 3반복 처리하였으며, Light Cycler® 480II (Roche, Germany)을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다 (그림 50). 상처 스트레스 유도성 프로모터는 상처 처리 3시간 후부터 활성이 증가하기 시작하여 6시간 후에는 매우 강하게 활성이 증가하였으며, 이 후 9시간 후에는 활성이 상처 처리 전의 수준으로 감소하였다. 따라서 상처 처리 후 3시간부터 9시간 까지 프로모터의 발현 유도가 가장 강한 것으로 확인하였다.

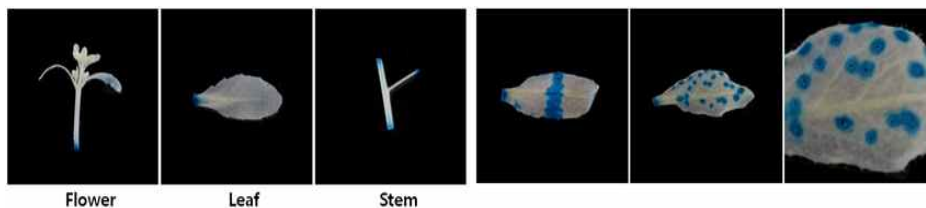


그림 48. 종자를 제외한 애기장대 형질전환체에서의 GUS 발현.

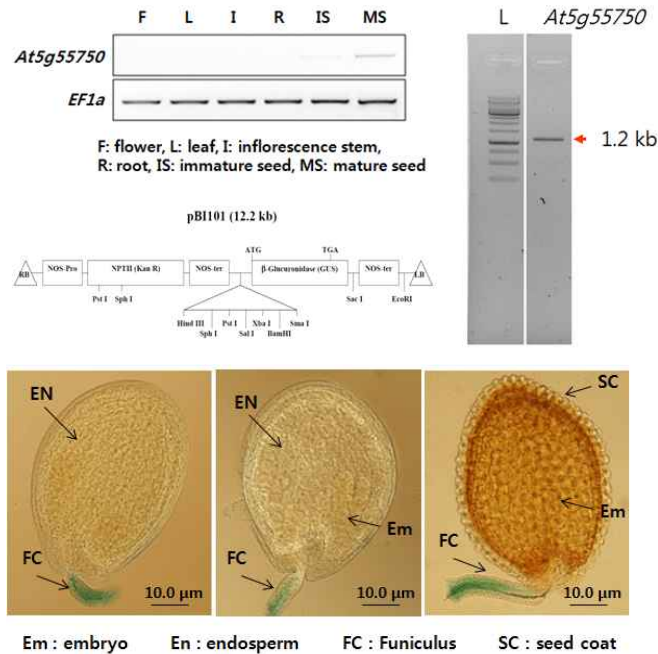


그림 49. 주병조직 특이적 발현 특허출원 [출원번호 : 10-2014-0013010].  
상처 스트레스 유도성 발현 프로모터 [출원번호 : 10-2014-0013028].

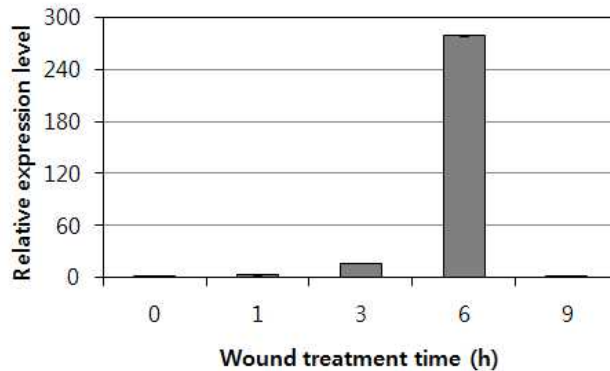


그림 50. 상처 스트레스 처리 후 시간대별 발현 양상.

#### (16) 고효율 발현 뿌리 특이적 프로모터 개발

##### (가) TAIR/ATTED DB에서 뿌리 특이적인 novel 유전자 선별

뿌리에서만 강하게 발현될 것으로 추정되는 유전자를 약 22,000개의 애기장대 유전자들 중에서 139개 선별하였고, 이 중에서 연구가 진행되지 않은 novel 유전자를 38개 최종 선별하였다 (그림 51). 그리고 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) database와 E-FP Brower를 활용하여 각각을 비교 분석하여 15개 유전자를 다시 선별한 후 RT-PCR을 통해서 뿌리에서만 특이적으로 발현하는지를 확인하였다. RT-PCR 분석 결과 뿌리에서만 발현되는 총 9개의 유전자를 확인할 수 있었다 (그림 52).

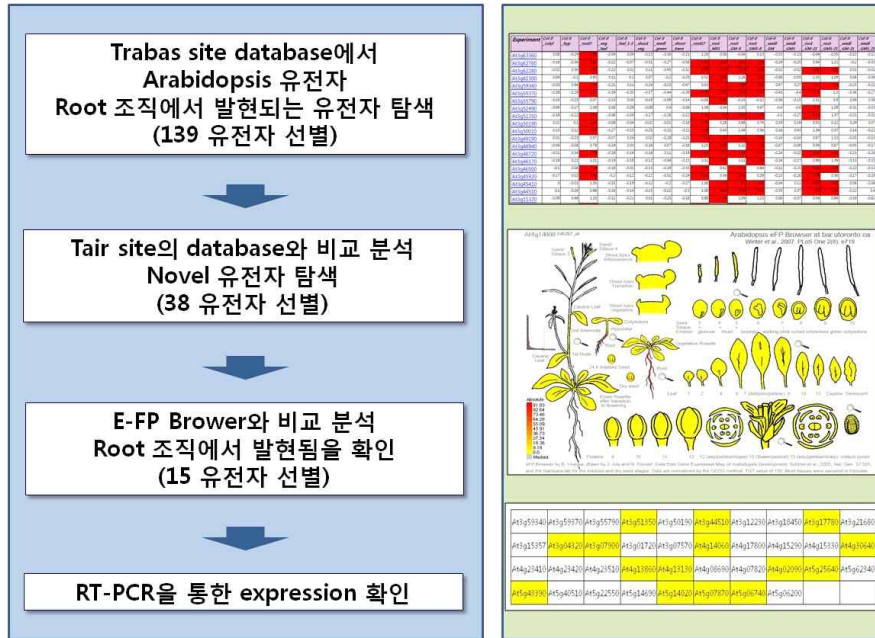


그림 51. TAIR/ATTED DB를 통한 뿌리 특이적 유전자 선별 과정.

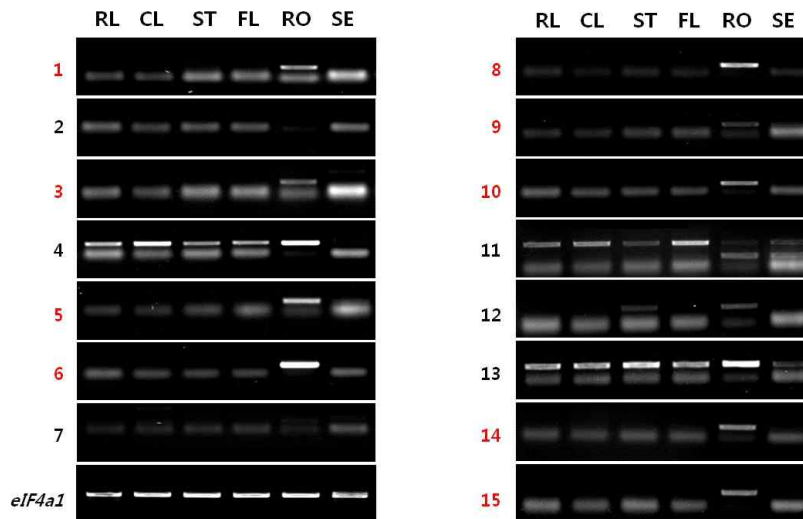


그림 52. 조직별 RT-PCR 분석.

(나) pro6, 9, 15의 발현 분석

종자 특이 프로모터 개발에서와 마찬가지로 방법으로 프로모터를 형질전환하였고, 선별된 형질전환 식물체로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 1 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronidase), 100 mM sodium phosphate(pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담가 37°C 에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올을 첨가하여 2시간 동안 클로로필을 제거하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올에 보관하면서 관찰하였다. 그 결과 pro6, 9, 15 프로모터 모두 잎, 줄기에서 GUS를 전혀 발현시키지 않았으나, 뿌리에서 특이적으로 강하게 GUS 발현이 나타났다 (그림 53).

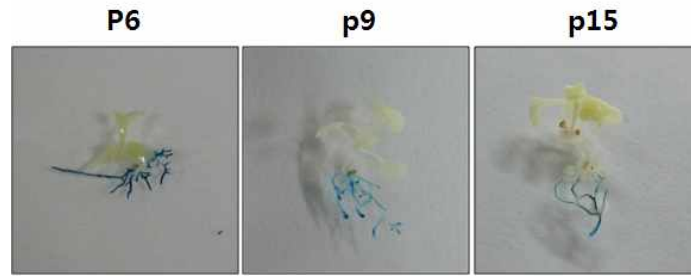


그림 53. 애기장대 형질전환체에서의 GUS 발현.

(다) Pro<sub>DCD</sub>:GUS 형질전환체를 이용한 GUS 발현 분석

뿌리 특이적 프로모터를 확보하기 위해 DCD (development and cell death) 유전자 프로모터 -481 bp 부위를 확보하여 애기장대에 Pro<sub>DCD</sub>:GUS 형질전환체를 구축한 후 조직별 GUS의 발현을 관찰해 보았다. 그 결과, DCD 프로모터는 전반적으로 애기장대 생육단계의 뿌리에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다 (그림 54). 형질전환체 뿌리의 자세한 관찰을 위해 GUS로 염색 후 고정하여 cross-section 기법이용 하여 횡단면을 관찰해 보았다. 그 결과 뿌리 전체에서 GUS가 발현됨을 확인할 수 있었다. 이는 DCD가 뿌리에서 특이적으로 역할을 할 것이라 추정할 수 있었다.

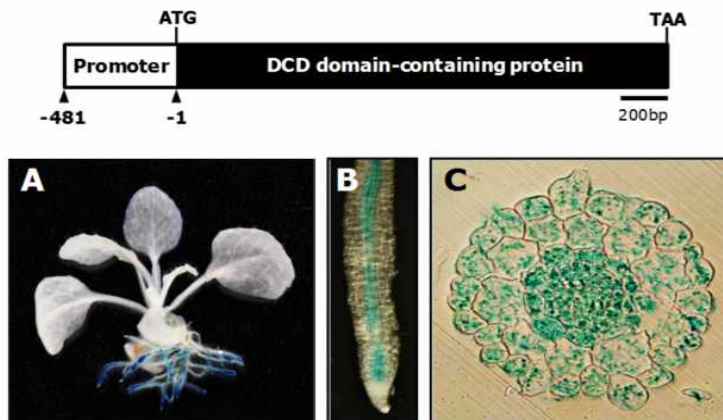


그림 54. Pro<sub>DCD</sub>:GUS 형질전환체의 GUS 활성 관찰.

# 제 8 절 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 신품종 개발 (제 2 핵심 제 3세부과제- 경상대학교)

## 1. 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 호스트 개발

본 연구에서는 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물체 및 식물세포 개발을 목표로 *gnt1 (cg)* mutant나  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase의 knockout 돌연변이체를 이용하여 immunogenic  $\beta$ 1,2-xylose와  $\alpha$ 1,3-fucose가 없는 당단백질 생산 식물체를 개발하는 연구를 진행하였고 이들의 N-glycan을 Con A-, HRP-,  $\alpha$ 1,3-fucose-,  $\beta$ 1,2-xylose-항체와 MALDI-TOF/MS를 이용하여 분석하였다. 본 연구에서는 bioinformatics와 분자생물학적인 기법을 이용한 식물 특이적인 복합당쇄를 만드는데 관여하는 단백질과 외부 유전자의 발현을 억제하는 단백질 등이 결여된 knockout 돌연변이체(벼 5종, 애기장대 18종)를 확보하여 이들 각각의 knockout 돌연변이체에 대한 동형 접합자를 분리하는 일을 마무리하였고 교접을 통하여 맞춤형 당 단백질 생산 식물체를 개발하는 전략을 사용하였다.

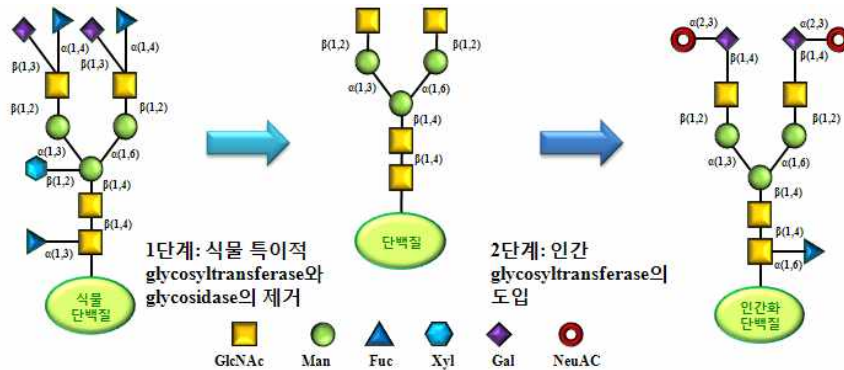


그림 1. 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 호스트 개발의 모식도

본 연구에서는  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase와  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase와 같은 식물 특이적 당수식 효소의 잔여 활성이 남아 있을 수 있는 RNAi나 ER-retention 서열의 첨가 등을 사용한 당구조의 인간화 방법과는 달리 T-DNA가 삽입되어 식물 특이적 당수식 효소가 완전히 제거된 돌연변이체를 사용하기 때문에 당수식 효소의 활성이 100% 제거된 식물체를 개발할 수 있게 된다.

Enzyme: function	Gene locus	Stock number	State	Note
1 alpha1,3-fucosyltransferase (1,3-FucT): 4-galactosyl-N-acetylglucosaminide 3-alpha-L-fucosyltransferase	Osxxgxxxxx	PFG_xA-xxxxx	Homo	T-DNA 1
2 alpha1,4-fucosyltransferase (1,4-FucT): alpha-(1,4)-fucosyltransferase / galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase	Osxxgxxxxx	PFG_xD-xxxxx	Homo	T-DNA 2
3 alpha1,4-fucosyltransferase (1,4-FucTII): alpha-(1,4)-fucosyltransferase / galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase	Osxxgxxxxx	PFG_xA-xxxxx	Hetero	T-DNA 3
4 beta1,2-xylosyltransferase (XylT)	Osxxgxxxxx	PFG_xA-xxxxx	Homo	T-DNA 4
5 N-acetylglucosaminyltransferase (GnTI): alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	Osxxgxxxxx	SAIxGxx	Homo	T-DNA 6
6 RNA-dependent RNA polymerase6 (RDR6)	Osxxgxxxxx	PFG_xA-xxxxx	Hetero	T-DNA 11

그림 2. N-glycosylation의 인간화와 관계된 식물 특이적 당 단백질 수식 효소의 벼 돌연변이체 확보 현황



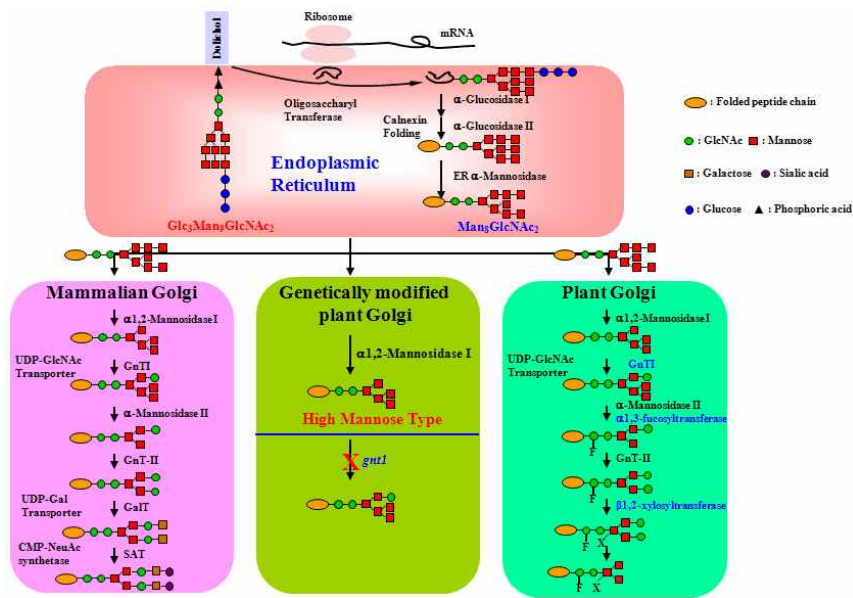


그림 3. N-acetylglucosaminyltransferase I 돌연변이체(*gnt1*)를 이용한 immunogenic  $\beta$ 1,2-xylose 와  $\alpha$ 1,3-fucose가 없는 high mannose type N-glycan 생산 식물체를 개발전략

## 2. 조직 특이적 유전자 발현을 유도하는 강력한 promoter 동정

본 연구는 단백질 glycosylation에 필수적인 signal sequence 그리고 다양한 종류의 affinity tag들을 이용하여 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템을 구축하고 이를 이용하여 목표(target) 단백질을 생산하기 위한 재조합 벡터 구축, Agrobacterium을 이용한 식물체 형질전환 및 고 발현 계통확립하는 것을 목표로 하였다. 이를 위하여 2-D와 MALDI-TOF MS 분석법을 이용하여 ABA를 처리한 식물 배아에서 유기된 캘러스에서 강하게 발현되는 10개의 단백질을 동정하고(그림 1., 표 1) 이 중에서 가장 높은 단백질인 1Cys-peroxiredoxin (1Cys-Prx) 의 1,920bp의 5' -flanking 서열을 베티 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR cloning 하였다.



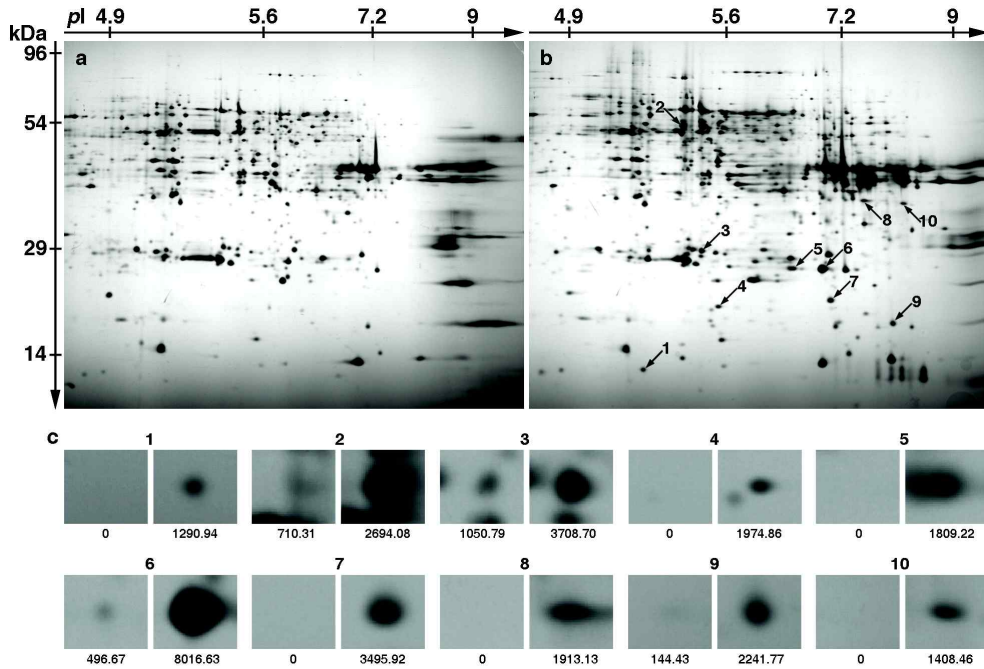


그림 4. 프로티오믹 분석 기법을 이용한 ABA 유도 배아 캘러스 단백질 동정 (a) 대조군 (b) 10  $\mu$ M ABA를 48 h 동안 처리한 배아 캘러스 단백질의 2-D 이미지, (c) 대표 단백질 spot 들의 확대 이미지와 전체 단백질 양으로 표준화하여 비교된 양

표 1. MALDI-TOF MS를 통한 ABA 유도 배아 캘러스 단백질 동정

Spot	Protein domain or function	Accession No.	Protein score	pI/Mw	Localization	Quantity	
						Con	+ABA
1	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase domain-containing protein	NP_001049720	137	5.54/15,049	Cytoplasm	0	1290.94
2-1	Enolase	NP_001064223	109	5.41/48,356	Cytoplasm	710.	2694.08
2-2	Myo-inositol phosphate synthase	NP_001049242	102	5.44/56,466	Cytoplasm	31	
3	Hypothetical protein	NP_001056364	109	5.58/26,739	Cytoplasm	1050.79	3708.70
4	Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) belongs to a highly conserved family of phospholipid-binding proteins	NP_001055802	145	5.71/18,234	Cytoplasm	0	1974.86
5	1-Cys peroxiredoxin	NP_001060407	154	5.97/24,198	Cytoplasm	0	1809.22
6	1-Cys peroxiredoxin	NP_001060407	257	5.97/24,198	Cytoplasm	496.67	8016.63
7	Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit Tim17/22 family protein	NP_001049884	84	6.42/18,416	Mitochondria	0	3495.92
8	Aldose reductase (aldehyde reductase)	NP_001055826	129	6.32/35,852	Cytoplasm	0	1913.13
9	B3 DNA binding domain-containing protein	NP_001048213	133	10.56/23,950	Chloroplast	144.43	2241.77
10	Annexin p34	NP_001048149	205	6.77/35,761	Cytoplasm	0	1408.46

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 64 are significant ( $p < 0.05$ ). pI/Mw is the calculated isoelectric point and molecular weight by the Compute pI/Mw tool from the [ExPASy Proteomics Server](#). Localization, subcellular localization of proteins was predicted by Wolf PSORT on the [ExPASy Proteomics Server](#).

*ICys-Prx* 유전자의 전사개시부위를 알아보기 위하여 RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends (5' RLM-RACE)를 수행하였고 AUG 해독 시작 코돈으로부터 96 염기쌍 앞부분의 사이토신이 전사개시부위라는 것을 확인할 수 있었다(그림 2). PlantCARE

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 데이터베이스를 이용하여 *ICys-Prx* promoter 서열의 잠재적 *cis*-acting 조절 인자 분석한 결과 *ICys-Prx* promoter는 ABRE, ARE, CAT-box, CCGTCC-box, RYE and W-box 등의 잠재적 *cis*-acting 조절 인자를 가지고 있는 것으로 나타났고 잠재적 TATA-box가 전사개시부위로부터 26bp 위쪽에서 위치하고 있었고 씨앗 특이적인 *cis*-acting 조절 인자인 RYE와 ABRE가 각각 전사개시부위로부터 각각 89 그리고 98 bp 위쪽에서 위치하고 있는 것으로 나타났다(표 2). 본 연구에서 전사개시부위로부터 각각 1,814, 1,007, 606 bp 위쪽부터 *ICys-Prx* 유전자의 promoter 후보로 간주하고 이들을 F1, F2, F3로 명명하고 클로닝한 후 실험을 진행하였다.



그림 5. PlantCARE 데이터 베이스를 이용한 *ICys-Prx* promoter 서열의 잠재적 *cis*-acting 조절 인자 분석

표 2. *I-Cys Prx* 유전자의 5' 위쪽 서열에서 발견되는 *cis*-acting 조절 인자

Cis-element	Sequence	Position <sup>a</sup> & strand	Implication	Found organism	Reference
ABRE	GGTACG TGGC	-98 (+)	<i>cis</i> -acting element involved in abscisic acid responsiveness	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	(Guilting et al., 1990; Shen et al., 1993)
ARE	TGGTTT	-1123 (-), -608 (-)	<i>cis</i> -acting regulatory element essential for anaerobic induction	<i>Zea mays</i>	(Walker et al., 1987)
CAAT-box	CAAAAT, CAAT	-1121 (+), -880 (+), -513 (-), -463 (+), -315 (-), -248 (+)	common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Glycinemax</i> , <i>Brassicarapa</i> , <i>Hordeumvulgare</i>	(Vauterin et al., 1999)
CAT-box	GCCACT	-341 (+)	<i>cis</i> -acting regulatory element related to meristem expression	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Chaubet et al., 1996)
CCGTCC-box	CCGTCC	-572 (-), -176 (-)	<i>cis</i> -acting regulatory element related to meristem-specific activation	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Chaubet et al., 1996; Meshi et al., 2000)
RYE	CATGCA	-89 (+)	conferring seed-specific expression of various genes, including those encoding late	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>	(Baumlein et al., 1992)

			embryogenesis abundant (LEA) proteins		
TATA-box	TATAAA	-26 (+)	core promoter element around -30 of transcription start	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Oryza sativa</i>	(Utsugi <i>et al.</i> , 1998; Prieto-Dapena <i>et al.</i> , 1999)
W-box	TTGACC	-686 (+) -154 (-)	wounding and pathogen responsiveness	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Petroselinum crispum</i>	(Rushton <i>et al.</i> , 1996)

<sup>a</sup>Distance (in bp) from the putative transcription start site. Putative *cis*-acting elements in the promoter were analyzed online using PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

발현 패턴과 프로모터의 활성을 분석하기 위하여, 1814, 1007, 606bp의 *ICys-Prx* 5' flanking 부위와 96 bp 5' -UTR을 포함하고 있는 F1, F2, F3 각각의 프로모터 부위는 벼의 genomic DNA로부터 PCR 을 통해 증폭되었으며, *EcoRI*과 *NcoI* 제한효소를 이용하여 대조군인 이원벡터인 pCAMBIA 1301 벡터의 CaMV35S 부위에 대신 삽입하여 GUS 리포터 유전자와 연결하였다. 이후 상기 벡터는 아그로박테리움 매개의 형질전환을 통해 벼로 도입되었다. F1, F2, F3의 세 가지 *ICys-Prx* 프로모터에 의한 GUS의 활성을 확인하기 위해서, 형질전환 벼의 종자를 조직화학적 염색하였다. 그림 2.에 나타낸 바와 같이 세 가지의 *ICys-Prx* 프로모터에 의한 GUS 활성은 수도 배아와 호분층에서 높게 나타났다. 이는 대조군인 CaMV 35S 프로모터에 의한 GUS 활성보다 더 강력한 것이다.

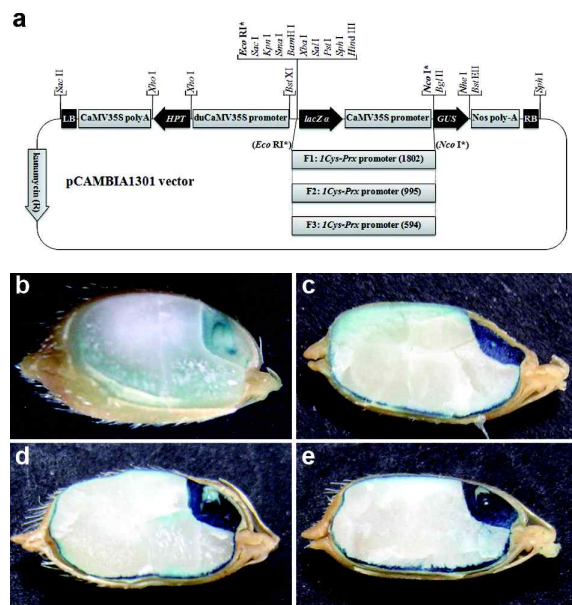


그림 6. *ICys-Prx* 프로모터를 포함하는 재조합 벡터의 제작 및 형질전환 식물에서의 GUS활성 비교

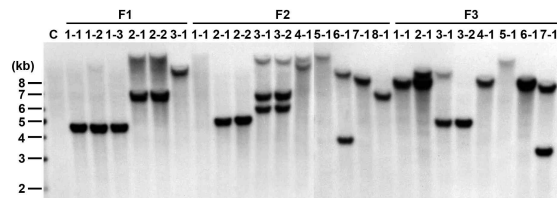


그림 7. *ICys-Prx* 프로모터 F1, F2, F3-GUS를 이용해 형질전환된 T3 수도 라인의 Southern blot 분석

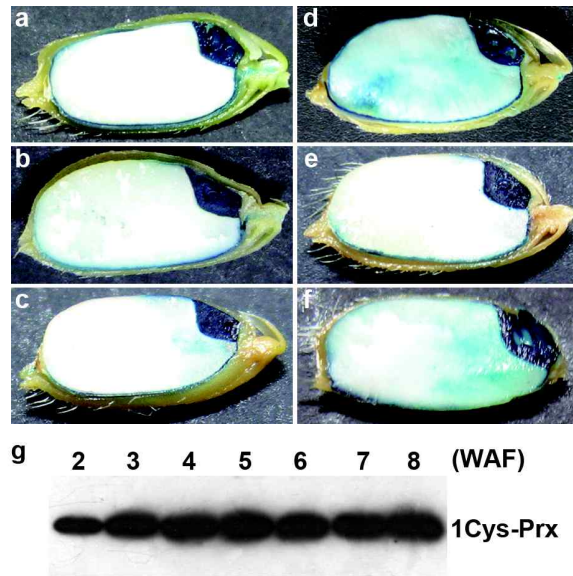


그림 8. *1Cys-Prx* 프로모터 F1-GUS를 이용해 형질전환된 T3 수도의 개화 후 씨앗성숙과정에 따른 GUS 활성 분석 및 야생형 벼에서의 1Cys-Prx 발현의 western blot 분석

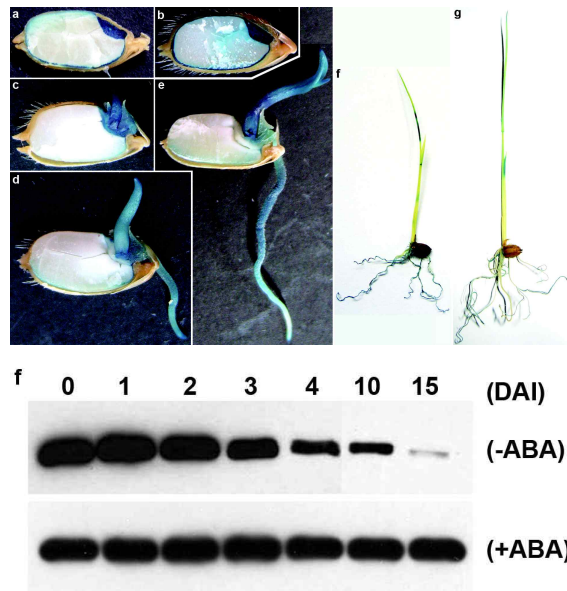


그림 9. *1Cys-Prx* 프로모터 F1-GUS를 이용해 형질전환된 T3 수도의 흡수 후 발아과정에 따른 GUS 활성 분석 및 야생형 벼에서의 1Cys-Prx 발현의 western blot 분석

본 실험의 목적은 씨앗의 호분층과 배아에서 특이적으로 강력한 전사유도 활성을 나타내는 식물 프로모터를 찾아내는 것이므로 형질전환 식물체의 종자에서 *1Cys-Prx* 프로모터에 의한 GUS 발현 정도를 평가하였다. GUS 활성 분석 결과 *1Cys-Prx* 프로모터 F1, F2, F3는 각각  $21.9 \pm 1.8$ ,  $24.9 \pm 3.3$ ,  $23.4 \pm 3.4$  pmol (4-MU/min/ $\mu$ g protein) 을 나타냈다(그림 7). 또한, 배아 유래의 칼루스에서 F1, F2, F3 1시스테인 퍼옥시레독신 프로모터에 의한 GUS 의 활성은 전체 종자에서 관찰되는 것 보다 두 배 이상 되는 것으로 확인되었으며, ABA 처리 시 더욱 증가하였다(그림 8).



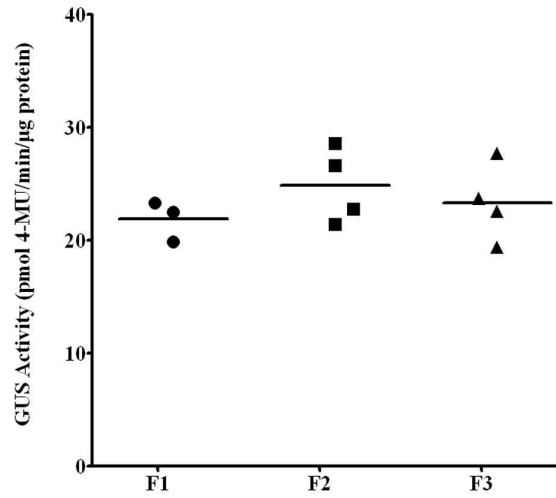


그림 10. *1Cys-Prx* 프로모터 F1, F2, F3-GUS를 이용해 형질전환된 T3 수도 라인의 씨앗에서의 GUS 활성 분석 및 야생형 벼에서의 *1Cys-Prx* 발현의 western blot 분석

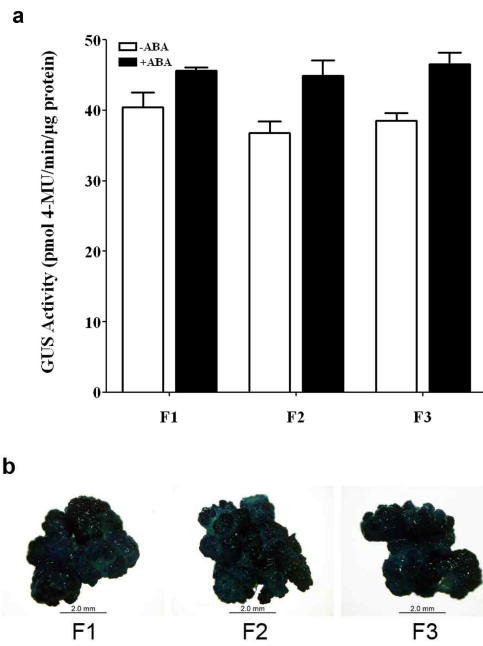
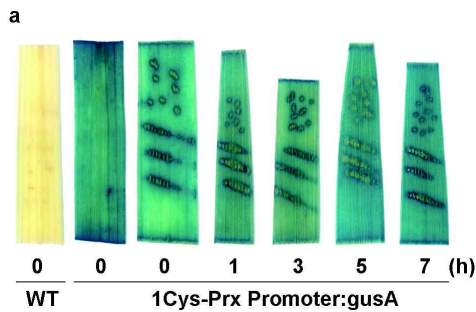


그림 11. *1Cys-Prx* 프로모터 F1, F2, F3-GUS를 이용해 형질전환된 T3 수도 라인의 배아에서 유기된 캘러스에서 GUS 활성 분석



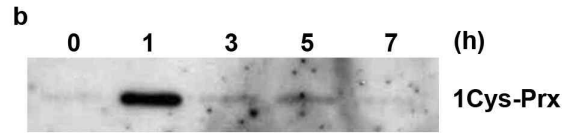


그림 12. *ICys-Prx* 프로모터 F1-GUS를 이용해 형질전환된 T3 수도 라인의 잎에서 상처 유발 후 GUS 활성 분석 및 야생형 벼 잎에서 상처 유발 후 1Cys-Prx 발현의 western blot 분석

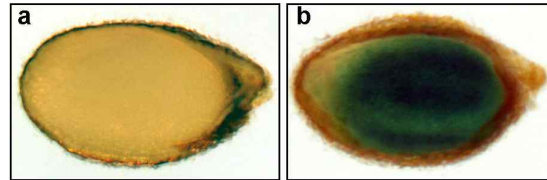


그림 13. *ICys-Prx* 프로모터 F1-GUS를 이용해 형질전환된 애기장대 씨에서 GUS 활성 분석

실험 결과에서 종자 특이적인 *ICys-Prx* 프로모터는 외래 단백질 생산에 적합한 조직 특이적인 강한 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. *ICys-Prx* 프로모터는 호분층 및 배아에서 재조합 단백질의 생산에 실용적으로 이용될 수 있는데, 수도를 비롯한 단자엽 식물의 종자에서 배아 및 호분층은 단백질 함량이 높고 배젓 조직으로부터 기계적 분리가 용이하여 바이오 의약품을 포함한 고부가 단백질을 발현시키고 분리하기에 적합하여 특히 유용하다. 본 연구에서는 *ICys-Prx* 프로모터외에도 애기장대 씨앗에서 높은 전사유도 활성을 가지고 있는 cruciferin 1과 cruciferin 3 유전자의 promoter, signal sequence, terminator를 분리하여 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축에 이용하였으며 당단백질의 glycosylation, 폴딩, 활성화에 필수적인 ER, 골지를 거친 후 단백질 저장 액포(protein storage vacuole, PSV) 등으로 targeting 되거나 세포 밖으로 분비될 수 있는 signal sequence(rice HRP, cruciferin 1, cruciferin 3 signal sequence)를 분리하고 이를 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축에 이용하였다.

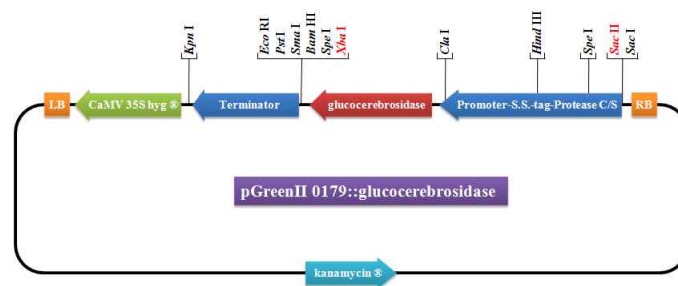


그림 14. 본 연구에서 선발된 promoter, signal sequence, affinity tag, terminator를 활용하여 제작된 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector)의 모식도: 여러 가지 promoter, signal sequence, affinity tag, terminator 등의 조합으로 3개 이상의 고 효율 당단백질 발현용 이원 벡터(binary vector)를 제작하였음.



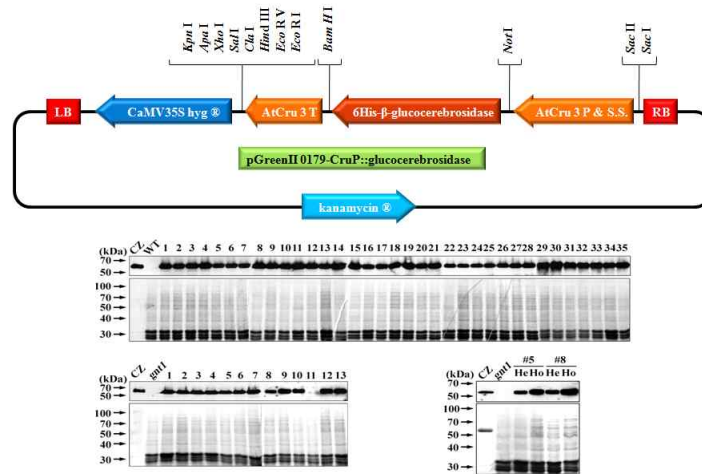
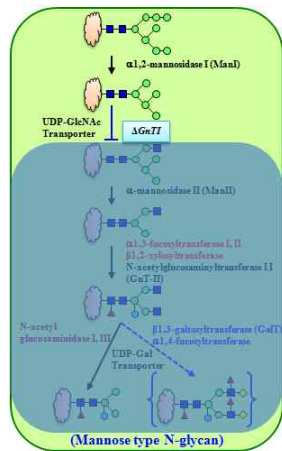


그림 15. 본 연구에서 개발된 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector)를 이용한 목표 단백질(glucocerebrosidase)발현 벡터 제작 및 이를 이용한 glucocerebrosidase발현 애기장대 형 질전환체 제조

2-3 세부과제 연구에서는 여러 가지 promoter, signal sequence, affinity tag, terminator 등의 조합으로 3개 이상의 고 효율 당단백질 발현용 이원벡터(binary vector)를 제작하였고 이들을 이용하여 계획했던 목표 단백질(glucocerebrosidase) 외에 protein N-glycosidase A (PNGase A) 유전자 발현 재조합 벡터를 구축하였고 이들 중 glucocerebrosidase 발현 벡터를 포함한 일부는 Agrobacterium을 매개로하여 식물형질전환을 완료하여 고 발현 계통을 확립하였다.

### 3. N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*) 및 homozygote *gnt1* cell line 확립

식물을 이용한 바이오 의약품 생산기술이 상용화되어 바이오 의약품의 경제적 대중화를 실현하기 위해서는 인체 사용 시 면역반응이 유발되는  $\alpha$ 1,3-fucose,  $\beta$ 1,2-xylose 등을 포함하는 식물 특이적 당쇄구조를 인간화하고 바이오 의약품 종류에 따라 맞춤형 당쇄구조를 생산할 수 있는 발현시스템을 개발하는 것이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체 벡(*gnt1*)를 이용하여  $\alpha$ 1,3-fucose,  $\beta$ 1,2-xylose와 같은 식물 특이적 당이 없고 high-mannose type N-glycan을 생산하는 벡를 구축하였다.



Organisms	Defects	Reference
<i>C. elegans</i>	normal phenotype, susceptible to pathogenic bacteria	<i>Biochem. J.</i> (2004) 381: 996-1001
<i>D. melanogaster</i>	male sterile, defects in locomotion, severely reduced life span	<i>J. Biol. Chem.</i> (2006) 281: 12776-12785
<i>M. musculus</i>	severe developmental abnormalities in neural tube formation and vascularization, lethality at embryonic days 9-10	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> (1994) 91: 728-732; <i>EMBO J.</i> (1994) 13: 2086-2088
<i>A. thaliana</i>	normal phenotype, sensitive to salt stress	<i>Plant Physiol.</i> (1993) 102: 1109-1118
<i>N. tabaccum</i>	normal phenotype (antisense)	<i>Glycoconjugate J.</i> (2004) 21: 276-282
Lec I (CHO) cell	grow and proliferate normally	<i>Som. Cell Genet.</i> (1975) 1: 3-26
Ric <sup>8</sup> 14 (BHK) cell	grow and proliferate normally	<i>Biochem. J.</i> (1998) 336: 593-598



그림 16. N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*)를 이용한 high-mannose type N-glycan 생산(좌) 및 N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*) 및 세포의 표현형(우)

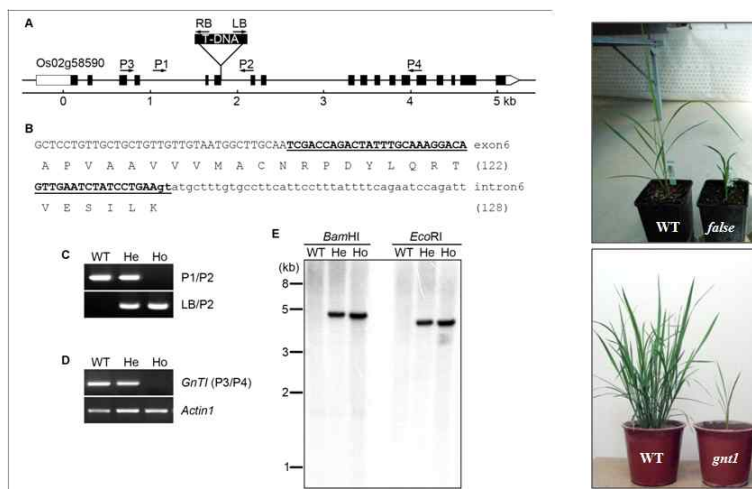


그림 17. N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*)의 분리 및 동정

N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체 벼(*gnt1*)를 포함하는 벼 종자를 프랑스의 제노플랜트 베일러에서 분양받아 genomic-PCR을 통하여 homozygote *gnt1*을 분리하였고 RT-PCR로 N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자의 발현이 완전하게 knockout 되었음을 확인하였다. 또한 flanking region sequencing을 통하여 T-DNA가 엑손 6번과 intron 6번 연결부위에 삽입되었음을 확인하였다. N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*): 오른쪽 하단

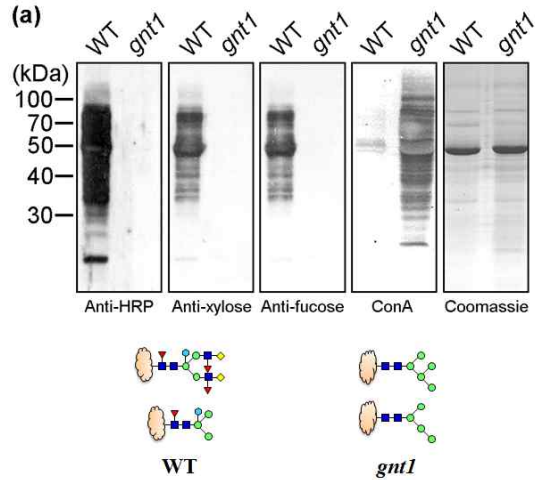


그림 18. N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*)의 생화학적 분석을 통한 N-glycan pattern 분석

High-mannose type N-glycan을 인지하는 Con A-, complex type N-glycan을 인지하는 HRP-,  $\alpha$  1,3-fucose-,  $\beta$  1,2-xylose-항체 등을 이용하여 WT과 *gnt1*의 N-glycan pattern 분석한 결과 WT에 비해 *gnt1*에서는  $\alpha$  1,3-fucose,  $\beta$  1,2-xylose를 포함하는 complex type N-glycan이 합성되지 않았고 high-mannose type N-glycan의 양이 증가함을 확인할 수 있었다.

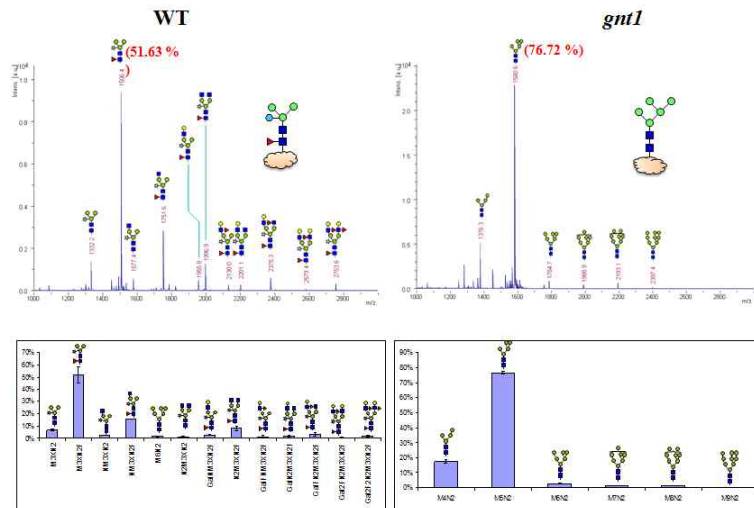


그림 19. N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*)의 MALDI-TOF MS를 통한 N-glycan pattern 분석

생화학적 분석결과와 동일하게 MALDI-TOF MS를 통하여 WT과 *gnt1*의 N-glycan pattern 분석한 결과에서도 WT에는 paucimannosidic-type N-glycans ( $\text{Man}_2\text{XylFucGlcNAc}_2$ )과 complex type N-glycans이 주로 존재하였고 이에 비해 *gnt1*에서는 paucimannosidic-type N-glycans과 complex type N-glycans이 확인되지 않았고 high-mannose type N-glycans( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ )이 주로 존재하였다.

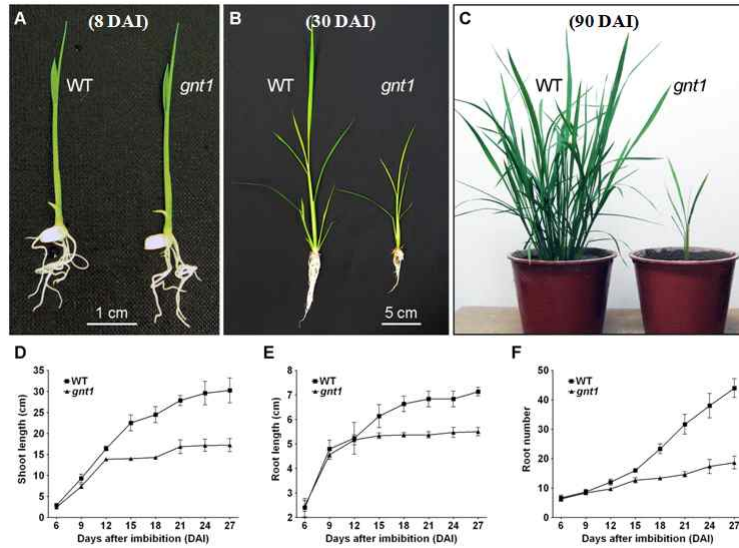


그림 20. *gnt1* 돌연변이체의 생육 분석

*gnt1* 돌연변이체는 WT에 비해 초기생육이 현저히 느리고 분얼을 하지 않고 죽는 현상을 나타내었다. 이결과로 볼 때 N-acetylglucosaminyltransferase I 이 식물체의 발달에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

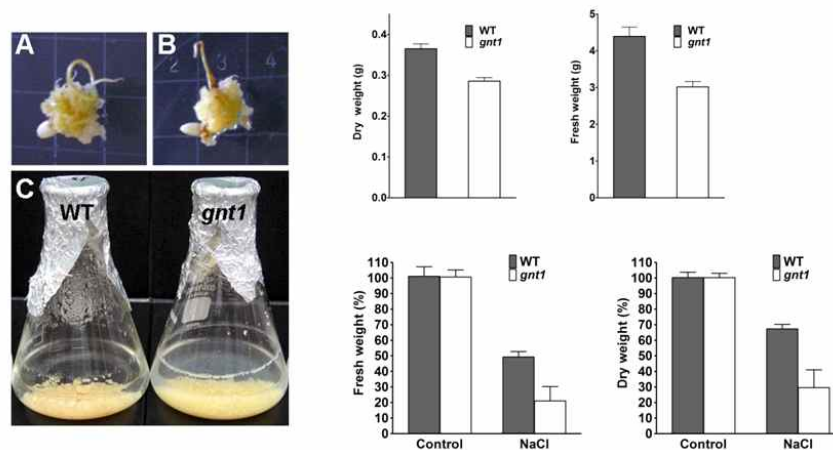


그림 21. N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체(*gnt1*)의 homozygote cell line 확보 및 분석

며 N-acetylglucosaminyltransferase I (*gnt1*) 돌연변이체의 씨앗으로부터 callus를 유도하여 genomic-PCR과 RT-PCR을 통하여 homozygote *gnt1*을 분리 확보하였다. *gnt1* 돌연변이체 cell line은 WT에 비해 세포 증식이 느렸고 고염스트레스에 민감한 반응을 나타내었고, callus의 크기가 작았다. 이러한 결과는 N-acetylglucosaminyltransferase I 이 세포벽 형성과 세포 간 연결에 관여되어 있을 가능성을 제시해 준다.

4.  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase 유전자 knockout 돌연변이체(*fuct-2*) 분리 및 특성규명

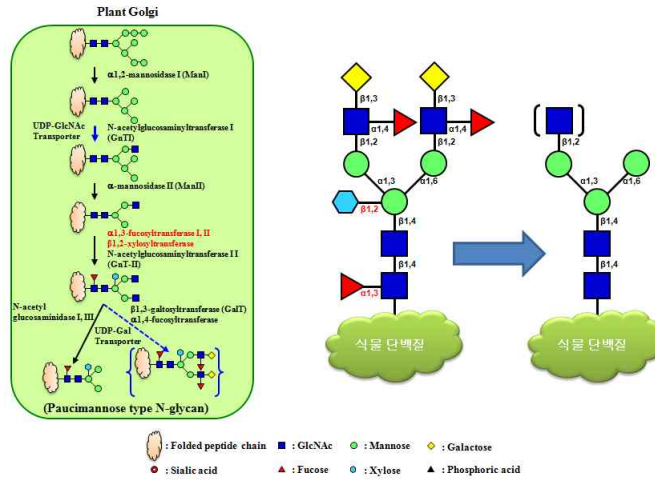


그림 22.  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase와  $\beta$  1,2-xylosyltransferase 유전자 knockout 돌연변이체를 이용한 식물 특이적 당( $\alpha$  1,3-fucose,  $\beta$  1,2-xylose)이 없는 N-glycans을 생산하는 벼 구축의 모식도

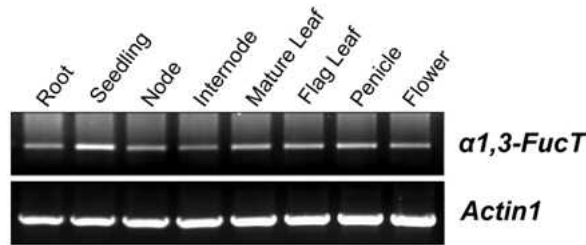


그림 23. RT-PCR을 통한  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase 유전자의 조직별 발현분석

$\alpha$  1,3-fucosyltransferase 유전자가 거의 모든 벼의 조직에서 발현이 되고 있음을 알 수 있다.

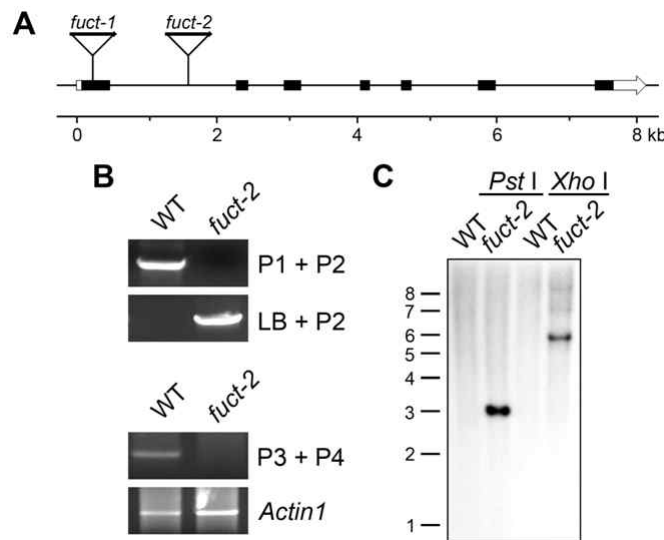


그림 24.  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase 유전자 knockout 돌연변이체(*fuct-2*)의 분리 및 동정



$\alpha$  1,3-fucosyltransferase 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체 벼(*fuct-2*)를 포함하는 벼 종자를 경희대 Crop Biotech Institute에서 분양받아 genomic-PCR을 통하여 homozygote *fuct-2*을 분리하였고 RT-PCR로  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase 유전자의 발현이 완전하게 knockout 되었음을 확인하였다. 또한 genomic Southern을 통하여 single copy의 T-DNA가 *fuct-2*에 존재함을 확인하였다.



그림 25. *fuct-2* 돌연변이체의 생육 및 표현형 분석

*fuct-2* 돌연변이체의 초기생육은 WT에 비해 큰 차이를 나타내지는 않았지만 생육 1개월 정도부터 약한 왜소증을 나타내었고 이삭의 발달이 잘되지 않는 표현형을 보였으며 특히 이삭을 감싸고 있는 잎으로부터 출수가 완전히 이루어지지 않는 현상을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때  $\alpha$  1,3-fucosyltransferase 유전자가 벼의 길이 성장과 이삭 발달에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

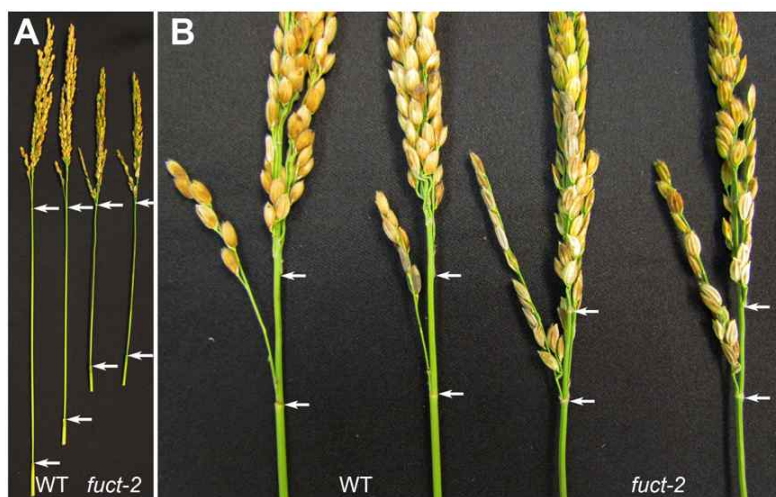


그림 26. *fuct-2* 돌연변이체의 길이 성장 분석

*fuct-2* 돌연변이체의 길이 성장을 정확하게 분석하기위하여 internode의 길이를 분석하여 본 결과 *fuct-2*



돌연변이체가 WT에 비해 internode의 길이가 상당히 짧아져 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 그림 10에 관찰된 *fuct-2* 돌연변이체의 불완전 출수가 짧은 internode의 길이에서 기인되었음을 알 수 있다.

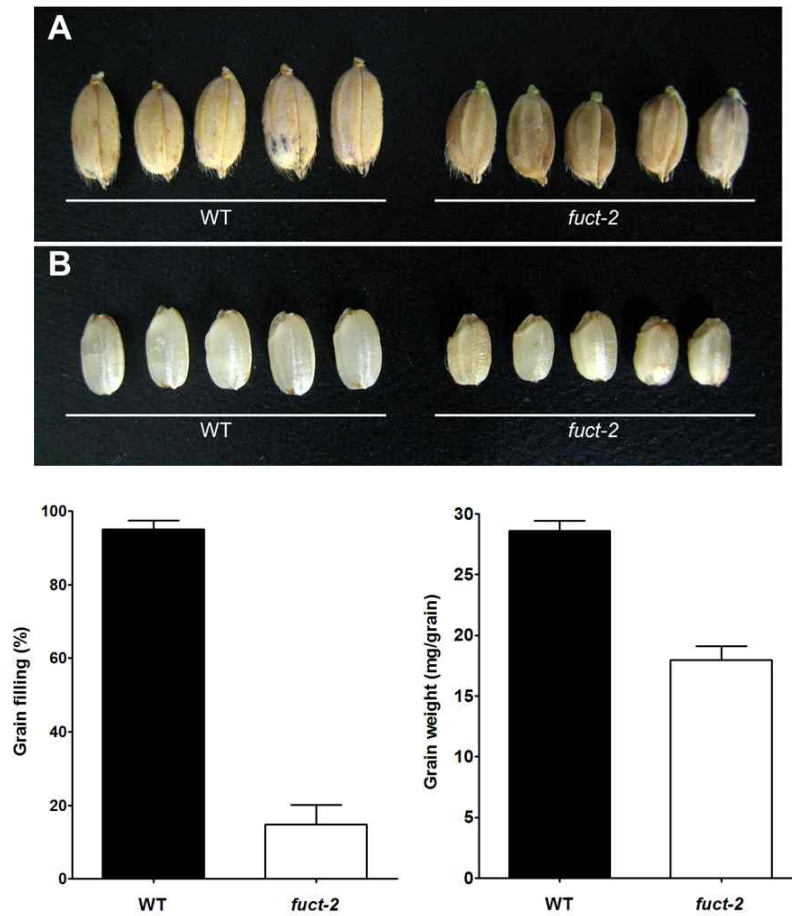


그림 27. *fuct-2* 돌연변이체의 씨앗 발달 분석

*fuct-2* 돌연변이체의 씨앗은 WT 씨앗에 비해 약 65%의 평균 무게를 나타내었고 씨앗의 색깔이 누렇게 탁한 색을 띠었다. 그리고 전체적으로 알이 차서 여분 씨앗의 비율이 WT에 비해 약 20% 정도였다. 이러한 결과는  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase 유전자가 벼의 길이 생장과 이삭 발달은 물론 벼의 씨앗의 발달에도 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

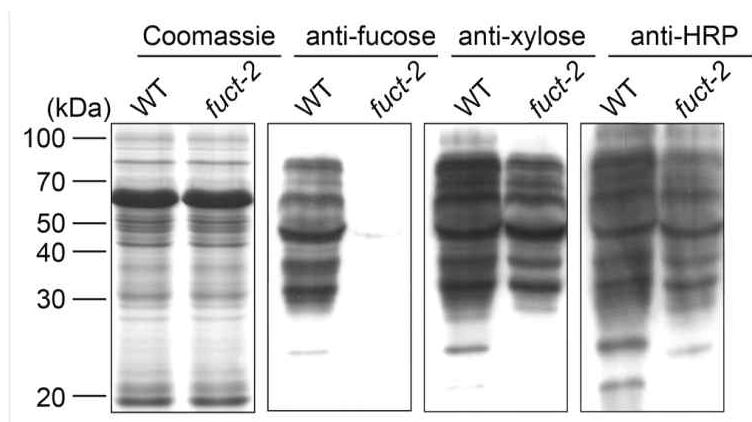


그림 28. *fuct-2* 돌연변이체의 생화학적 분석을 통한 N-glycan pattern 분석

$\alpha$  1,3-fucose-,  $\beta$  1,2-xylose-, complex type N-glycan을 인지하는 HRP-항체 등을 이용하여 WT과 *fuct-2*의 N-glycan pattern 분석한 결과 WT에 비해 *fuct-2*에서는  $\alpha$  1,3-fucose를 포함하는 complex type N-glycan이 합성되지 않았고  $\beta$  1,2-xylose-, complex type N-glycan을 인지하는 HRP-항체도 *fuct-2* 돌연변이체의 단백질과 약한 반응을 나타냄을 확인할 수 있었다.

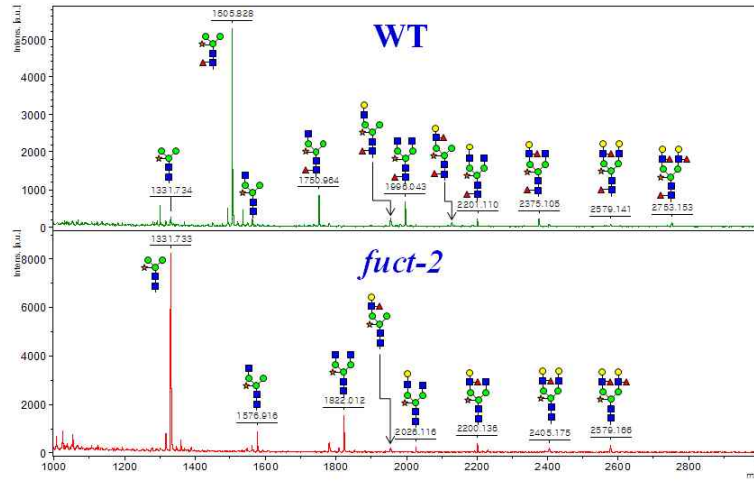


그림 29. *fuct-2* 돌연변이체의 MALDI-TOF MS를 통한 N-glycan pattern 분석

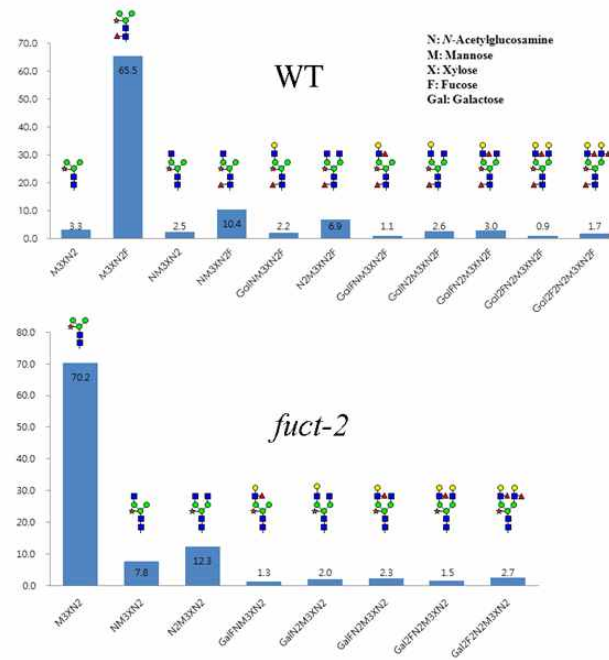


그림 30. *fuct-2* 돌연변이체의 MALDI-TOF MS를 통한 N-glycan pattern 분석

생화학적 분석결과와 동일하게 MALDI-TOF MS를 통하여 WT과 *fuct-2*의 N-glycan pattern 분석한 결과에서도 WT에는 paucimannosidic-type N-glycans ( $\text{Man}_2\text{XylFucGlcNAc}_2$ )과 complex type N-glycans이 주로 존재하였고 이에 비해 *fuct-2*에서는  $\alpha$  1,3-fucose를 포함하는 complex type N-glycans이 확인되지 않았다.

5. 식물의 단백질 폴딩 조절인자의 확보 및 특성규명

표 3. 식물 단백질 폴딩 조절 유전자 분리, 돌연변이체 확보 및 과발현체 구축현황

	유전자	cDNA	돌연변이체	과발현체	기타
1	<i>Irel-1</i>	O	O	O	<i>irel-1*irel-2</i> double mutant 구축
2	<i>Irel-2</i>	O	O	O	
3	<i>GCN2</i>	X	O	X	
4	<i>Weel</i>	X	O	X	<i>bzip17*bzip28</i> double mutant 구축
5	<i>bZIP17</i>	O	O	O	
6	<i>bZIP28</i>	O	O	O	
7	<i>S1P</i>	X	O	X	
8	<i>S2P</i>	X	O	X	
9	<i>c-Jun-like</i>	O	O	O	
10	<i>p58<sup>IPK</sup></i>	O	O	O	항체 제조
11	<i>eIF2α-1</i>	O	O	O	eIF2α 및 phospho-eIF2α (Ser51) 항체 제조
12	<i>eIF2α-2</i>	X	O	O	
13	ALG3	O	O	O	
14	OS9	O	O	X	
15	BRI1	O	O	O	항체 제조, <i>bril-5*alg3</i> , <i>bril-9*alg3</i> , <i>bril-5*os9</i> , <i>bril-9*os9</i> double mutant 구축
16	BES1	O	X	X	항체 제조
17	ARR2	O	O	△	
18	AHK3	X	O	X	항체 제조 중
19	CESA	X	X	X	항체 제조
20	Susy	X	X	X	항체 제조 중

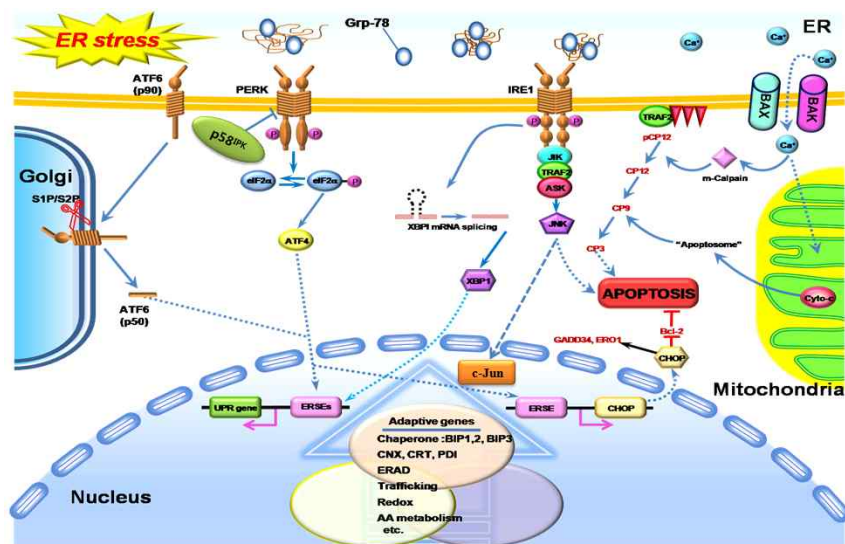


그림 31. 소포체 스트레스에 의한 UPR 신호전달

진핵세포의 막 단백질과 분비 단백질의 합성, 폴딩 및 이동 조절은 소포체 막에 존재하는 sensor들의 신호인지와 effector들에 의한 신호전달 작용을 통하여 이루어진다. 유전적, 병리적, 생리적 또는 환경적 요인에 의하여 소포체에 폴딩이 제대로 되지 못한 단백질이 증가하여 축적되게 되면 세포는 이러한 부하를 감소시키기 위하여 새로운 단백질의 합성을 억제(translational attenuation)하고, 소포체 내에 샤페론의 양을 증가(transcriptional activation)시켜 unfolded protein의 폴딩을 도와주거나, 소포체의 크기를 증가시켜 unfolded protein의 농도를 희석하고, ubiquitin-proteasome system을 통해 변성된 단백질을 분해하는

ER-associated degradation (ERAD)를 나타냄으로써 소포체 스트레스를 완화시키려는 초기 반응을 나타내지만, 샤페론의 도움과 ERAD에 의해 소포체 스트레스가 완화되지 못할 정도의 threshold를 넘어선 소포체 스트레스 상황에서는 세포사멸(apoptosis) 경로가 활성화되어 손상된 세포가 제거되며 이러한 일련의 세포 반응을 unfolded protein response (UPR)라고 부른다.

여러 가지 생리적, 병리적, 유전적, 환경적 요인에 의해 폴딩이 불완전하거나 안 된 단백질과 소포체 샤페론의 결합이 지속되면 소포체막에 존재하는 activating transcription factor 6 (ATF6), the inositol requiring kinase 1 (IRE1), 그리고 double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), general control nonrepressed 2 (GCN2)와 같은 소포체 스트레스를 감지하고 UPR 신호를 세포질로 전달하는 단백질(UPR signal transducer)이 활성화 된다.

가. 애기장대 IRE1의 소포체 스트레스 및 UPR 신호전달 관련 기능연구

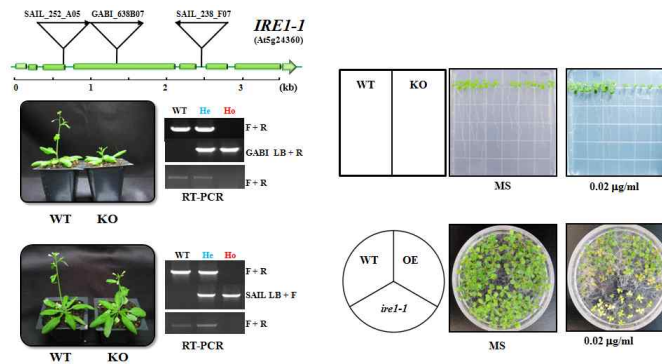


그림 32. 애기장대 IRE1 유전자(돌연변이체 및 과발현체) 분리 및 ER stress 민감도 실험

본 연구에서는 IRE1 유전자에 T-DNA가 삽입된 애기장대 돌연변이체(*ire1-1*)를 genomic-PCR을 통해 분리하였고 RT-PCR로 IRE1 유전자의 발현이 완전하게 knockout되었음을 확인하였다. 또한 소포체 스트레스 조건에서 WT, 과발현체에 비해 *ire1-1* 돌연변이체가 더 민감한 표현형이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

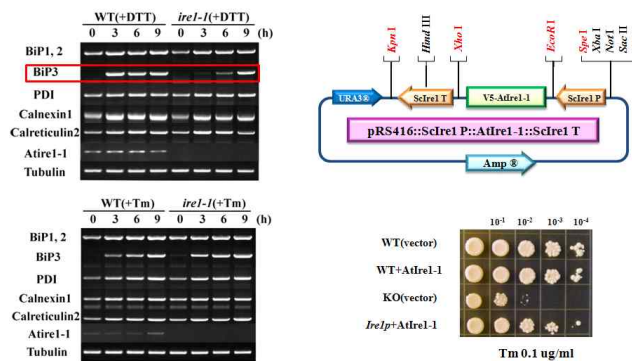


그림 33. Tunicamycin 처리 후 WT과 *ire1-1* 돌연변이체에서의 소포체 샤페론 유전자들의 발현 비교 분석 및 애기장대 IRE1-1 유전자를 이용한 효모 *ire1* 돌연변이체 complementation

Tunicamycin을 처리한 후 WT과 *ire1-1* 돌연변이체에서 소포체 샤페론 유전자들을 RT-PCR을 통해 비교 분석한 결과 특이적으로 소포체 샤페론인 BiP3 유전자가 WT에 비해 *ire1-1* 돌연변이체에서 지연유도

되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 yeast complementation 실험을 통해 식물 IRE1-1이 소포체 스트레스에 민감한 반응을 나타내는 효모 *ire1* 돌연변이체의 표현형을 복구시킴으로써 효모 Ire1p의 기능을 대신할 수 있다는 것을 확인하였다.

나. c-Jun 유전자 knockout 돌연변이체(*c-jun*)와 과발현체의 확립과 소포체 스트레스에 의한 세포사멸에서의 기능 분석

사페론의 도움과 ERAD에 의해 소포체 스트레스가 완화되지 못하고 threshold를 넘어서면 세포는 세포사멸 관련(apoptotic) 신호전달 경로가 활성화된다. c-Jun N-terminal inhibitory kinase (JIK)는 tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)의 인산화를 증가시키고 TRAF2와 IRE1 $\alpha$ 의 결합을 증가시킨다. 또한 JIK는 IRE1 $\alpha$ 와도 결합한다고도 알려져 있다. IRE1 $\alpha$ 가 TRAF2, apoptosis signal-regulating kinase I (ASK1)과 삼량 복합체를 형성하면 ASK1과 c-Jun N-terminal kinase (JNK)를 활성화시켜 세포사멸이 유도되게 된다. 그리고 TRAF2는 procaspase12의 응집을 촉진하고, 소포체 스트레스 조건에서 아마 IRE1과 결합함으로써 procaspase12로부터 방출되는 것으로 생각되며, procaspase12가 활성화되기 위해서는 이러한 과정이 반드시 필요하다.

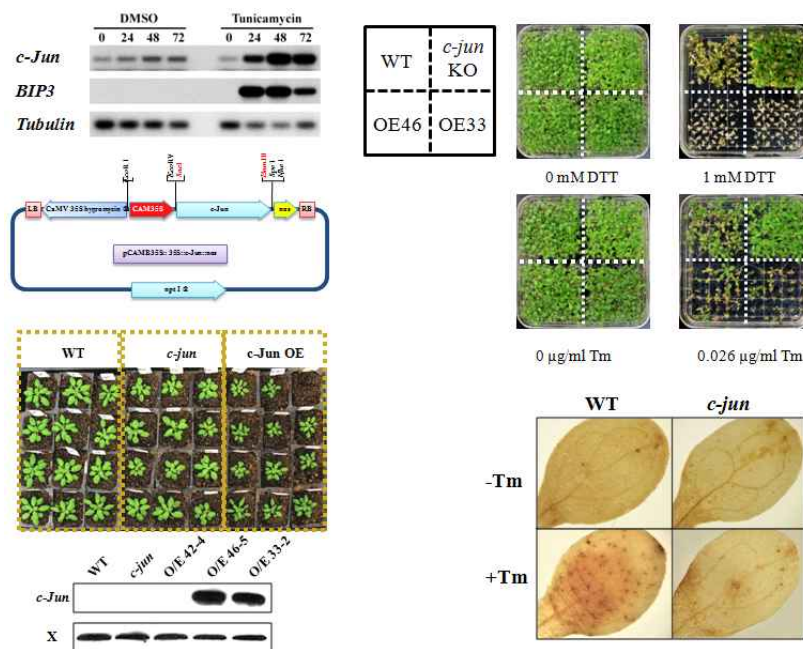


그림 34. 애기장대 c-Jun 유전자 knockout 돌연변이체(*c-jun*) 및 과발현 식물체 확립과 이를 이용한 식물체의 세포사멸 연구

본 연구에서 먼저 c-Jun이 knockout된 돌연변이체(*c-jun*)와 과발현체를 구축하였고 이들의 소포체 스트레스에 조건에서의 반응을 연구하였다. 그 결과 WT에서는 소포체 스트레스를 유발한다고 알려진 tunicamycin(TM)를 처리하게 되면 c-Jun의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, TM과 Dithiothreitol (DTT)이 처리된 배지에서 *c-jun*은 저항성을 나타내었지만, 과발현체는 WT 보다 더 민감한 표현형을 나타내었다.



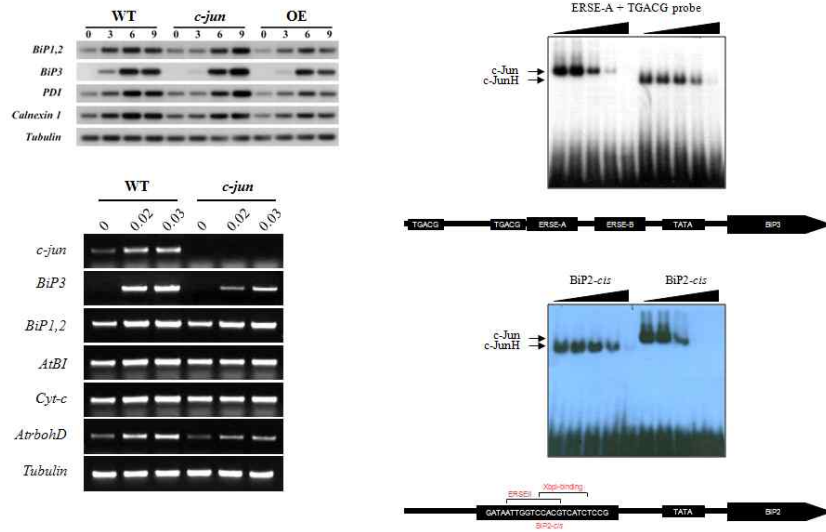


그림 35. 소포체 스트레스 조건에서 c-Jun 유전자와 관련된 소포체 샤페론 유전자 발현 분석

WT과 비교해 *c-jun*에서 세포사멸과 관련된 유전자의 발현이 감소된 것을 확인 하였고, transcription factor로 작용할 것으로 생각되는 c-Jun이 소포체 샤페론 및 ER-stress 관련 유전자들의 promoter에서 많이 발견되는 ERSE에 결합한다는 것을 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)분석을 통해 확인할 수 있었다.

다.  $\alpha$ 1,3-mannosyltransferase 유전자 knockout 돌연변이체(*alg3*)를 이용한 소포체 스트레스와 ERAD 경로에서의 기능연구

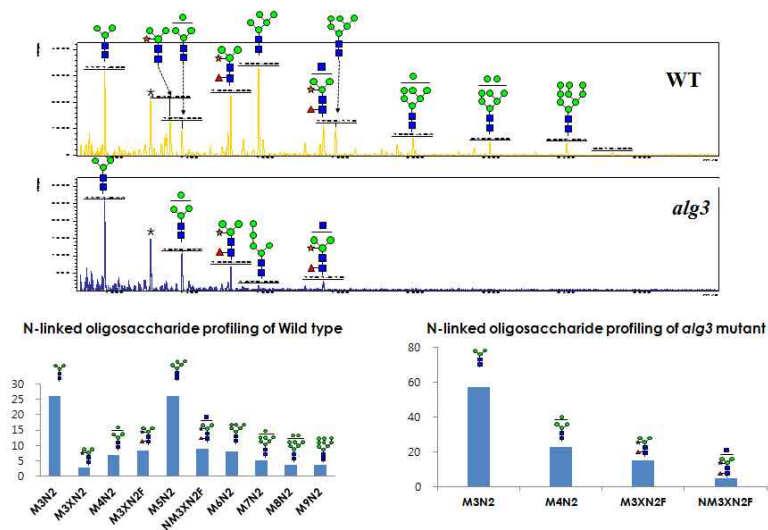
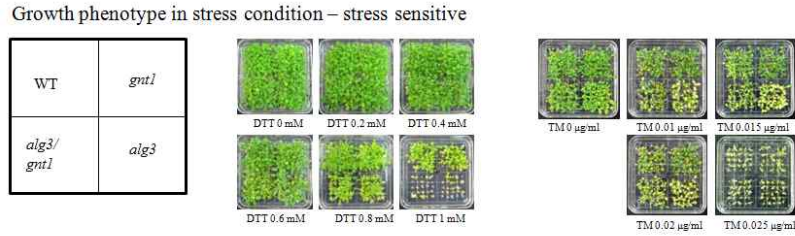


그림 36.  $\alpha$ 1,3-mannosyltransferase 유전자 knockout 돌연변이체(*alg3*)의 MALDI-TOF MS를 통한 N-glycan pattern 분석

MALDI-TOF MS를 통하여 WT과 *alg3*의 N-glycan pattern 분석한 결과 WT의 경우 일반적으로 식물에서 관찰할 수 있는 high-mannose type (M7N2, M8N2, M9N2), complex type N-glycans (M3XN2F), paucimannosidic-type 모두 확인되는 반해 *alg3* 돌연변이체의 경우 high-mannose가 사라진 M5N2와 comlex type glycan 이 확인되었다. 따라서 *alg3* 돌연변이체가 high-mannose type N-glycans를 생성하지



못하지만 complex type N-glycans은 생성할 수 있다는 것을 알 수 있다.



Unfolded protein response analysis Mutations of  $\alpha$ 1,3-mannosyltransferase (ALG3) leads to an aberrant complex glycan formation and induces ERAD

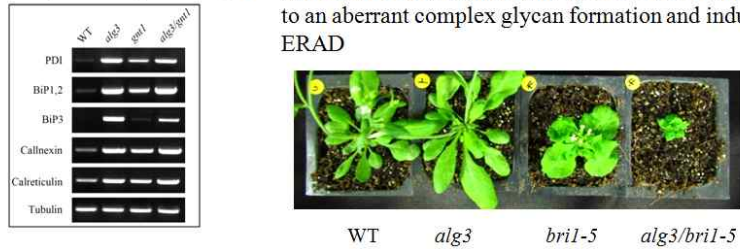


그림 37. 소포체 스트레스 상태에서 ALG3 유전자 knockout 돌연변이체(*alg3*)의 UPR(좌)과 ERAD 관련 기능 분석(우)

소포체 스트레스 조건에서 N-glycan processing에 연관된 돌연변이체에서 중요성과 특징을 알아보고자 *alg3*와 *gnt1* 그리고 *alg3gnt1* double mutant를 이용하여 소포체 스트레스를 유발하는 DTT와 TM을 처리하여 WT과 비교하였다. 돌연변이체 모두 스트레스 조건에 민감하게 반응하여 생장에 문제를 보였다. 뿐만 아니라 *alg3gnt1* double mutant의 경우 single mutant와는 달리 더욱 더 민감하게 반응하여 생장에 문제를 보였다. 스트레스의 정도가 심해 질 수록 이러한 양상이 심화되는 것을 확인 할 수 있었다. 이로써 N-glycans의 pattern이 스트레스 상태에서 단백질의 기능에 중요한 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한 이들 돌연변이체에서는 DTT와 TM을 처리하지 않았을 경우도 소포체 샤페론 유전자들의 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 식물생장호르몬인 브라시노스테로이드(brassinosteroids: BRs)에 반응하지 않는 애기장대 *bril-5*와 *bril-9* 돌연변이체는 암 조건에서 하배축(hypocotyl)의 길이가 짧고 개화가 지연되는 표현형을 나타내며 정상 성장 조건에서도 심한 왜소증을 나타내는데, 세포막에서 BRs의 수용체로 작용하는 BRI1 유전자의 Cys 69번 또는 Ser 662번 잔기가 각각 Tyr과 Phe으로 치환(*bril-5*: C69Y, *bril-9*: S662F)되어 ERAD를 유발하고 이것이 이들의 표현형과 연관되어 있다고 보고되었다. ERAD에 의해 성장저해를 나타내는 *bril-5*와의 cross 실험 결과에서 *bril-5*와 *alg3*를 교배하여 만들어진 돌연변이체의 경우 표현형이 더욱더 심화되는 것을 알 수 있다. 따라서 식물체 내에서 돌연변이에 의해 비정상적인 당쇄를 가지는 *alg3* 돌연변이체가 UPR 뿐만 아니라 ERAD도 심화시키는 것을 알 수 있다.

라. 애기장대 OS9 유전자 knockout 돌연변이체(*os9*)를 이용한 소포체 스트레스와 ERAD 경로에서의 기능 연구

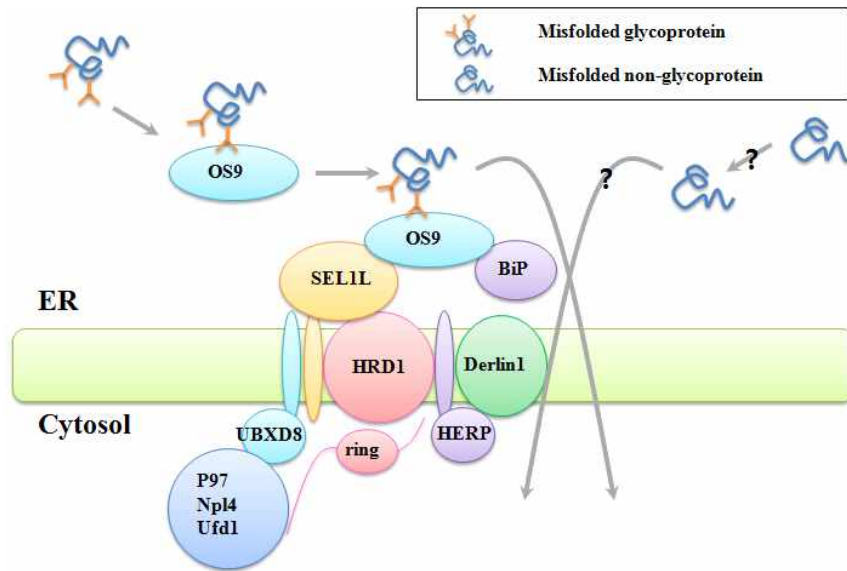


그림 38. 식물체에서 폴딩이 불안정한 당단백질의 예상 ERAD 경로

당단백질의 경우 리보솜에서 번역되어 소포체로 들어오게 되면, 미리 소포체내에서 형성된 당전구체가 당전이복합체를 통해 당단백질의 특정 부위(N-X-S/T)에 전이되게 된다. 이러한 당사슬을 통해 단백질의 폴딩 조절과 최종 목적지를 결정하게 된다. 특히, 폴딩이 불안정한 단백질이 생성될 경우 당사슬의 가공을 통해 ERAD 경로로 보내지게 된다. OS9 유전자는 동물과 효모에서 이러한 당사슬을 인지하여 ERAD 경로로 보내는 역할을 한다고 보고 되어져있지만, 식물에서는 아직 그 기능이 밝혀지지 않았다.

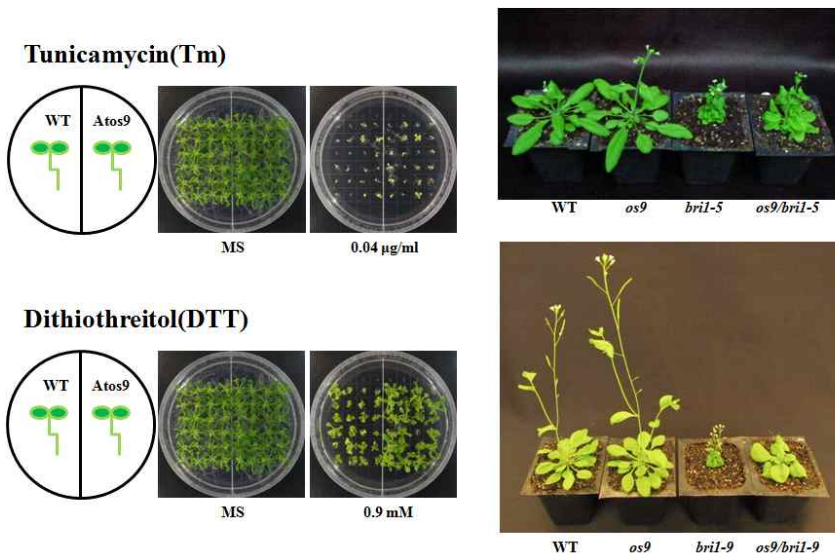


그림 39. 소포체 스트레스에서 애기장대 OS9 유전자 knockout 돌연변이체(*os9*)의 반응(좌)과 BRI1 돌연변이체들을 이용한 ERAD 경로에서 OS9 유전자의 기능연구(우)

OS9 knockout 돌연변이체의 경우 소포체 스트레스를 유발한다고 알려져 있는 TM과 DTT를 함유한 배지에서 WT 보다 강한 저항성을 나타내는 것을 확인 하였고, ERAD로 인해 정상 성장 조건에서도 심한 왜소증을 나타낸다고 알려져 있는 애기장대 *bril-5*와 *bril-9* 돌연변이체와의 교배를 통해 ERAD 경로를

일부 차단하여 표현형이 어느 정도 회복하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 OS9이 식물체에서도 ERAD에서 중요한 기능을 수행하고 있음을 알 수 있다.

마. 식물 발현 단백질 분리용 Tandem Affinity Purification (TAP) tag 개발

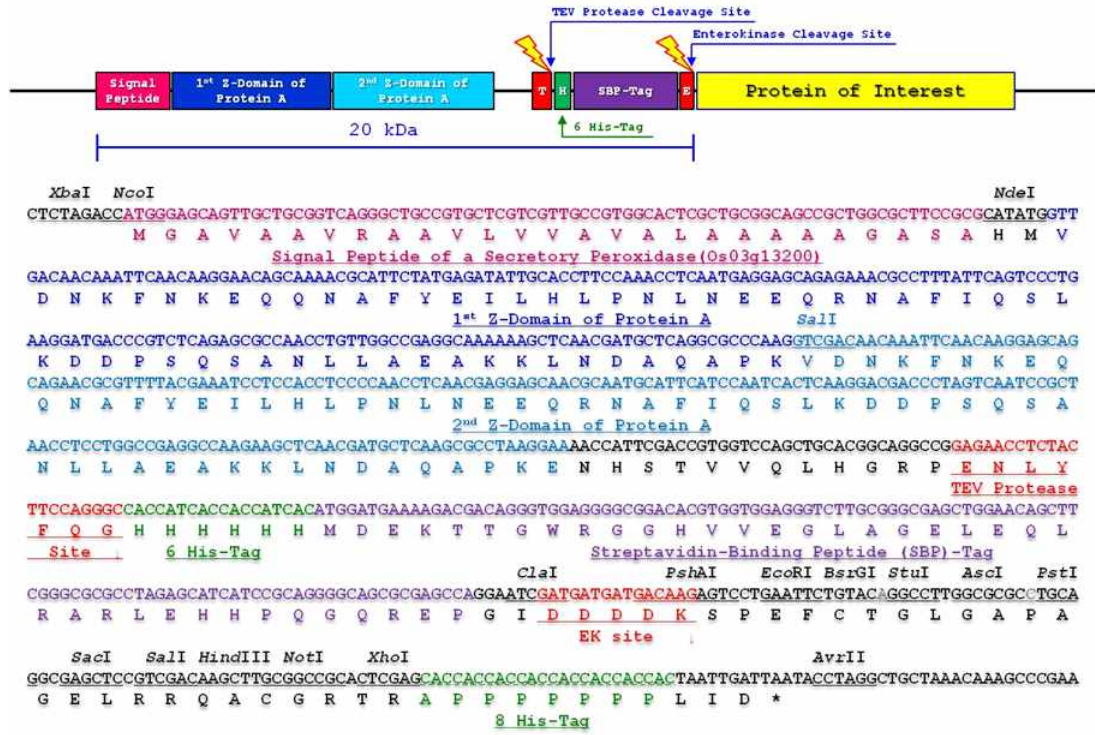


그림 40. Tandem affinity purification (TAP) tag

본 연구에서 개발된 인간화 당단백질 생산 식물체에서 발현된 단백질을 효율적으로 분리할 수 있는 tandem affinity purification (TAP) tag을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 TAP-tag는 약 20 kDa으로 2개의 protein A minimal domain, TEV protease cleavage site, streptavidin-binding peptide (SBP) 그리고 enterokinase cleavage site를 가지도록 디자인 되었고 IgG 및 anti-SBP-tag 항체와 강하게 결합하는 것을 immunoblot 분석을 통하여 확인하였다. 현재 여러 가지 target 단백질들이 개발된 TAP-tag에 fusion 되어 식물체에서 발현되고 있는 것을 확인하였고 차년도 실험을 통하여 TAP-tag이 fusion된 단백질들을 순수 분리하는 연구를 수행하고자 한다.

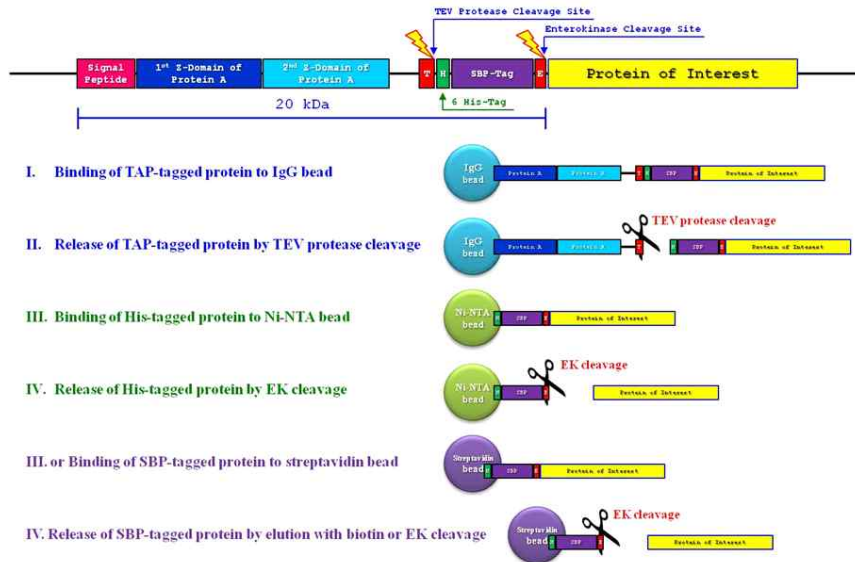


그림 41. 식물에서 생산된 TAP-tag fusion 단백질의 순수 분리 방법

본 연구에서 개발된 TAP tag을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 TAP-tag은 약 20 kDa으로 2개의 protein A minimal domain, TEV protease cleavage site, streptavidin-binding peptide (SBP) 그리고 enterokinase cleavage site를 가지고 있다. 따라서 식물에서 생산된 TAP-tag fusion 단백질을 순수 분리하기 위하여 첫 번째로 IgG bead와 protein A minimal domain의 강력한 affinity를 이용하여 TAP-tag fusion 단백질을 IgG bead에 결합시키고 washing 한 후 Tobacco Etch Virus (TEV) protease를 처리하여 6His-streptavidin-binding peptide (SBP) 와 fusion되어 있는 target 단백질을 elution 한다. 다음으로 Ni-NTA 또는 streptavidin beads에 6His-streptavidin-binding peptide (SBP) 와 fusion되어 있는 target 단백질을 결합시키고 enterokinase를 처리하여 target 단백질을 elution 할 것이다.

바. Secondary siRNA 형성에 관여하는 RNA-dependent RNA polymerase 6 기능 규명

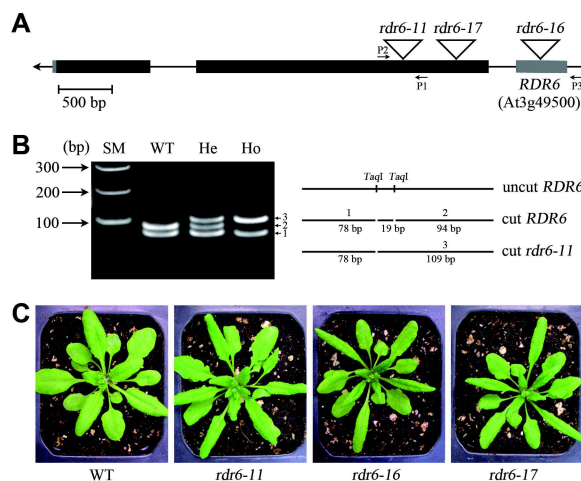


그림 42. 애기장대 *rdr6* 돌연변이체의 분리 및 동정

본 연구에서는 외래 단백질 고 발현하는 식물체를 개발하기 위하여 gene silencing에 중요한 역할을 하는 RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) 단백질이 발현되지 않는 *dr6* 돌연변이체들을 분리/동정하



여 gene silencing에서 RDR6의 역할을 규명하는 연구를 수행하였다. 분리/동정된 애기장대 *rdr6* 돌연변이체들은 야생형에 비해 조기 개화, 엽록소 고 함량, 길고 뒤집어진 잎의 표현형을 나타내고 있는 것을 관찰하였고 이는 RDR6가 식물의 발달에도 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

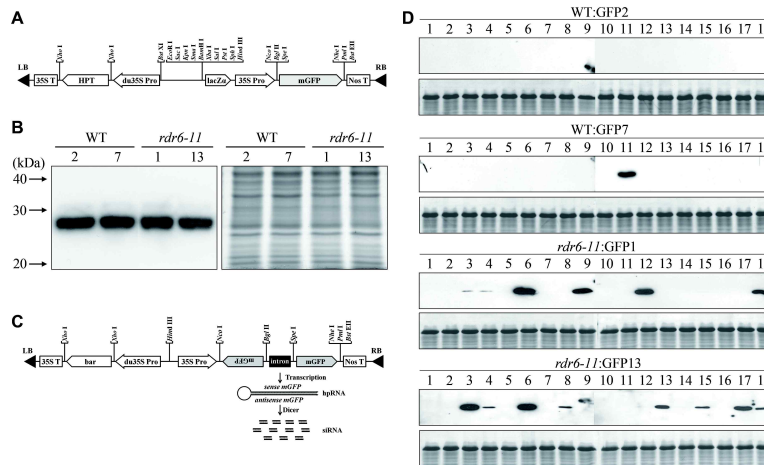


그림 43. GFP를 발현하는 애기장대 *rdr6* 돌연변이 형질전환 line 구축 및 GFP-RNAi를 이용한 GFP 유전자 발현억제

Gene silencing에서 RDR6의 역할을 규명하기 위하여 GFP를 발현하는 애기장대 *rdr6* 돌연변이 형질전환 line 구축하고 GFP-RNAi를 이용하여 GFP 유전자 발현을 억제하였더니 WT에서는 거의 모든 lines이 GFP-RNAi에 의해서 GFP 유전자 발현이 억제된 반면 *rdr6* 돌연변이체에서는 많은 line에서 GFP 발현이 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 RDR6가 없을 때 GFP-RNAi를 이용한 GFP 유전자 발현억제가 효율적으로 일어나지 않는다는 것을 보여주고 *rdr6* 돌연변이체가 gene silencing에 의한 단백질 발현억제를 해결하는데 이용될 수 있다는 증거를 제시해 준다.

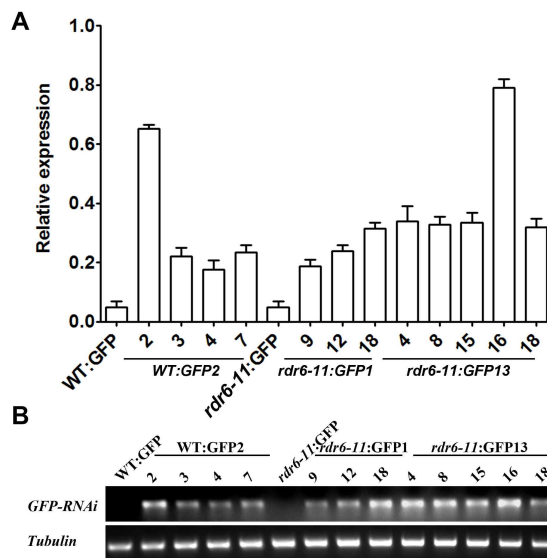


그림 44. (A) Quantitative real-time PCR과 (B) semi-quantitative RT-PCR을 통한 GFP-RNAi 발현 분석

Quantitative real-time PCR과 semi-quantitative RT-PCR을 통한 GFP-RNAi 발현을 분석한 결과 WT에서는 GFP-RNAi의 발현이 낮아도 GFP 유전자 발현억제가 효율적으로 일어났지만 *rdr6* 돌연변이체에서는

GFP-RNAi의 발현이 낮으면 GFP 유전자 발현억제가 효율적으로 일어나지 않는다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 다시 한번 RDR6가 없을 때 GFP-RNAi를 이용한 GFP 유전자 발현억제가 효율적으로 일어나지 않는다는 것을 보여주고 *rdr6* 돌연변이체가 gene silencing에 의한 단백질 발현억제를 해결하는데 이용될 수 있다는 증거를 제시해 준다.

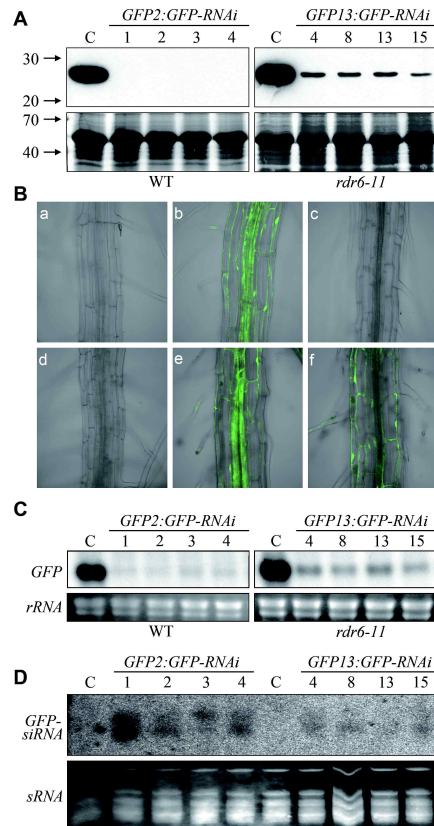


그림 45. WT과 *rdr6* 돌연변이체에서 gene silencing 효율 비교

(A) Immunoblot 분석 (B) Confocal microscopy 분석 (C) Northern blot 분석 (D) GFP-siRNA

Northern blot 분석을 통하여 WT에서는 GFP-RNAi를 이용한 GFP 유전자 발현억제가 효율적으로 일어나는 반면 RDR6가 없을 때 GFP-RNAi를 이용한 GFP 유전자 발현억제가 효율적으로 일어나지 않는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 볼 때 *rdr6* 돌연변이체는 gene silencing에 의한 단백질 발현억제를 해결하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 RNAi-induced gene silencing에서 RDR6는 secondary siRNA 형성에 중요한 역할을 함으로써 식물의 gene silencing에서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.



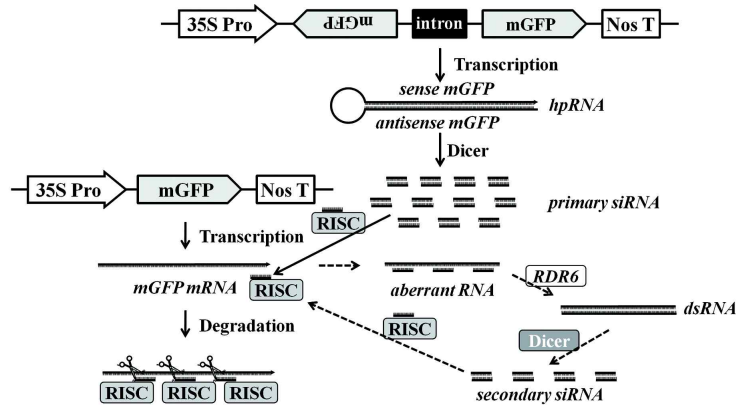


그림 46. RNAi-induced gene silencing에서 RDR6의 작용 기전

사. 식물 특이적인 엔-당화 효소가 제거된 돌연변이 교배집단 구축

현재의 고부가가치 바이오의약품은 주로 Chinese hamster ovary (CHO) 세포와 같은 동물세포 배양을 통해 생산되어 왔으나 까다로운 세포주 개발, 고가의 생산비용, 바이러스와 같은 병원균의 오염 가능성과 같은 문제점이 제기되고 있다. 따라서 보다 저렴하고 안전한 대체 생산 시스템의 개발이 요구되는 실정이다. 식물 세포는 고등 진핵세포로서 소포체와 골지체에서 일어나는 단백질 수식이 동물세포와 아주 유사하여 인체 유래 단백질 생산에 적합하고, 생산비용이 저렴하며 생산규모의 조절이 용이하다. 또한 동물 바이러스와 같은 병원균의 오염으로부터 안전한 장점을 가지고 있어 바이오의약품을 생산하는 기존의 동물세포 시스템을 대체할 수 있는 시스템으로 급부상하고 있다. 하지만 식물체를 이용한 바이오의약품 생산기술이 상용화되어 바이오의약품의 경제적 대중화를 실현하기 위해서는 인체 사용 시 면역반응이 유발되는  $\alpha$  1,3-fucose와  $\beta$  1,2-xylose 등을 포함하는 식물 특이적인 당 잔기를 제거하고 바이오의약품 종류에 따라 특이적으로 요구되는 맞춤형 엔-글라이칸을 생산할 수 있는 발현시스템을 개발하는 것이 절실히 요구 되고 있다.

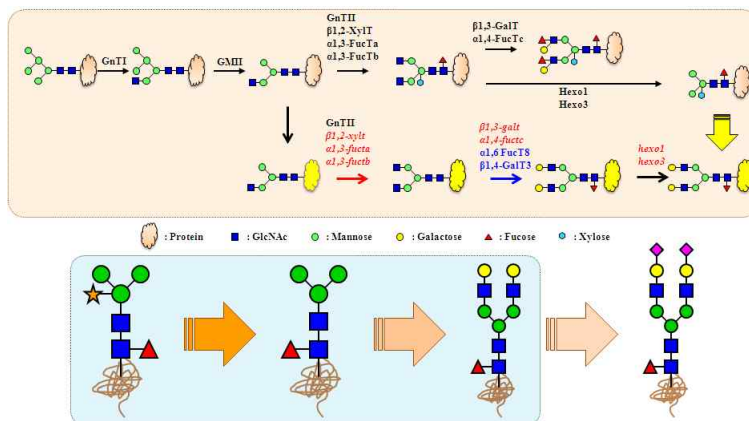


그림 47. 식물 내 엔-글라이칸 처리 과정과 인간화된 엔-글라이칸을 생산하기 위한 유전학적 접근방법 모식도

본 연구에서는 이러한 문제를 해결하고자 식물체 내 엔-당화 경로를 유전학적인 방법으로 리모델링하여 인간화 또는 맞춤화하는 하는 연구를 수행하였다. 식물의 엔-당화 경로 관련 효

소로는 Core mannose 잔기 말단에 GlcNAc 잔기를 붙여주는  $\beta$  1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI),  $\beta$  1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II (GnTII), 식물 특이적인 엔-당화 잔기를 붙여주는 효소인  $\alpha$  1,3-fucosyltransferases (FucTa, FucTb),  $\beta$  1,2-xylosyltransferase (XylT), Lewis a 항체 결합 부위를 만드는  $\alpha$  1,4-fucosyltransferase (FucTc)와  $\beta$  1,3-galactosyltransferase (GalT) 그리고 말단의 GlcNAc 잔기를 자르는 N-acetylglucosaminidaseI (Hexo1), N-acetylglucosaminidaseII (Hexo2), N-acetylglucosaminidaseIII (Hexo3)가 있고 본 연구에서는 T-DNA 삽입 등에 의해 이들의 활성이 완전히 제거된 돌연변이체를 동정하였다(표 4).

표 4. 확보된 엔-글라이칸 처리 관련 애기장대 돌연변이체 현황

No	Associated enzyme	State	Note
1	Beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)	Homo	T-DNA
		Homo	EMS
2	Beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II (GnTII)	Homo	T-DNA
3	Beta1,2-xylosyltransferase (XylT)	Homo	T-DNA
		Homo	T-DNA
4	Alpha1,3-fucosyltransferaseI (FucTa)	Homo	T-DNA
5	Alpha1,3-fucosyltransferaseII (FucTb)	Homo	T-DNA
		Homo	T-DNA
6	Alpha1,4-fucosyltransferase (FucTc)	Homo	T-DNA
7	Beta1,3-galactosyltransferase (GalT)	Homo	T-DNA
8	N-acetylglucosaminidaseI (Hexo1)	Homo	T-DNA
9	N-acetylglucosaminidaseII (Hexo2)	Homo	T-DNA
10	N-acetylglucosaminidaseIII (Hexo3)	Homo	T-DNA

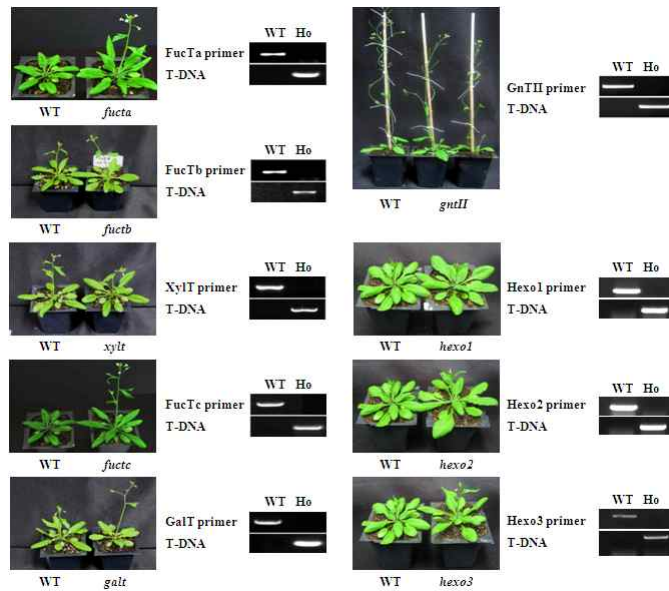


그림 48. 선별된 엔-글라이칸 처리 관련 애기장대 단일 돌연변이체

다중 돌연변이체 구축: 다음 단계에서는 앞선 선별과정을 거쳐 동정된 단일 돌연변이체 중 골지체에서 식물 특이적인 엔-글라이칸 구조 합성에 관련된 효소인 FucTa, FucTb, XylT, FucTc, GalT 유전자가 knockout된 단일 돌연변이체들(*fucta*, *fuctb*, *fuctc*, *xylt*, *galt*)을 교배하여 이들 유전자가 같이 제거된 이중 돌연변이체 구축하였고 이들 돌연변이 유전자의

homozygosity를 PCR을 통하여 확인하였다(표 5).

표 5. 엔-당화 관련 애기장대 돌연변이들의 교배 및 다중 돌연변이체 확보 현황

No	Multiple mutant	State	No	Multiple mutant	State
1	<i>fucta fuctb</i>	Homo	12	<i>fucta fuctb xylyt</i>	Homo
2	<i>fucta fuctc</i>	Homo	13	<i>fucta fuctb xylyt fuctc</i>	Homo
3	<i>fuctb fuctc</i>	Homo	14	<i>fucta fuctb xylyt fuctc</i>	Homo
4	<i>fuctb galt</i>	Homo	15	<i>fucta fuctb xylyt fuctc galt</i>	Homo
5	<i>xylyt fuctc</i>	Homo	16	<i>fucta fuctb xylyt fuctc galt</i>	Homo
6	<i>fucta xylyt</i>	Homo	17	<i>fucta fuctb xylyt fuctc galt hexo1</i>	Homo
7	<i>fucta galt</i>	Homo	18	<i>fucta fuctb xylyt fuctc galt hexo1</i>	Homo
8	<i>fuctb xylyt</i>	Homo	19	<i>fucta fuctb xylyt fuctc galt hexo1 hexo3</i>	(6 homo 1 hetero)
9	<i>fuctc galt</i>	Homo	20	<i>fucta fuctb xylyt fuctc galt hexo1 hexo3</i>	(6 homo 1 hetero)
10	<i>galt xylyt</i>	Homo	21	<i>hexo1 hexo3</i>	Homo
11	<i>fucta fuctb xylyt</i>	Homo	22	<i>fucta fuctb xylyt gntII</i>	Homo

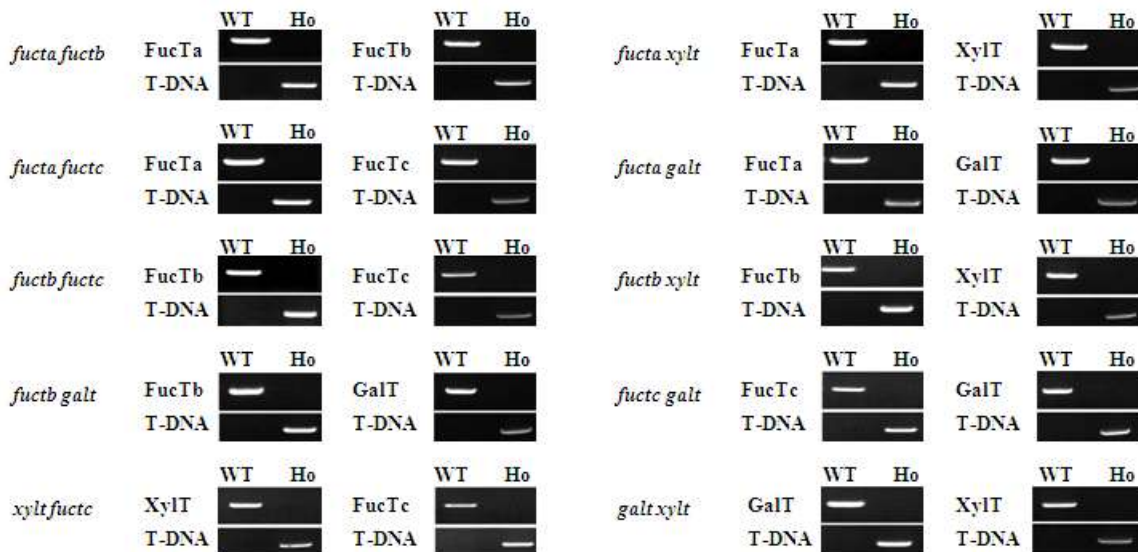


그림 49. PCR을 이용한 엔-글라이칸 처리 관련 애기장대 이중 돌연변이체 선별

완성된 이중 돌연변이체를 다시 교배하여 3중(*fucta fuctb xylyt*) 그리고 4중(*fucta fuctb xylyt fuctc*) 돌연변이체를 완성하였다(표 2., 그림 3.). 완성된 식물체에서 식물 특이적인 글라이칸 구조가 없어졌는지 확인하기 위하여 immunoblotting과 lectin blotting을 수행하였다. 식물 특이적인 복합형 글라이칸(complex glycan) 구조를 인지하는 anti-HRP를 처리한 결과 *fucta xylyt*, *fuctb xylyt*와 같은 이중 돌연변이에서는 야생형(WT)과 비교해서 약하지만 면역 반응을 나타낸다. 하지만 3중(*fucta fuctb xylyt*), 4중(*fucta fuctb xylyt fuctc*) 돌연변이 식물체에서는 면역 반응이 전혀 나타나지 않는 것을 통해 식물 특이적인 엔-글라이칸 구조가 생성하지 못하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 anti-fucose와 anti-xylose의 처리를 통해 다시 한 번 확인할 수 있었다. 또한 말단의 mannose 잔기를 인지하는 Concanavalin A (ConA) 렉틴은 야생형과 비교했을 때 렌틴 반응이 조금씩 증가된 패턴을 확인함으로써 이들 식물체에서 high-mannose 형 엔-글라이칸 구조가 증가되었음을 알 수 있었다.

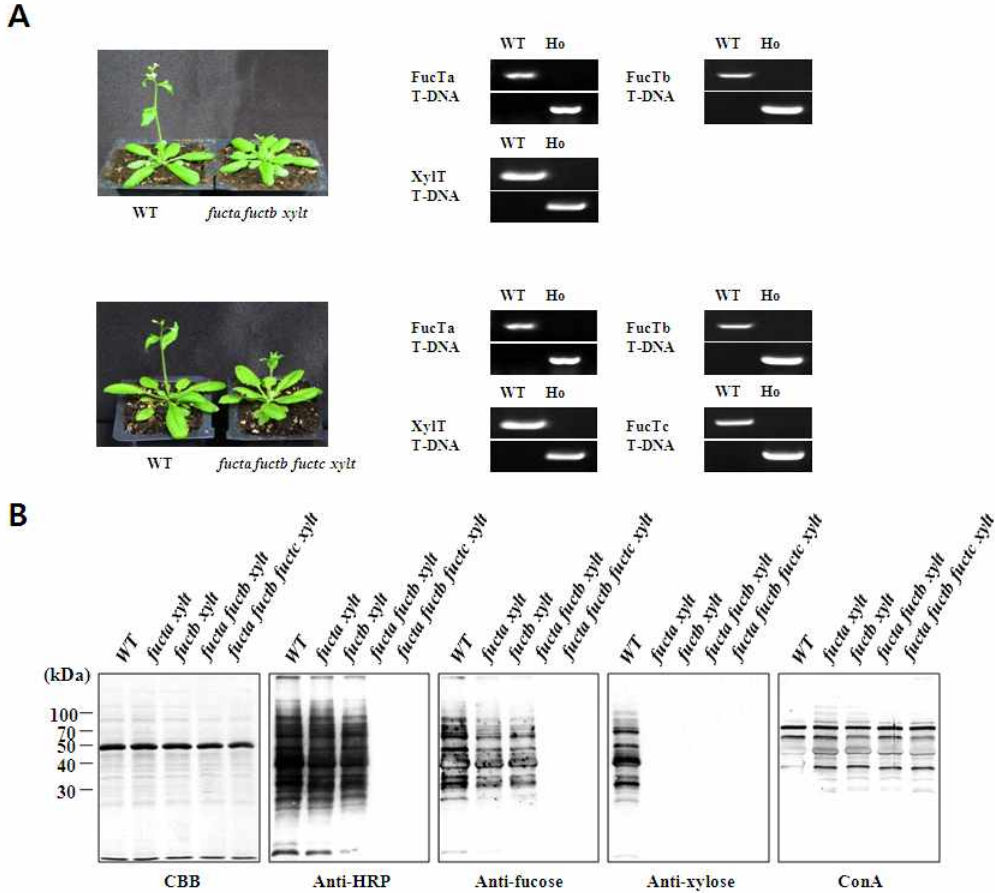
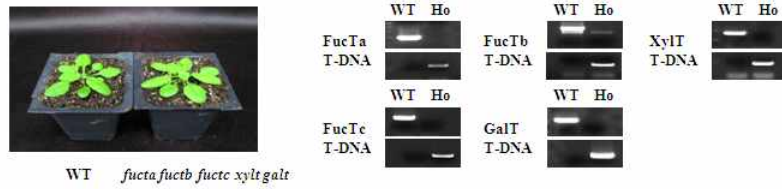


그림 50. PCR을 이용한 엔-글라이칸 처리 관련 애기장대 3중(*fucta fuctb xylt*), 4중(*fucta fuctb xylt fuctc*) 돌연변이체 선별(A) 및 항체와 렉틴을 이용한 엔-글라이칸 패턴 분석(B)

이어지는 돌연변이체의 교배를 통해 5중 돌연변이체(*fucta fuctb fuctc xylt galt*)를 완성하였고 이들 돌연변이 유전자의 homozygosity를 PCR을 통하여 확인하였다(그림 5). Immunoblotting과 lectin blotting을 이용하여 엔-글라이칸의 패턴을 분석한 결과 3중, 4중 돌연변이 식물체와 마찬가지로 5중 돌연변이체도  $\alpha$ 1,3-fucose와  $\beta$ 1,2-xylose 잔기를 포함하는 식물 특이적인 복합형 엔-글라이칸 구조가 생성되지 않아 anti-HRP 반응이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 말단의 mannose 잔기를 인지하는 ConA의 신호는 야생형과 비교하여 증가한 것이 확인되었다. 이러한 결과는 3중, 4중 돌연변이 식물체와 마찬가지로 5중 돌연변이체도 식물 특이적인 paucimannose 형 엔-글라이칸 구조를 합성하지 않고, high-mannose 형 엔-글라이칸 구조를 더 효율적으로 합성하고 있음을 보여준다.

**A**



**B**

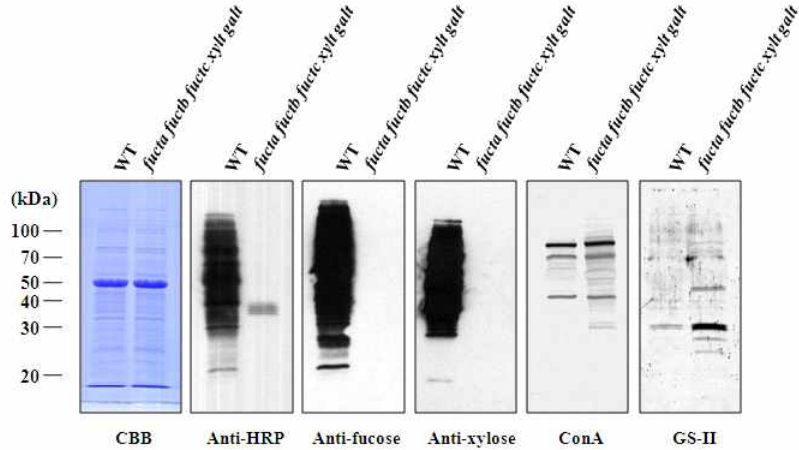


그림 51. 중합효소 연쇄반응을 이용한 엔-글라이칸 처리 관련 애기장대 5중 돌연변이체(*fucta fuctb fuctc xyli gal*) 선별(A) 및 항체와 렉틴을 이용한 엔-글라이칸 패턴 분석(B)

최근 연구 결과에 따르면 식물의 액포나 원형질막에서 N-acetylglucosaminidaseI (Hexo1), N-acetylglucosaminidaseIII (Hexo3)의 활성에 의해 말단의 GlcNAc잔기가 잘려져 core mannosyl 잔기를 가진 paucimannose 형태의 복합형 엔-글라이칸이 형성된다고 알려져 있다. 이러한 결과는 이들 hexosaminidase의 활성이 포유동물에서 발견되는  $\beta$ 1,4-galactose 그리고  $\alpha$ 2,3- 또는  $\alpha$ 2,6-sialic acid 잔기가 연장된 형태의 복합형 엔-글라이칸 구조를 완성하는데 있어서 큰 장애요인으로 작용할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 엔-글라이칸의 non-reducing hexosamin 잔기를 제거하는데 관여하는 효소인 N-acetylglucosaminidaseI (Hexo1), N-acetylglucosaminidaseIII (Hexo3)의 활성이 제거된 *hexo1*과 *hexo3* 단일 돌연변이체를 각각 동정하였고 이들을 교배하여 이중 돌연변이체를 구축하였다. 구축된 돌연변이체를 immunoblotting과 lectin blotting을 통해 엔-글라이칸 구조를 분석한 결과 이중 돌연변이체 (*hexo1 hexo3*)는 야생형과 비교했을 때 식물 특이적인 복합형 엔-글라이칸을 인지하는 anti-HRP에 대하여 낮은 반응성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 말단의 GlcNAc 잔기를 인지하는 GS-II 렉틴으로 lectin blotting을 수행하였을 때 을 처리했을 때 이중 돌연변이체 (*hexo1 hexo3*)는 야생형에 비해 증가된 반응성을 나타내는 것을 통해 이들 효소가 복합형 엔-글라이칸을 형성하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다(그림 6). 하지만 이중 돌연변이체(*hexo1 hexo3*)의 ConA 대한 반응성은 야생형과 비교하여 크게 변하지 않았음을 알 수 있었다.



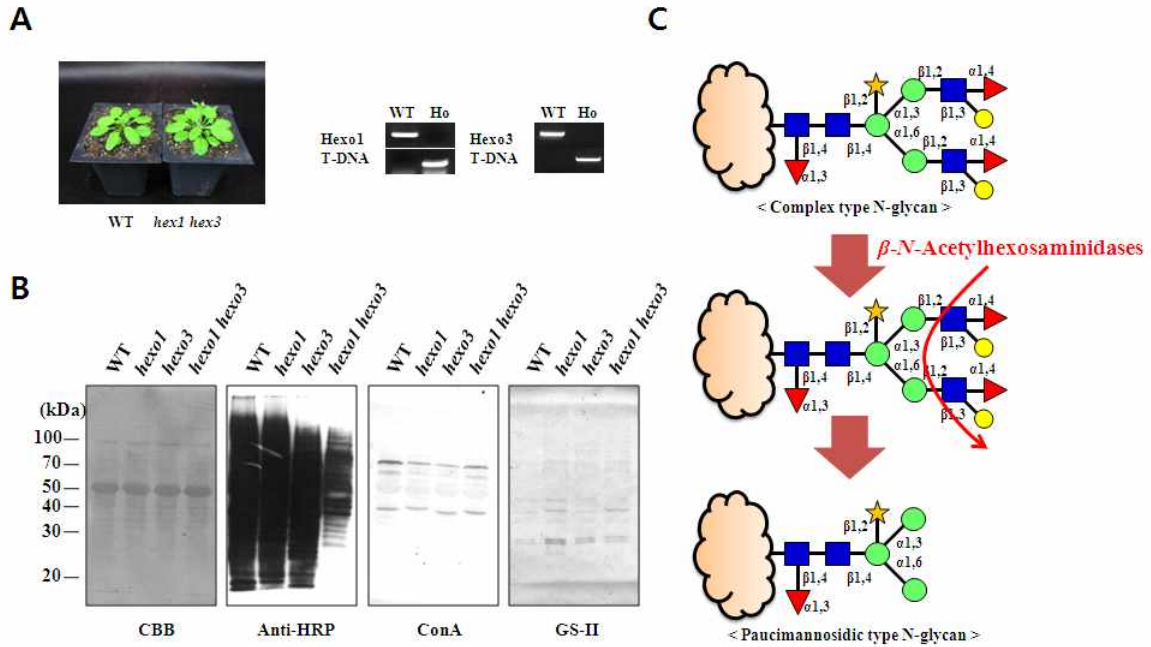


그림 52. PCR을 이용한 엔-글라이칸 처리 관련 애기장대 이중 돌연변이체(*hexo1 hexo3*) 선별 (A), 항체와 렉틴을 이용한 엔-글라이칸 패턴 분석(B) 및 엔-글라이칸 처리 모식도(C)

아. 맞춤형 엔-글라이칸 생산 식물체를 이용한 고세병 치료 효소인 glucocerebrosidase (GC)를 생산

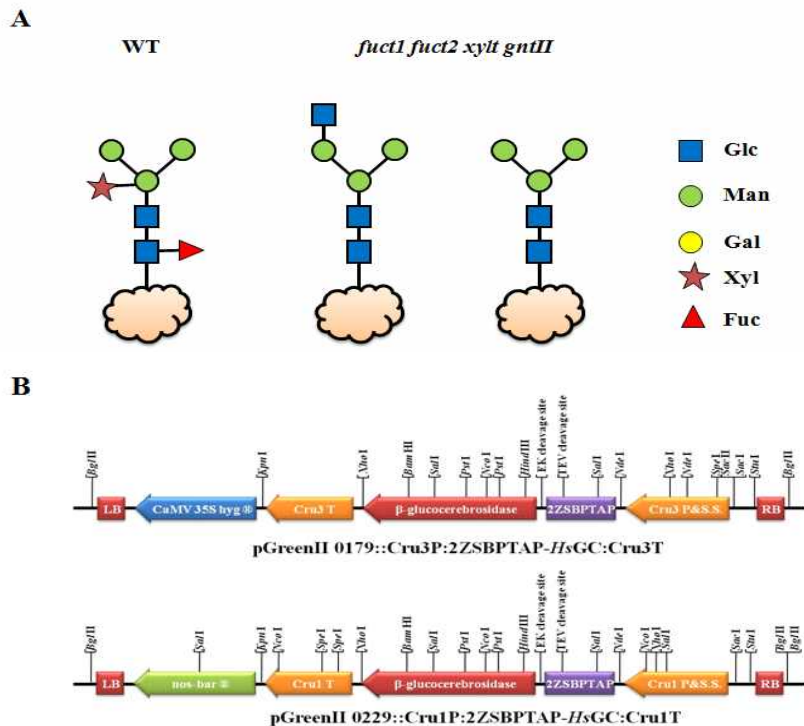


그림 53. 식물 특이적 당쇄가 제거된 N-glycan (A) 과 TAP-tagged glucocerebrosidase 재조합 유전자 (B) 모식도

본 연구에서는 고세병 치료제로 사용되는 glucocerebrosidase를 본 연구에서 개발된 맞춤형 엔-글라이칸 생산 식물체에서 효율적으로 발현시키고 분리하기 위하여 본 연구에서 개발된 tandem affinity



purification (TAP) tag에 glucocerebrosidase가 fusion되어 발현 될 수 있는 재조합 유전자를 구축하였다. 특히 본 연구에서는 서열이 다른 Cruciferin 3 와 Cruciferin 1의 promoter와 terminator를 사용한 두 종류의 glucocerebrosidase 발현 재조합 유전자를 구축하였는데 이는 서열이 같은 promoter와 terminator를 가진 재조합 유전자가 여러 copy로 식물에 도입되었을 때 생기는 유전자 침묵 현상을 피하면서 재조합 유전자의 copy 수를 늘려 glucocerebrosidase의 발현을 증가시키기 위해서이다. 완성된 Cruciferin 3의 promoter와 terminator를 가지는 재조합 유전자를 Agrobacterium을 통해 야생형(WT)과 식물 특이적 당이 제거된 두 종류의 3중 돌연변이(*fuct1 fuct2 xy1t<sup>bar</sup>*, *fuct1 fuct2 xy1t*)와 1종의 4중 돌연변이(*fuct1 fuct2 xy1t gntII*) 애기장대에 도입한 후 항생제 선별법을 통해 형질전환식물체를 선별함으로써  $\alpha$ 1,3-fucose,  $\beta$ 1,2-xylose와 같은 식물 특이적 당이 없는 pauci-mannose type N-glycan 구조를 가진 glucocerebrosidase를 생산하는 애기장대를 구축하였다.

형질 전환된 애기 장대에서 glucocerebrosidase가 발현되는지 확인하기 위하여 T2 seeds (heterozygote)에서 단백질을 추출하여 anti-glucocerebrosidase 항체로 immunoblotting 분석을 수행하였다. 형질 전환되지 않은 WT에서는 glucocerebrosidase가 발현되지 않았지만 형질 전환된 여러 WT과 3중, 4중 돌연변이 애기장대 lines에서는 glucocerebrosidase가 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

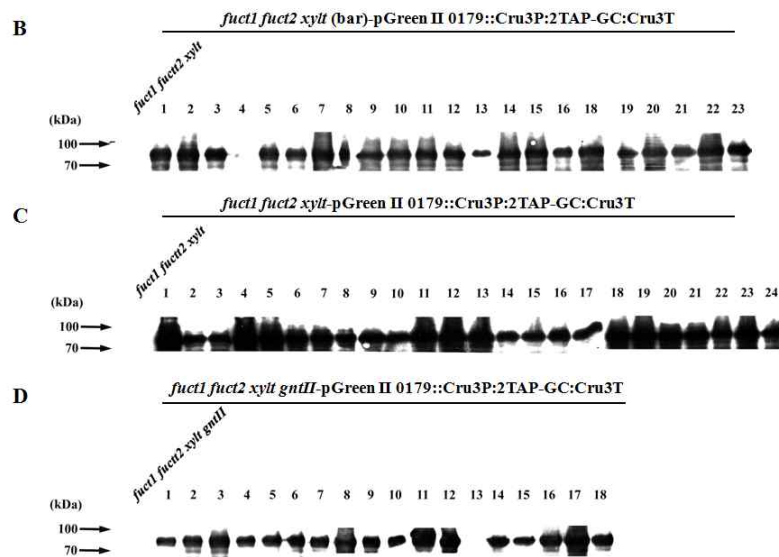


그림 54. T2 heterozygote seeds에서의 glucocerebrosidase 발현 확인

T2 seeds (heterozygote)에서 실시한 immunoblotting 결과를 바탕으로 발현율이 높은 lines을 선정하였고 항생제 선별법을 통해 이들의 homozygote 형질 전환 식물체를 선별하였다. T3 seeds (homozygote)를 확보한 후 다시 항생제 선별법을 이용하여 이들의 homozygosity를 검정하였다. 검정된 homozygote lines의 씨앗에서 발현되는 glucocerebrosidase의 발현 정도를 anti-glucocerebrosidase 항체와 anti-SBP 항체를 이용한 immunoblotting 분석immunoblotting을 통해 확인하였다.

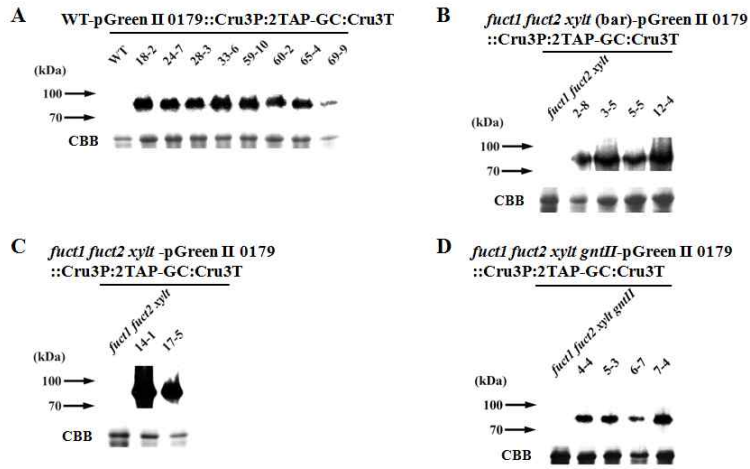


그림 55. T3 homozygote seeds에서의 glucocerebrosidase 발현 비교

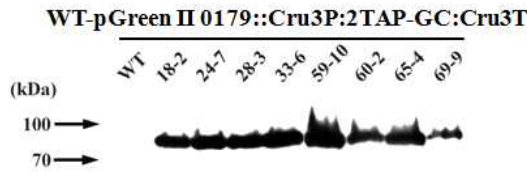


그림 56. SBP 항체를 이용한 glucocerebrosidase 발현 비교

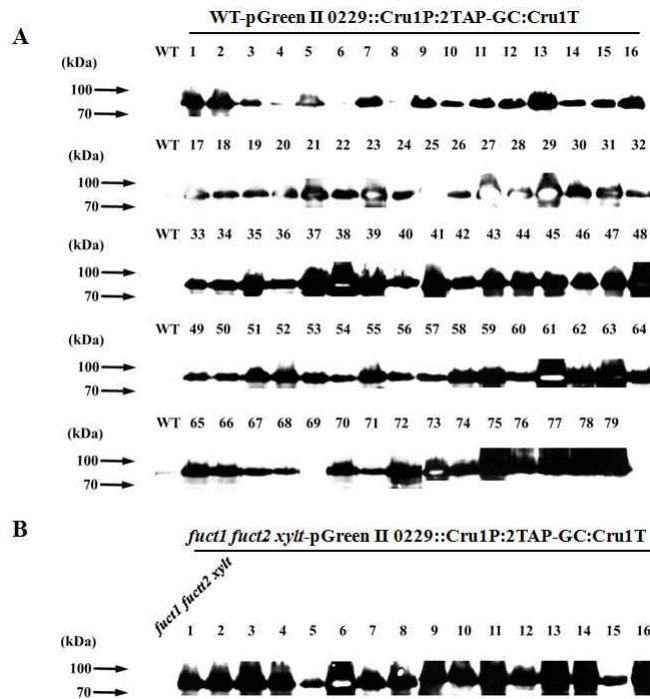


그림 57. T2 homozygote seeds에서 glucocerebrosidase 발현 확인

다음으로 Cruciferin 1의 promoter와 terminator를 가지는 재조합 유전자를 이용하여 형질 전환 식물체를 구축하였으며 glucocerebrosidase가 발현되는지 확인하기 위하여 T2 seeds (heterozygote)에서 단백질을 추출하여 anti-glucocerebrosidase 항체로 immunoblotting 분석을 수행하였다. 여러 line의 형질 전환된

WT 과 3중 돌연변이체(*fuct1 fuct2 xylt*)에서 glucocerebrosidase의 발현이 확인되었다. T2 seeds (heterozygote)에서 실시한 immunoblotting 결과를 바탕으로 발현율이 높은 lines을 선정하였고 항생제 선별법을 통해 이들의 homozygote 형질 전환 식물체를 선별하였다. T3 seeds (homozygote)를 확보한 후 다시 항생제 선별법을 이용하여 이들의 homozygosity를 검정하였고, 검정된 homozygote lines의 씨앗에서 발현되는 glucocerebrosidase의 발현 정도를 anti-glucocerebrosidase 항체를 이용한 immunoblotting 분석을 통해 확인하였다.

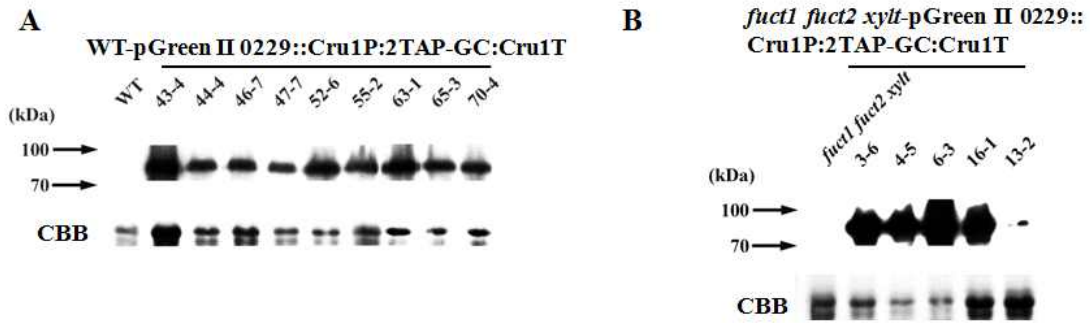


그림 58. T3 homozygote seeds에서 glucocerebrosidase 발현 확인

본 연구에서 구축된 식물 특이적인  $\alpha$  1,3-fucose와  $\beta$  1,2-xylose 잔기가 엔-글라이칸을 생산하는 애기장대에서 발현된 glucocerebrosidase는 paucimannose 형 N-glycan 구조를 glycosidases 처리 공정 없이 세포 내에서 바로 생산할 수 있어서 고가의 고세병 치료제 생산 비용을 현저히 줄일 수 있는 혁신적인 기술이다.

자. Peptide-N-glycosidase A(PNGaseA)를 생산 형질전환 식물체 개발

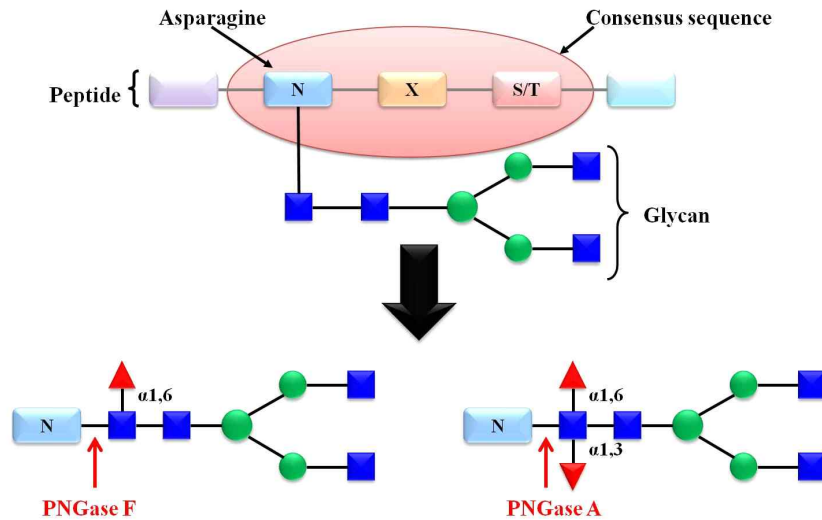


그림 59. PNGase A와 PNGase F의 기질 특이성

바이오의약품은 유전자 재조합 및 세포 배양과 같은 생명공학 기술로 생산되는 생물유래의 질병 예방 및 치료용 고분자 의약품을 말하며, 탁월한 치료 효능과 현저히 줄어든 부작용으로 의약품 시장에서의 시장규모는 2010년 1,080억 달러, 2011년에는 1,129억 달러였으며, 연간 10%가 넘는 성장세를 보이고 있

다. 2020년에는 약 2,600억 달러에 도달할 것으로 예측되며, 그 중 약 70% 이상을 당단백질이 차지하여 약 200조원(2,000억불)의 시장을 형성할 것으로 예상되고 있다(La Meries SL). 이와 같이, 전 세계 의약품 시장에서 바이오의약품 비중이 급증하고 있는 가운데, 그 활성, 치료 효능, 체내 안정성, 조직 분포 및 면역반응 등을 결정하는 핵심인자인 단백질 내 당사슬의 구조와 종류를 정밀하게 분석하고 제어하는 기술 개발이 요구된다. 당사슬을 당단백질로부터 분리할 때 일반적으로 사용하는 당사슬 절단 효소인 peptide-N-glycosidase (PNGase) F로는 식물 특이적인  $\alpha$  1,3-fucose가 부가된 당사슬을 절단하지 못하므로 식물체 유래의 당단백질의 당사슬 분석을 위해서는 아몬드 유래의 PNGase A를 사용해서 당사슬을 절단하는 방법이 이용되고 있다.

본 연구는 식물유래 당단백질 분석에 이용되는 PNGase A를 애기장대에서 생산하기 위해 본 연구에서 개발된 tandem affinity purification (TAP) tag에 PNGase A가 fusion되어 발현 될 수 있는 재조합 유전자를 구축하였다 (그림 2). 특히 본 연구에서는 서열이 다른 Cruciferin 3 와 Cruciferin 1의 promoter와 terminator를 사용한 두 종류의 glucocerebrosidase 발현 재조합 유전자를 구축하였는데 이는 서열이 같은 promoter와 terminator를 가진 재조합 유전자가 여러 copy로 식물에 도입되었을 때 생기는 유전자 침묵 현상을 피하면서 재조합 유전자의 copy 수를 늘려 PNGase A의 발현을 증가시키기 위해서이다. 완성된 재조합 플라스미드는 Agrobacterium을 통해 야생형 애기장대(WT)에 형질전환 시킨 후 항생제 선별법을 통해 형질전환 식물체를 선별하였다. 선별된 형질 전환 식물체는 anti-SBP 항체를 이용하여 immunoblotting 분석을 수행한 결과 PNGaseA가 발현되는 애기장대 lines을 선별할 수 있었다.

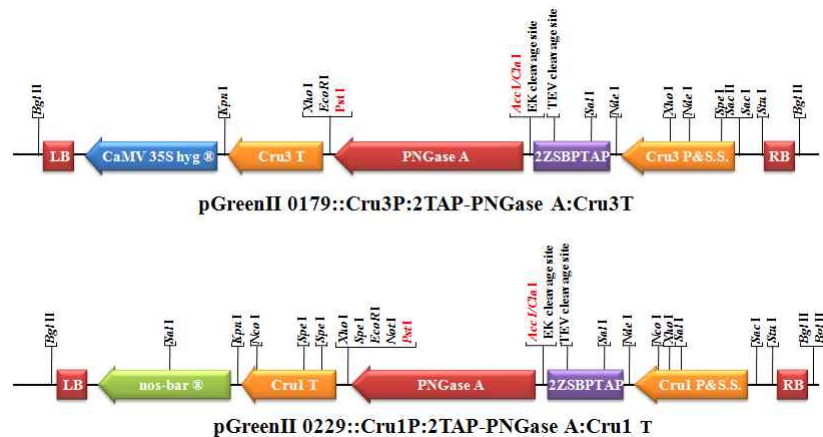


그림 60. PNGaseA발현 재조합 유전자 construct의 모식도

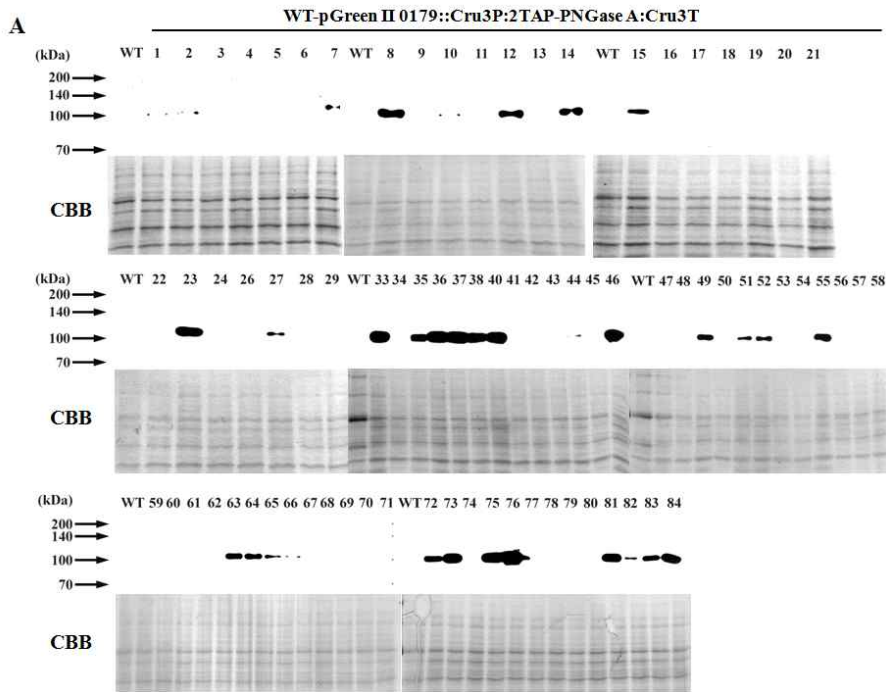


그림 61. 형질전환 T2 seeds (heterozygote)에서의 PNGase A 발현 확인

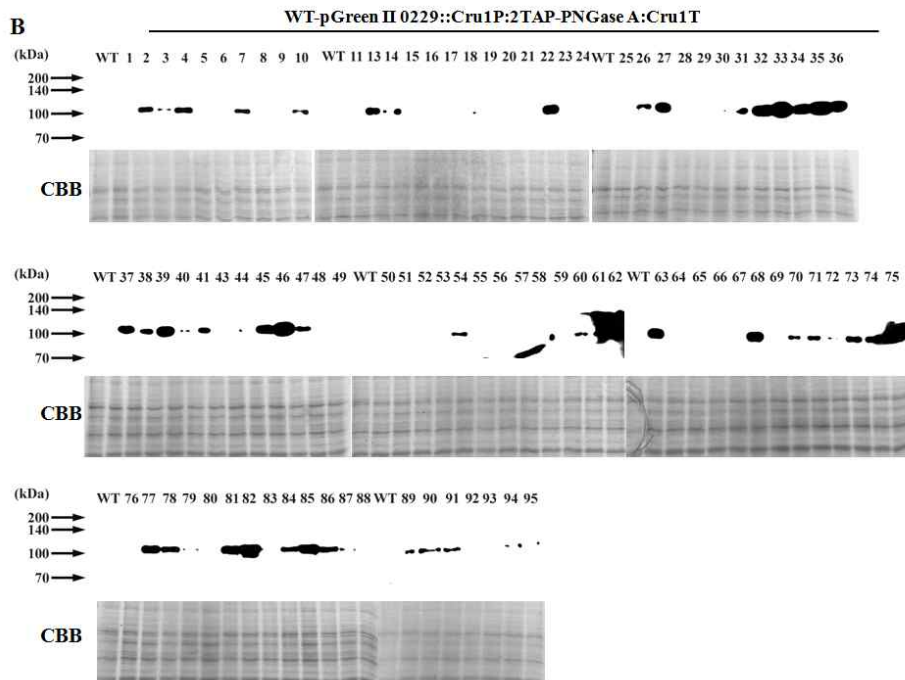


그림 62. 형질전환 T2 seeds (heterozygote)에서의 PNGase A 발현 확인

T2 seeds (heterozygote)에서 실시한 immunoblotting 결과를 바탕으로 PNGaseA의 발현율이 높은 lines 을 선정하였고 항생제 선별법을 통해 이들의 homozygote 형질 전환 식물체를 선별하였다. T3 seeds (homozygote)를 확보한 후 다시 항생제 선별법을 이용하여 이들의 homozygosity를 검정하였다. 검정된 homozygote lines의 씨앗에서 발현되는 PNGaseA의 발현 정도를 anti-SBP 항체를 이용한 immunoblotting 분석immunoblotting을 통해 확인하였다(그림 5). 발현률이 가장 높은 line을 선별하고 이후 TAP-tagged 단백질의 순수 분리 방법을 이용하여 PNGase A를 순수 분리할 것이다 (그림 1). 분리된 PNGase A 활성을

현재 상용화되어 있는 아몬드의 PNGase A와 비교하여 분석하고자 한다.

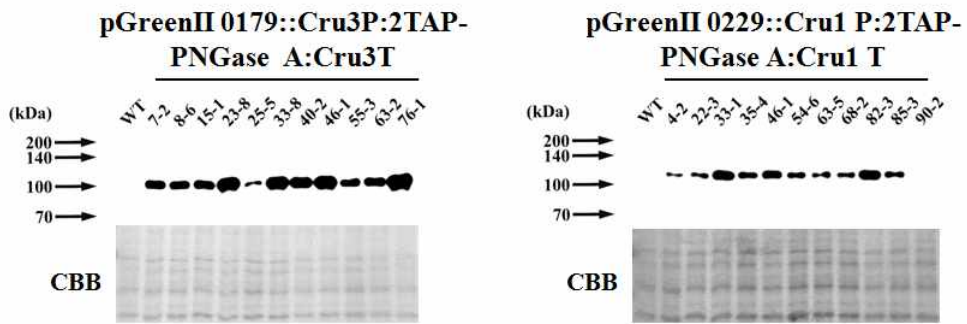


그림 63. 형질전환 T3 homozygote seeds에서 PNGase A 발현량 비교



## 제 9 절 식물세포에서 단백질 고축적 기술 개발

(제 2핵심 4세부과제- 포항공과대학)

### 1. Translational enhancer의 mutagenesis를 통한 high level translational enhancer 개발

#### 가. 5'-UTR의 번역효율 결정 기작의 규명

진핵세포에서 translational efficiency를 결정하는 중요한 인자로 Kozak rule이 잘 알려져 있다 (Kozak and Shatkin, 1977). 또한 5'-UTR이 translational efficiency에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (van der Velden and Thomas, 1999; Wilkie et al., 2003). 식물에서의 translational efficiency를 결정하는 요인을 찾기 위해서 전체 Arabidopsis genome의 5' UTR을 분석하였다. 전체 database에 존재하는 5' UTR 17789개의 유전자로부터 21개의 5' UTR의 nucleotide를 중심으로 sequence를 분석하여 conserved sequence를 확보하고자 하였다 (그림 1). 전체 UTR의 sequence를 분석하여 consensus sequence를 도출하고자 하였다. 전체 21개의 nucleotide sequence 중에서 16, 18, 19, 20, 21에서 어느 정도의 A residue가 dominant하게 나타나는 현상을 관찰하였다. 하지만 나머지의 position에서는 특정한 base의 dominance를 확인할 수 없었다. 이를 통해서 얻은 결론은 5' UTR의 sequence는 특정한 consensus sequence를 가지지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

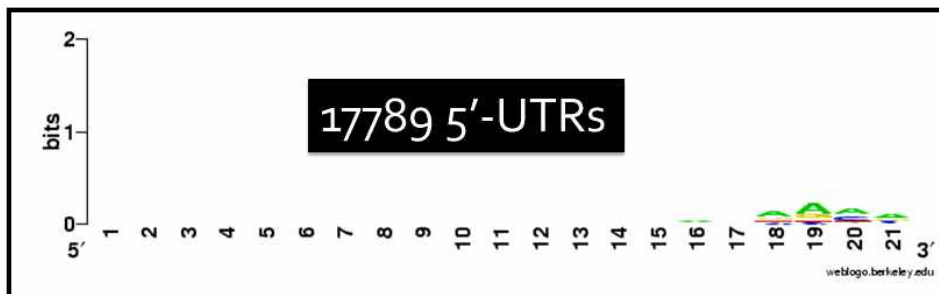


그림 1. 전체 5' UTR sequence의 consensus 확인을 통한 conserved sequence의 identification

위의 그림 1에서 보듯이 전체적으로 conserved sequence는 확인할 수 없었지만 last four sequence에는 A residue가 나타나는 빈도가 현저하게 높았기 때문에 이를 바탕으로 새로이 grouping하는 방법을 개발하였다. 네 개의 base를 이용하여 새로이 grouping을 하였다 (그림 2). 그 결과 그림 2에서 보이는 것과 같이 AAAA가 가장 많이 나타나는 것으로 확인되었으며 이어서 GAAA, AAAG, AGAG, AAAC, AATC의 순서로 나타나는 frequency가 줄어드는 것으로 확인하였다. 흥미롭게도 AAAA를 갖는 sequence가 전체 5' UTR 중에서 약 2300개의 유전자에 해당하는 것으로 나타나 가장 대표적인 UTR sequence로 확인되었다.

## Preference of last 3-4 UTRs

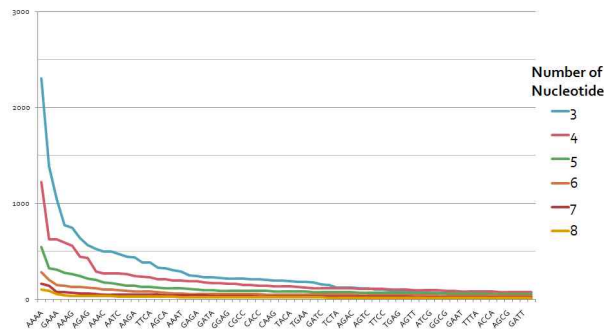


그림 2. Last 3-4 UTR의 base에 따른 전체 Arabidopsis genes의 5' UTR의 preference에 따른 grouping.

## 5'-UTR Clustering

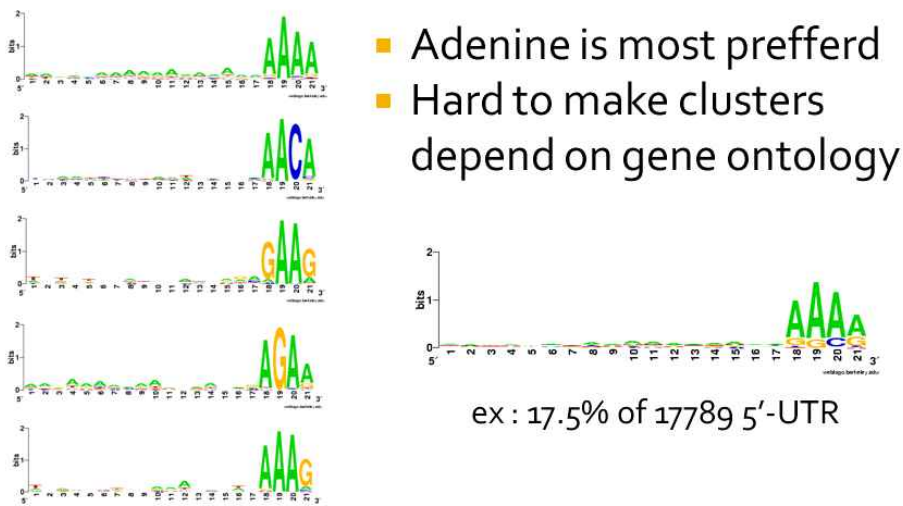


그림 3. Adenine is the most preferable amino acid in the 5' UTR.

이것을 다시 5' UTR sequence 중에서 last four base를 중심으로 다시 clustering하여 나타내었을 때 그림 3과 같은 pattern이 된다는 것을 확인하였다. 즉 모든 위치에서 가장 preferable base가 Adenine base로 나타났다. 특히 AAAA로 나타나는 sequence가 전체 17789개의 5' UTR 중에서 17.5%에 해당하는 sequence로 나타남을 확인할 수 있었다 (그림 3).

이러한 grouping을 통하여 어떤 특정 유전자의 group이 이들 sequence의 특징을 나타내는지를 확인하기 위하여 이들 sequence에 따른 coding sequence를 분석한 결과 특징적인 유전자의 group으로는 나타나지 않는다는 것을 확인하였다. 하지만 흥미롭게도 201개의 ribosomal protein의 5' UTR은 유사한 sequence로 구성되어 있다는 것을 확인할 수 있었다 (그

림 4). 이는 ribosomal protein들이 ribosome을 형성할 때 동일한 양의 protein이 필요하기 때문에 translational level에서 같은 efficiency로 translation된다는 것을 제시해 주는 흥미로운 결과이다.

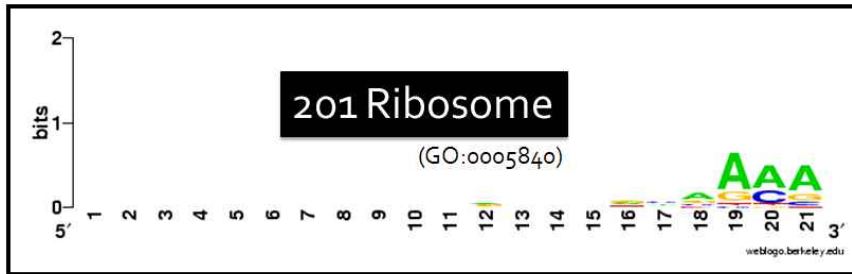


그림 4. 5 ‘ UTR consensus sequence of 201 ribosomal proteins

하지만 이러한 sequence의 grouping이 바로 translational efficiency를 나타내는 것은 아니기 때문에 translational efficiency를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 이들 대표 sequence를 이용하여 GFP fusion construct를 만들고 protoplast에서 translational efficiency를 확인하고자 하였다.

첫해의 연구를 통해 찾아낸 Translational enhancer UTR#35의 mutagenesis 분석을 통해 21개의 nucleotide가 translation enhancing 과정에서 어느 정도의 중요도를 가지는지 파악하고자 하였다. UTR#35의 original sequence를 Adenine, Guanine, Thymine, Cytosine 네 가지 nucleotide로 triple substitution하여 각각 19개의 substitution mutant set, total 86개의 서로 다른 mutant set을 만들어 GFP reporter protein 의 translation level을 조절하는 정도를 관찰하였다 (그림5).

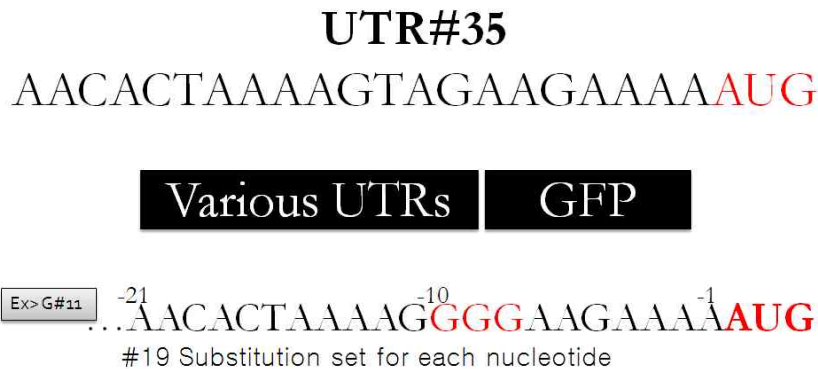


그림 5. UTR#35의 Triple nucleotides substitution

각각의 mutant construct를 Arabidopsis thaliana protoplast에서 24시간 동안 GUS protein과 co-expression 시키고, Western blotting analysis를 protein expression level을 측정하였다. 이때 GUS protein 의 expression level은 normalizer 로 이용하였다 (그림 6).

PEG Transformation → Western blotting  
→ Expression quantification

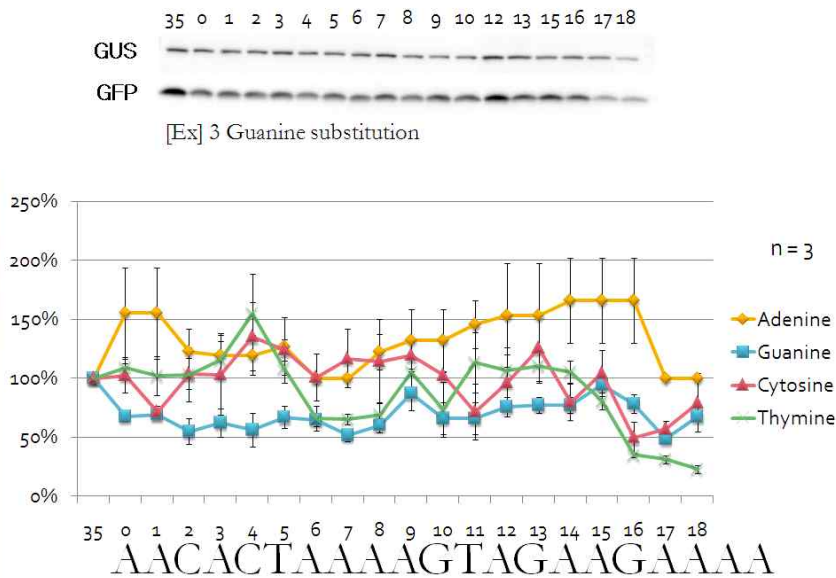


그림 6. Mutant UTR:GFP 와 GUS의 coexpression level 측정

UTR#35를 reference 로 하여 네 가지 triple mutant set의 relative expression pattern 을 얻은 후, position에 따른 nucleotide substitution의 영향을 log value로 변환하여 수치화 하였다. 이 calculating method를 전체 Arabidopsis thaliana genome 의 5'-UTR에 적용하였다. calculating 의 결과값을 UTR score로 정의하며, 이를 통해 17202 21개 이상의 nucleotide를 가진 5'-UTR에 UTR score를 계산할 수 있게 되었다. 이 UTR score는 sequence context가 가진 translation enhancer로서의 가능성에 대한 상대적인 값이며, UTR length와 secondary structure 의 영향을 최소화한 상태에서 post-transcriptional regulator로서의 21 nucleotides 5'-UTR의 역할을 예상하여, 궁극적으로 최적화된 translation enhancer를 찾아낼 수 있을 것으로 기대하였다 (그림 7).

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	19	19	16	12	8	9	6	3	3	7	11	14	16	18	20	21	22	15	7	0	0
G	-17	-17	-20	-21	-24	-21	-20	-22	-23	-19	-15	-14	-16	-14	-11	-8	-8	-15	-20	-24	-17
C	1	-7	-4	-4	5	8	8	6	4	7	5	-2	-5	-2	0	1	-13	-18	-22	-17	-10
T	4	2	2	3	9	10	1	-11	-18	-11	-9	-2	-2	4	3	-1	-18	-35	-54	-57	-64

Highest score (AT1G49780): 226      AAAATTCCTCCAAAAA  
 Lowest score (AT1G28520): -397      GGTGGGGAGGTGAGATTCTT  
 \*Rubisco: 38      CACAAAGAGTAAAGAAGAACA  
 U35: 99      AACACTAAAAGTAGAAGAAAA  
 Average score: -51

그림 7. Each nucleotide substitution 의 expression pattern과 상대적 차이에 따른 발현 level의 수식적 표현

17202개의 endogenous 5'-UTR에 UTR score를 계산한 후, 그 의미를 모색하기 위해

translation efficiency 를 대변할 수 있는 translatoome - polysome microarray 와의 상관관계를 관찰하였다. 두 개의 다른 연구 그룹에서 수행한 polysome microarray 결과값과 UTR score를 13000여개의 gene에 assign 하였으며, 이를 4분면에 plotting 하여 correlation을 가지는 지 확인 하였다 (그림 8).

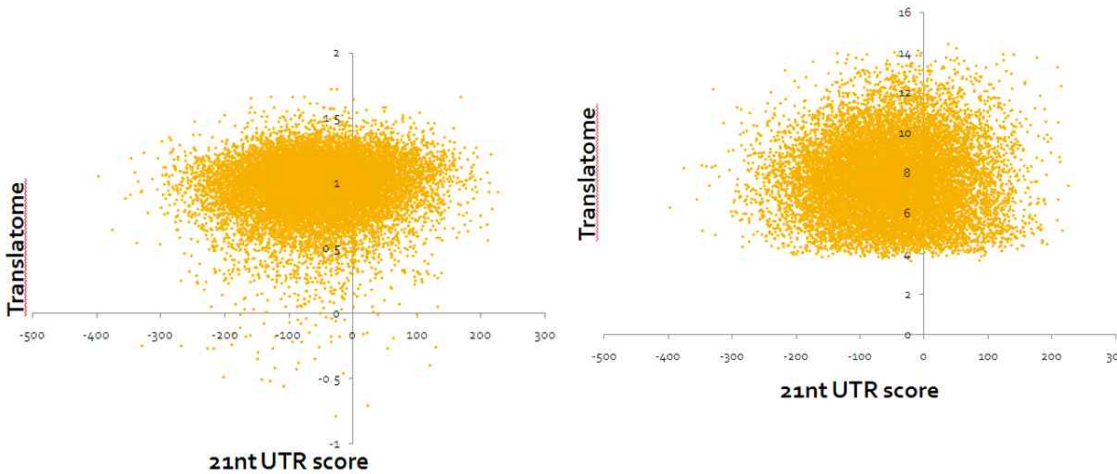


그림 8. Polysome microarray analysis를 이용한 Translatome과 UTR score의 상관관계

그 결과 Polysome microarray를 이용한 translatoome과 UTR score의 correlation은 관찰 되지 않았으며, 이는 in planta 에서 다양한 post-transcriptional regulation을 통해 5'-UTR의 효과가 masking된 것으로 추측된다. 이를 증명하기 위해 가장 예상에서 벗어난 결과를 보인 4개의 5'-UTR을 선택하여 protein expression level을 측정할 예정이다. 이를 통해 5'-UTR score를 계산 system을 정교하게 개선하여 UTR#35보다 더 뛰어난 translation enhancer를 발견 할 수 있을 것으로 기대한다.

No-correlation의 원인을 모색하기 위한 새로운 5'-UTR의 선정 또한 translation enhancer인 UTR#35와 translation inhibitor인 Weak UTR의 polysome analysis를 통해 polysome ratio와 protein expression ratio에 상관관계가 없다는 사실을 확인할 수 있으며 이는 polysome형성 보다는 다른 mechanism을 통해 post-transcriptional regulatino이 일어나고 있다는 또 다른 증거가 될 수 있다 (그림 9).



gene	length	-21utr	GO	cDNA	utr score -397: 226	Transla tome
AT5G40850.1	284	GCGGTGTGTGTGTGTGTTGA	urophorphyrin III methylase	1789	-329	12.2
AT2G26080.1	42	TTGTTTTTTTTGGTTTGGTT	putative glycine dehydrogenase	3504	-286	11.2
AT2G47040.1	137	AAAAACAAAAATCATAAAAA	pectin methylesterases (PME)	2215	185	4.67
AT1G58420.1	28	ATTATTACATCAAAACAAAAA	unknown	740	186	4.64

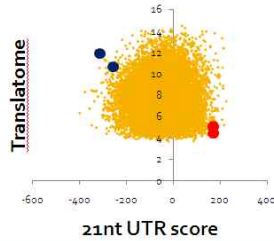


그림 9. UTR#35와 weak UTR의 protein expression ratio(좌), polysome ratio(우)

앞선 연구인 UTR#35의 4 Nucleotide substitution assay를 통해 찾아낸 새로운 5'UTR Translational enhancer인 UTR#420과 가장 낮은 효율을 보인 UTR#850을 이용하여 해당 enhancer element가 GFP가 아닌 다른 Protein에서도 작용하는지 살펴보았다. NPTII (Neomycin phosphotransferase)와 TRP(Tryptophan Synthease)의 CDS앞에 각각의 UTR을 삽입하였을 때 GFP를 이용하였을 때와 동일한 enhancing 결과를 얻었다(그림 10) 이 내용은 특허 출원을 위하여 준비 중이다.

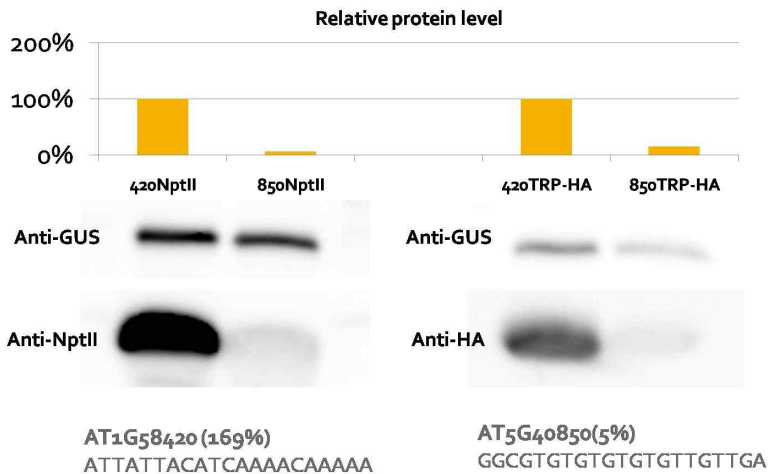


그림 10. Coding region의 종류에 따른 5'-UTR의 영향 검증

Enhancer의 작동 Mechanism을 연구하기 위해 해당 enhancing 시스템을 *S. cerevisiae* 적용하여 Screening을 수행할 계획이며, 선행 연구의 일환으로 UTR enhancer가 *S. cerevisiae*에서도 작용함을 확인하였다 (그림 11)



■ UTR Working confirmation in yeast

- Normal : GGAATTCGATTCCAGATTTAAA
- Weak : GCGTGTGTGTGTGTTGTTGA

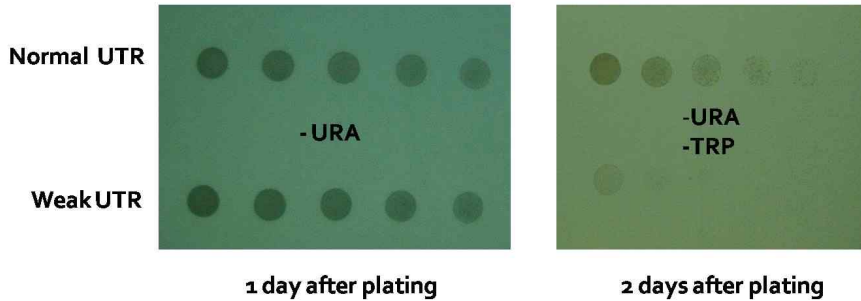


그림 11. Yeast에서의 5'-UTR의 translational efficiency의 검증

UTR#35 enhancer에 대한 substitution의 다음 단계로, translation을 가장 잘 방해하였던 AT5G40850의 21bp 5'UTR을 template으로 3 Adenine substitution을 진행하였으며, 그 결과 마지막 5개의 GTTGA Sequence가 각각 AAA로 치환되었을 때 protein expression이 회복되는 것을 관찰하였다 (그림 12) 정확한 비교를 위해 해당 3개의 AAA치환 mutant 5'UTR을 기존의 enhancer인 UTR#35, 새로 발견한 UTR#420과 비교하여 본 결과 #17 UTR이 가장 높은 효과를 보여 해당 UTR을 또다른 Enhancer로 쓸 수 있는 가능성에 대해 연구할 계획이다 (그림 13)

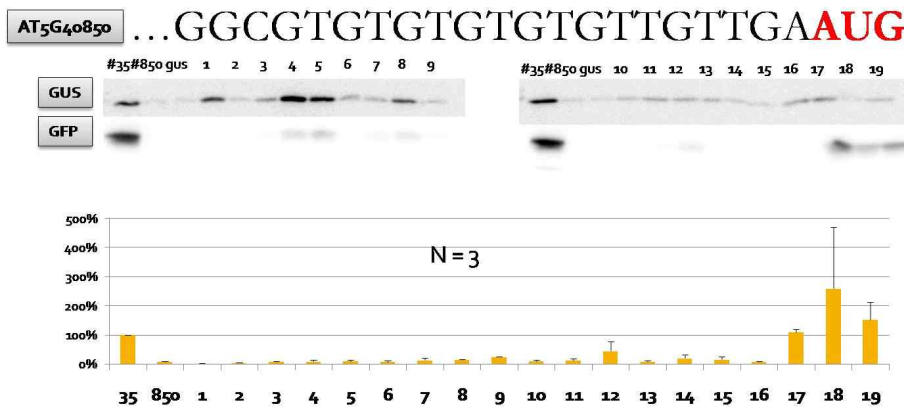


그림 12. At5G40850의 Triple A치환 mutant의 발현 level 측정

AT5G40850

...GGCGTGTGTGTGTGTTGTTGA**AUG**

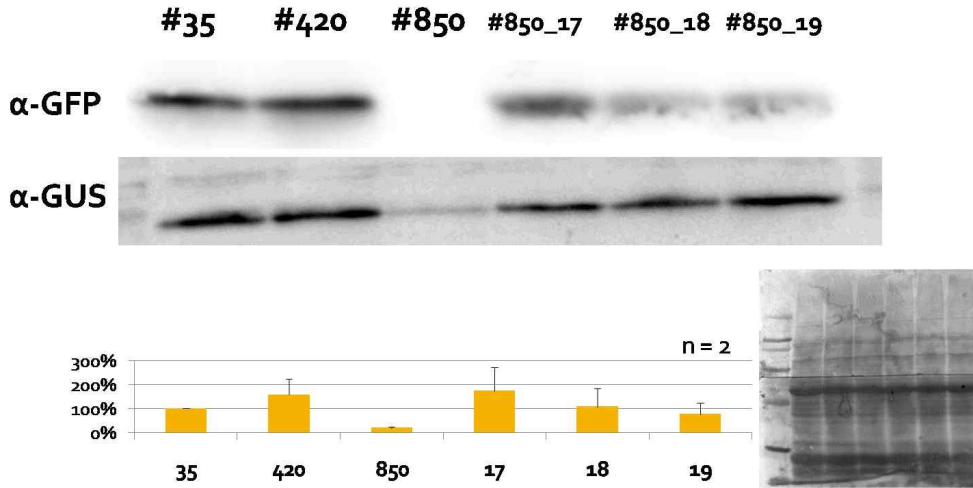


그림 13. Triple mutant 중에서 선택된 construct의 발현 level 재 검증

이전 연구를 통해 찾아낸 Translational enhancer 중 하나인 AT1G58420\_5'UTR (good 5'-UTR)을 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 protoplast와 담배 (*Nicotiana benthamiana*)의 잎, 마지막으로 애기장대 세포추출물을 이용한 in vitro system에서 발현시켜 translation enhancer 기능이 애기장대 특이적인 현상이 아님을 확인하고자 하였다. Translational 을 방해하는 결과를 보였던 AT1G04850\_5'UTR (poor 5'-UTR)을 대조군으로 사용하였으며, Green fluorescence protein (GFP) 단백질 앞에 5'-UTR을 위치시킨 construct를 발현시켜 그 양을 immunoblotting으로 확인하였다 (그림 14).

A.



그림 14. In vitro translation용 construct의 구축

그 결과, 애기장대의 protoplast에서 good UTR을 이용하였을 때 poor UTR보다 7배 정도의 향상된 translation 효율을 보였으며, 함께 발현시킨  $\beta$ -glucuronidase (GUS)의 경우 동일한 양의 protein이 발현된 것으로 보아 transformation 효율도 동일했음을 확인할 수 있었다. 또한 Real-time qRT-PCR로 동일한 mRNA level을 확인하여 transcription이 아니라 translation 과정에서 5'UTR enhancer가 작용했음을 확인하였다 (그림 15).

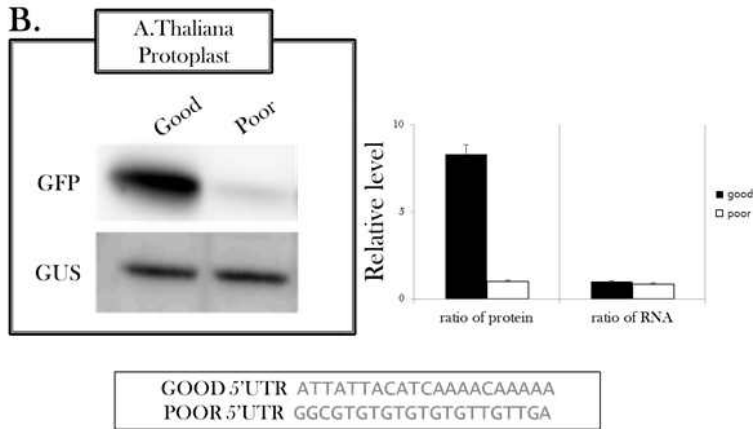


그림 15. Arabidopsis protoplast에서의 5'-UTR의 translational efficiency 비교

두 번째로 담배의 잎에 agrobacterium mediated infiltration을 이용하여 두 가지 construct를 발현시켰다. Transformation 효율이 일정하지 않아 Real-time qRT-PCR로 확인한 mRNA level은 poor 5'UTR을 합성한 GFP가 더 높았으나, 상대적으로 낮은 mRNA level에도 불구하고 good 5'UTR을 합성한 GFP가 더 높은 효율로 translation 되었음을 확인할 수 있었다 (그림 16).

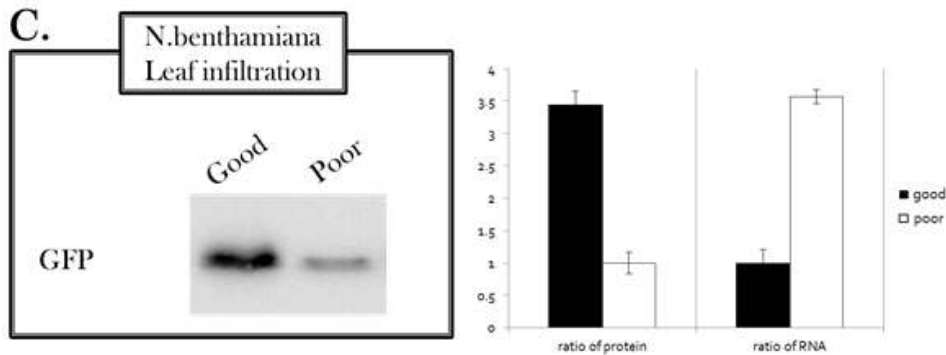


그림 16. 담배 잎에서의 transient expression을 통한 5'-UTR의 translational efficiency 검증

마지막으로 *in vitro* translation을 이용하여 5'UTR enhancer의 효율을 확인하였다. 애기장대의 세포 추출물을 이용한 *in vitro* system을 이용할 경우 여러 장점이 있다. 우선 *in vitro* transcription을 사용하여 얻어낸 동일한 양의 mRNA를 넣어 반응시키기 때문에, transformation efficiency의 영향이 없으며, *in vivo* 실험에서 translation 효율 측정을 방해할 수 있는 다양한 cell condition, transcription 효율, protein/mRNA stability 등에서 자유롭다. *in vitro* translation system에서도 good 5'UTR은 poor 5'UTR에 비해 3배 이상의 translation 효율을 보였으며 이는 good/poor 5'UTR을 애기장대 뿐만 아니라 다른 system을 응용이 가능함을 의미하는 결과라 할 수 있다 (그림 17). 이 결과는 NAR에 발표하였다 (Kim et al., 2014).

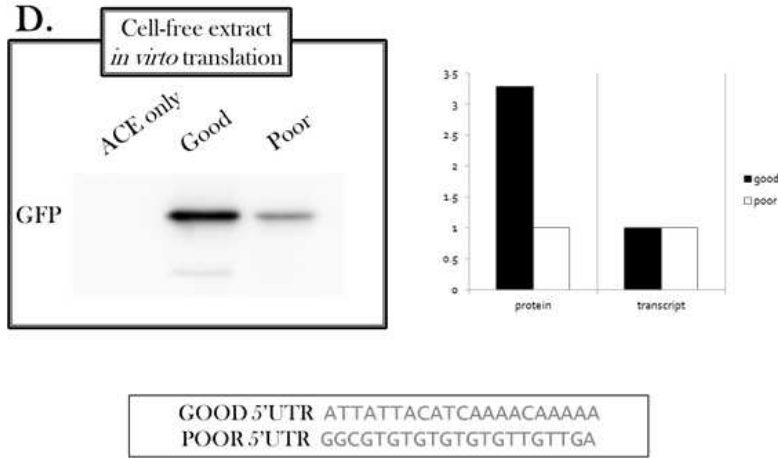


그림 17. Arabidopsis cell free extract에서의 5'-UTR의 translational efficiency의 비교 분석

나. eIFs 연구를 통한 trans-acting enhancer element 연구

Translational efficiency를 결정하는 데는 다양한 factor들이 관여하는 것으로 알려져 있다 (Gebauer and Hentze, 2004; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). 위에서 언급한 것과 같은 5' UTR이 cis acting element로 대단히 중요한 역할을 한다. Internal ribosomal entry site가 translational efficiency를 증가 시킨다는 것과 hairpin loop와 같은 secondary structure가 translational efficiency를 현저히 저해한다는 것이 잘 알려져 있다. 동시에 translation에는 무수히 많은 translational initiation factor들이 관여하는 것으로 알려져 있으며 이들이 translational efficiency에 대단히 중요한 역할을 하는 것이 동물이나 yeast cell에서는 잘 알려져 있다 (그림 18).

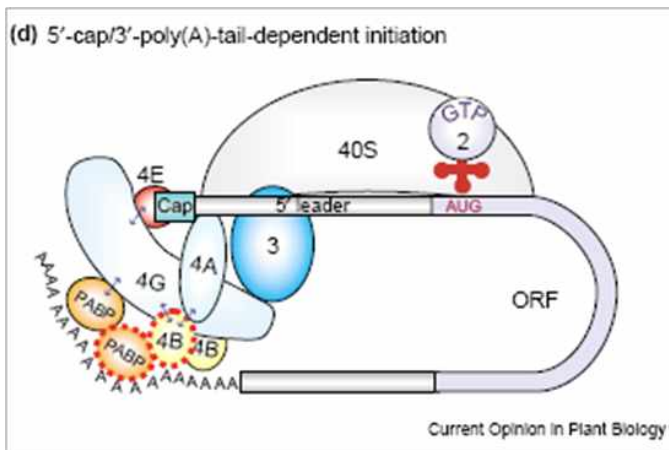


그림 18. Translational initiation factor들의 종류 및 역할

따라서 본 연구에서는 translational initiation factor들이 translational efficiency를 도와 줄 수 있는 factor들을 확보하고 이들의 overexpression을 통해서 translation efficiency를 높이는 방법을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 다양한 translational initiation factor의 cDNA를 확보하고 이들을 protoplast에 overexpression하여 translational efficiency에 대한 효과를 검증하였

다. 첫 번째로 그 효과를 확인하기 위해서 cloning한 것이 Arabidopsis의 translational initiation factor eIF4B이다. 이 유전자의 cDNA를 확보하여 이를 protoplast에 reporter construct인 35UTR:GFP, CBF:GFP, UTR(A):GFP와 cotransformation하여 translational efficiency에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 흥미롭게도 어떤 특정 sequence, UTR(A)에 대해서는 translational efficiency를 높여 줄 수 있다는 가능성을 확인하였다 (그림 19). 계속하여 새로운 translational initiation factor들의 cDNA를 확보하고자 하고 있으며 이들의 효과를 검증하고자 한다.

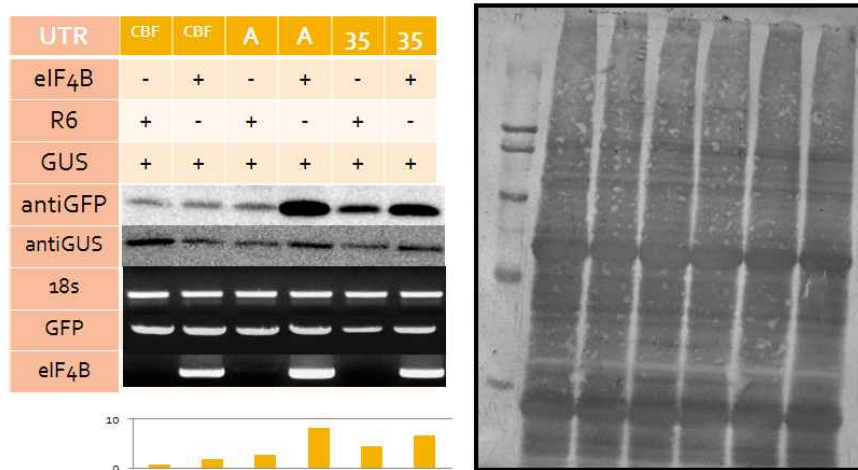


그림 19. Translational initiation factor eIF4B의 overexpression을 통한 translational efficiency의 증가

또 다른 연구 접근법으로는 이들 translational initiation factor들이 knock-out된 Arabidopsis mutant를 확보하고 이들 mutant에서의 translational efficiency를 검증하는 방법을 이용하여 각각의 translational initiation factor들의 기능과 translational efficiency의 control 기작을 규명하고자 한다. 이를 통하여 overexpression 하였을 때 translational efficiency를 높일 수 있는 방법을 개발하고자 한다. 이를 위하여 현재 다양한 translational initiation factor들의 knock-out mutant를 screening하고 있으며 현재 일부의 경우에 phenotype을 관찰하여 그 표현형을 검증하고 있다. 궁극적으로는 이들 mutant에서 확보된 protoplast에 다양한 UTR sequence를 이용한 reporter construct들을 transformation하여 transient expression 기법으로 이들 translational initiation factor가 translational efficiency에 미치는 영향을 검증하고자 한다.

Arabidopsis에 존재하는 것으로 보고된 eIFs (Eukaryotic translation initiation factor)들 중에 5' UTR과 상호작용할 가능성이 높은 eIF1, eIF1a의 KO loss-of-function 식물체를 구해 표현형을 관찰한 결과, eIF1A KO plant가 Col-0 식물보다 느린 성장을 보이는 것을 관찰하였다 (그림 20). 애기장대에는 두 개의 eIF1A isoform이 존재하며 그 중에서 eif1a-a의 경우 mutant가 확보되었는데 표현형으로는 식물의 성장이 더디다는 것이 확인되었다. 다른 한 isoform의 경우에는 mutant를 확보할 수 없어서 표현형을 관찰할 수 없었다. 이를 통해서 eIF1A-a가 식물의 발육 및 성장에 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다. Yeast에서는 한 개의 isoform이 존재하는데 이의 knock-out mutant는 lethal하다는 것이 알려져 있다.



- Average Height -

**Wt : 81 mm    eIF1A KO : 44 mm**

**Wt : 43 mm    eIF1A KO : 26 mm**

그림 20. *eif1a-a*의 knock-out mutant의 표현형

이 같은 현상을 systemic하게 관찰하기 위해, LC-MS/MS를 통한 proteomics 분석을 계획하였다. LC-MS/MS 분석은 정성, 정량적인 분석을 동시에 해낼 수 있는 High-throughput technique이다. 본 연구팀은 LC-MS/MS를 통해 Col-0와 *eif1a* mutant사이에 growth defect를 일으키는 mechanism을 밝히고, 이를 이용하여 서로 다른 stress 상황 하에서도 고효율 단백질 발현을 할 수 있는 system 개발에도 도움이 될 것으로 기대한다. 현재 첫 번째 시도를 통해 200개 정도의 protein을 identification 할 수 있었으며 추후 fractionation step을 추가하여 4000여개 이상의 protein의 정성, 정량적인 분석 목표로 연구 하였다.

애기장대의 eIF1A KO 돌연변이인 식물체가 스트레스 관련 호르몬인 ABA와 heat stress하에서 영향을 받는다는 사실을 확인하였고, 2DE analysis를 통하여 어떠한 protein의 translation이 조절되는지 확인하였다. Col-0 wild type, *eif1a* 두 가지 식물을 각각 heat stress 유무에 따라 sampling하여 2DE를 수행한 결과 50여개의 서로 다른 expression pattern을 보이는 spot들이 관찰하였고, PMF분석을 통해 spot을 identification하였다 (그림 21).



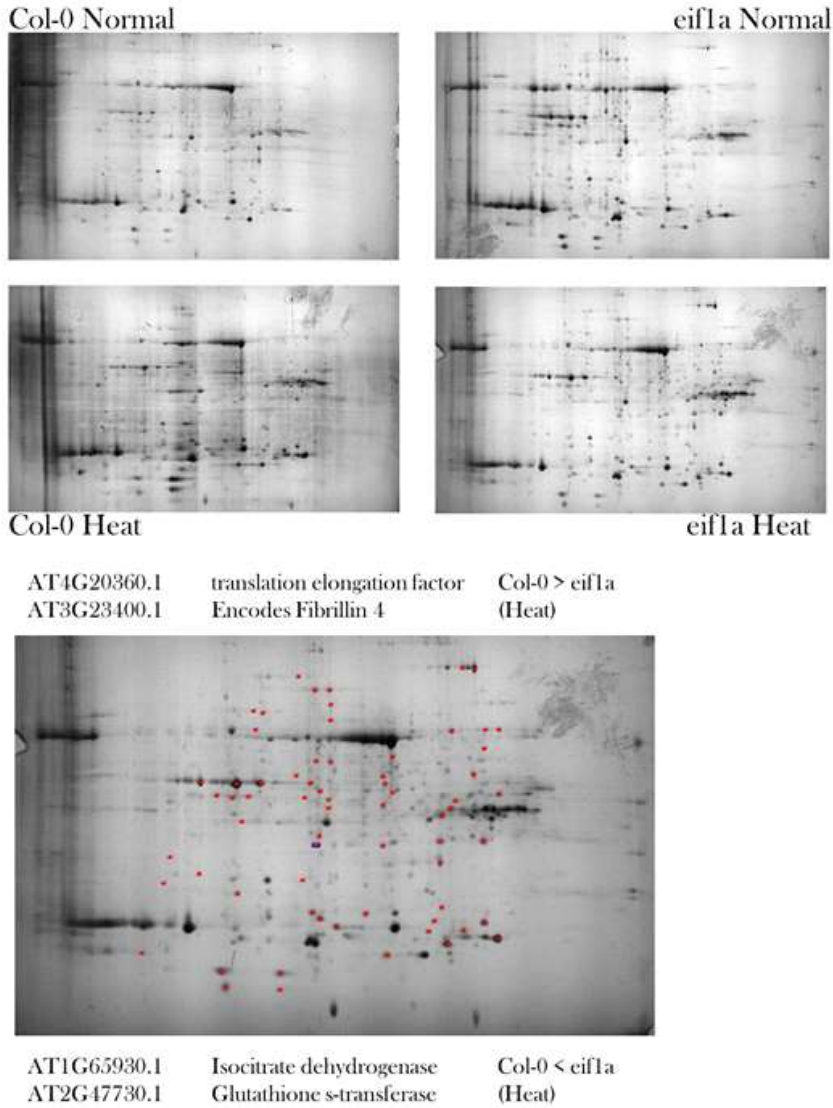


그림 21. eif1a의 knock-out mutant와 wild-type에서 서로 다른 재배 조건에서 발현이 다른 단백질의 동정

추가로 여러 가지 stimulus조건 하에서 해당 mutant의 표현형을 관찰한 결과, 낮은 농도의 ABA하에서 mutant의 growth가 늦는 것을 관찰하였다. 이같은 표현형은 ABA의 농도를 linear하게 높여 주었을 때 동일하게 관찰되었으며, germination보다 post-germinational growth에 문제가 있다는 결론을 내릴 수 있었다 (그림 22).

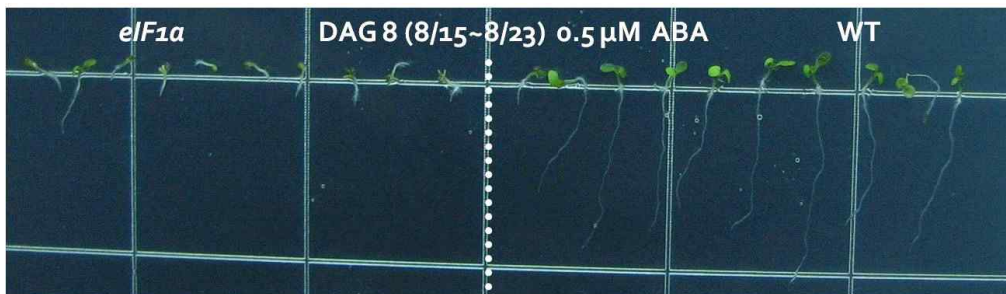


그림 22. ABA에 대한 eif1a-a의 knock-out mutant의 표현형

같은 Heat stress 조건하에서 서로 다른 regulation pattern을 보인 protein중 하나인 AT4G20360(RABE1b)를 eif1a의 direct target 후보로 보고, RABE1b의 5'UTR 21 nt를 GFP에 fusion시킨 reporter construct를 col-0/eif1a protoplast에 발현시켜 관찰하였다. 그 결과 GFP의 expression pattern이 33 ° C, 36 ° C의 두가지 heat stress조건에서 wild type과 eif1a에서 반대임을 확인하였으며, transcript level 측정과 control실험들을 추가하여 실험결과를 검증할 계획이다 (그림 23).

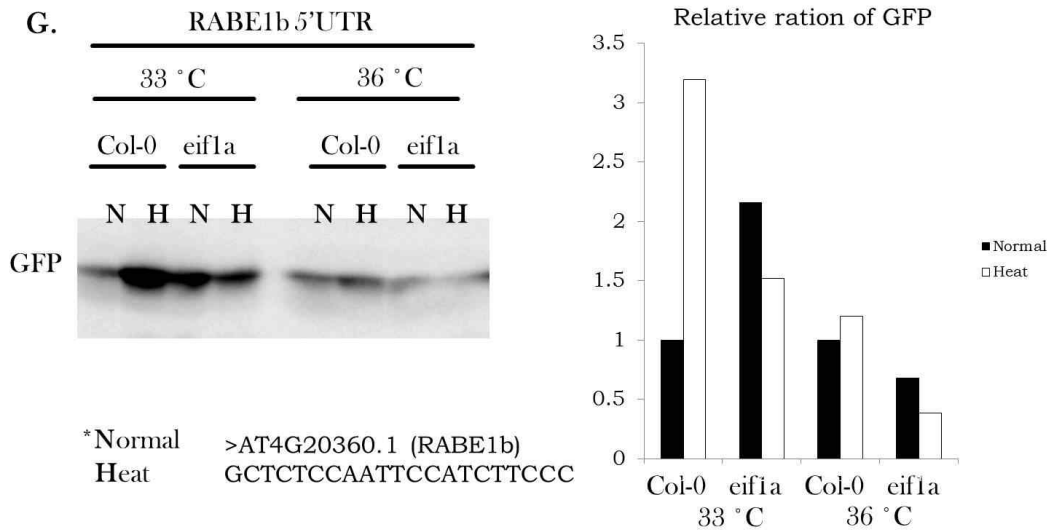


그림 23. eif1a mutant에서의 5'-UTR의 translational efficiency 비교 분석

이어서 좀 더 확실하게 molecular level에서 eIF1A의 역할을 규명하기 위해서 protein pull-down experiment를 수행하였다. Arabidopsis의 cell extract를 확보하고 이를 이용하여 good 5'-UTR과 poor 5'-UTR을 갖는 GFP construct를 in vitro translation 한 후 binding factor들을 pull down 하였다. 이로부터 eIF1A의 antibody를 이용하여 pull-down된 eIF1A의 양을 비교하였다. 이 과정에 translation을 stop하기 위해서 cycloheximide를 처리 하였다. 그림 24에서 보듯이 eIF1A의 양 자체는 5'-UTR의 quality에 따라서 차이가 없다는 것을 확인하였다.

### pull-downed EF1A level with in vitro translation

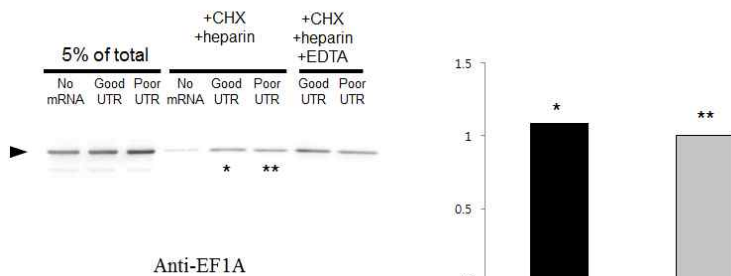


그림 24. Ribosome에 binding한 eIF1A 양의 비교 분석

이러한 연구 결과를 바탕으로 5'-UTR의 quality를 결정하는 기작을 분자 수준에서 규

명하기 위해서 ribosome의 assembly 정도를 비교 하였다. 마찬가지로 애기장대 cell extract를 이용하여 in vitro translation을 수행한 후, good and poor 5'-UTR의 종류에 따라서 large subunit의 pull-down 되는 양을 추적하였다. Translation을 하기 위해서는 small subunit이 translational initiation codon에 preinitiation complex를 형성하고 그 후에 large subunit이 binding 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 large subunit의 양은 whole complex의 형성을 의미 할 수 있으며 이는 translation ready 상태의 ribosome이라 할 수 있을 것이다. 흥미롭게도 large subunit의 양이 good 5'-UTR이 1.4배 정도 많다는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해서 5'-UTR이 ribosome의 assembly를 촉진한다는 것을 알 수 있었다 (그림 25).

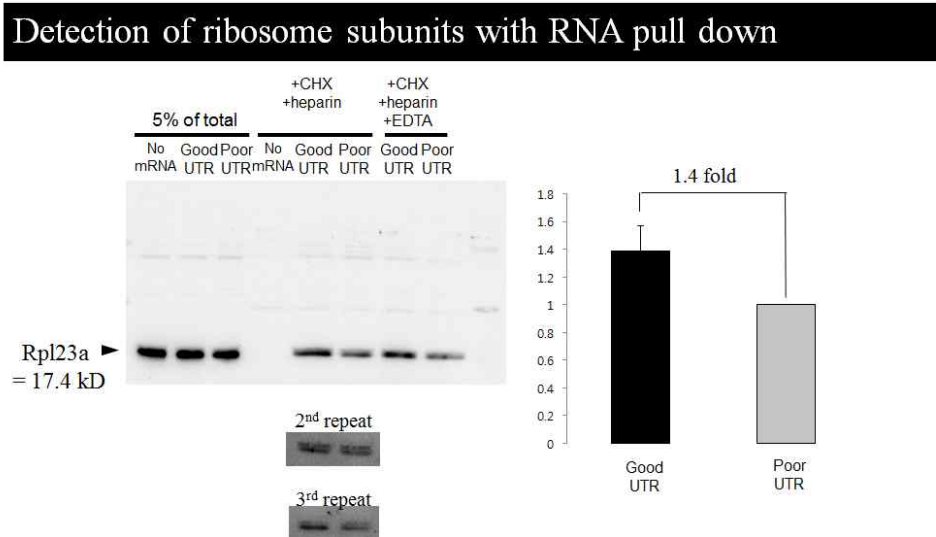


그림 25. 5'-UTR의 종류에 따fms in vitro translation 중에 whole ribosome complex의 형성 비교 분석

이러한 결과와 5'-UTR에 binding하는 small sunbunit의 양을 비교하기 위해서 pull-down 된 ribosome-mRNA complex로부터 18S ribosomal RNA의 양을 RT-PCR을 통해서 비교하였다. 흥미롭게도 아래 그림에서 보는 바와 같이 poor 5'-UTR과 pull-down되는 18S ribosomal RNA의 양이 good 5'-UTR에 비해서 20% 정도 높게 나타났다. 이를 large subunit의 양과 small subunit의 양을 종합해서 보면 poor 5'-UTR이 goog 5'-UTR에 비해서 whole complex를 형성하는 능력이 확연히 떨어진다는 것을 확인할 수 있다. 이는 어떤 이유에선지 small subunit이 mRNA의 initiation codon 근처에 binding하지만 large subunit을 불러들이는 능력이 떨어진다는 것을 의미한다. 따라서 poor 5'-UTR의 translation의 효율이 떨어지는 이 잘 되지 않는 이유는 whole complex의 형성 능력이 떨어지기 때문이라고 할 수 있다 (그림 26).

## Ribosomal small subunit was 20% enriched with poor 5'-UTR

Method : Real time qRT PCR

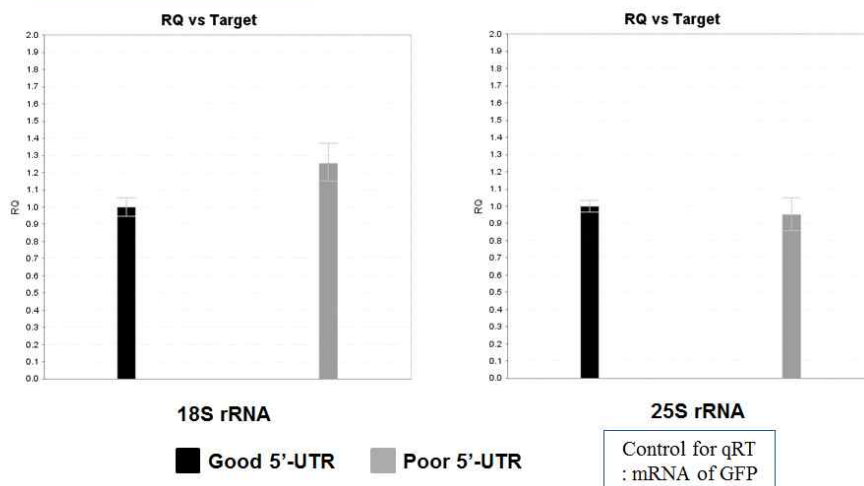


그림 26. Good 5'-UTR과 poor 5'-UTR에 따른 18S rRNA 및 25S rRNA level의 비교 분석

하지만 이러한 결과는 실제로 GFP의 양을 측정했을 때 good 5'-UTR과 poor 5'-UTR의 차이를 설명하지는 못하는 것으로 다음 실험 결과에서 알 수 있다. 즉 good 5'-UTR과 poor 5'-UTR을 이용하여 GFP를 in vitro에서 translation하였을 때 good 5'-UTR과 poor 5'-UTR 사이에 거의 10배의 GFP level에서의 차이를 보였다. 이는 대단히 흥미로운 결과이며, 이 정도의 translation의 차이는 실제로 in vivo에서 good 5'-UTR과 poor 5'-UTR의 차이에 해당하는 것으로 in vitro system에서 in vivo의 결과를 mimic할 수 있다는 것을 의미한다. 대단히 흥미로운 사실은, poor 5'-UTR과 good 5'-UTR 사이에 large subunit의 양과 small subunit의 양을 비교하였 때 poor 5'-UTR이 small subunit을 2 배 이상의 차이가 나지 않지만 GFP의 level의 ribosome의 whole complex assembly가 일어나기는 하지만 이 whole complex가 translation initiation 하지 못하는 defective complex가 만들어지는 것이라는 해석을 할 수 있다 (그림 27).

GFP의 translation에 있어서의 차이를 다시 확인하기 위해서 GFP monoclonal antibody를 이용하여 다시 western blot analysis를 하였을 때도 마찬가지로 결과를 얻었다 (그림 28). 이를 통해서 large subunit이 preinitiation complex에 binding을 하기는 하지만 이 complex가 translation을 initiation하지는 못하는 complex를 형성한다는 새로운 가설을 세울 수 있었다. 이를 다시 확인하기 위해서 translation inhibitor들인 cycloheximide와 puromycine을 처리하여 GFP의 level과 large ribosome의 양을 측정하였다. Large ribosome의 양은 RPL23a를 western blot analysis를 통해서 확인하였다. 그 결과 GFP의 양은 good 5'-UTR이 9배 정도 많이 만들었지만 RPL23a의 양은 good 5'-UTR과 poor 5'-UTR 사이에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 puromycine에 의해서 GFP의 생성이 억제되는 것으로 보아

**pull-downed GFP level was significantly different**

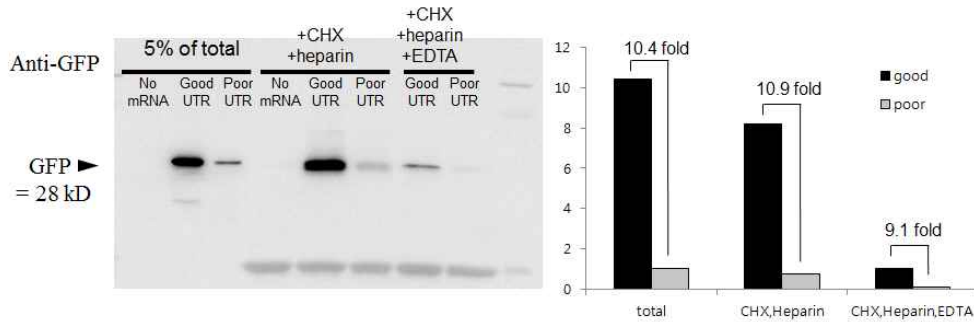


그림 27. Good 5'-UTR과 poor 5'-UTR에 의한 GFP 생성 level의 비교 분석

translation이 in vitro 시스템에서 잘 작동하는 것으로 확인할 수 있었다 (그림 29). 이러한 결과를 통해서 본 연구에서는 5'-UTR이 translation competent한 whole complex의 형성에 크게 역할을 한다는 것을 증명할 수 있었다. 계속해서 이 작용을 규명할 수 있다면 식물 세포에서 단백질의 번역 효율을 증진 시키는 새로운 방법을 개발 할 수 있을 것으로 사료된다.

**pull-downed GFP level was significantly different**

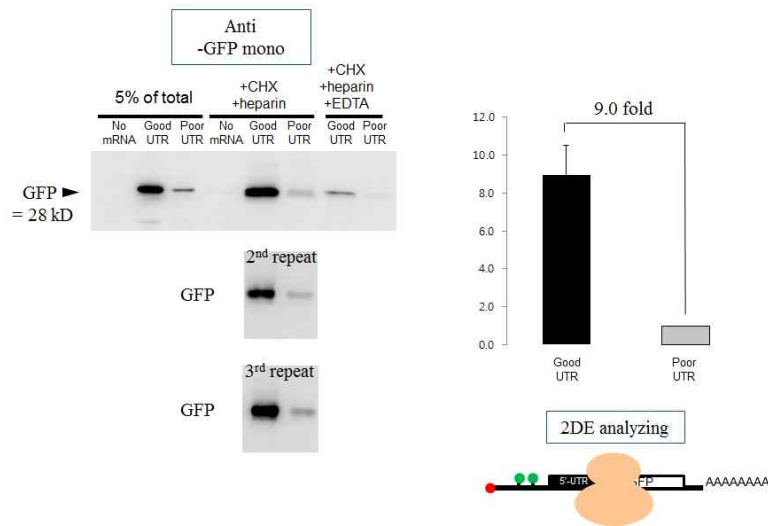


그림 28. Good 5'-UTR과 poor 5'-UTR에 의한 GFP의 생성 level의 비교 분석

**pull-downed ribosome complex were dissociated with Puromycin**

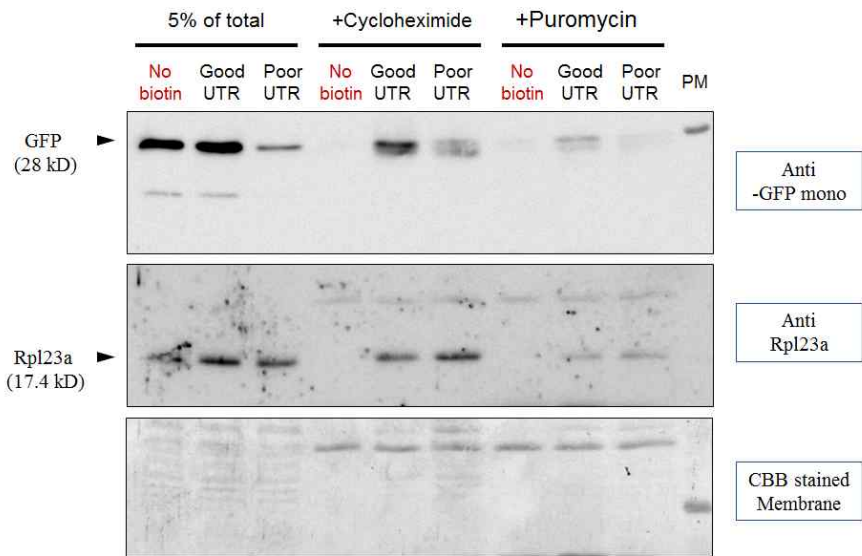


그림 29. Good 5'-UTR과 poor 5'-UTR에 의한 GFP의 생성 level의 비교 분석

2. 엽록체 targeting의 기작 규명을 통한 엽록체 단백질 고축적 기술 개발

가. 엽록체로의 단백질 이동에 있어서의 AKR2의 역할 규명

엽록체로의 protein targeting을 이용한 단백질 저장 기술의 개발을 위하여 엽록체의 단백질 targeting 기작을 규명하고자 하였다. 이미 본 연구실에서 확인한 AKR2를 중심으로 연구를 수행하였다. AKR2는 엽록체의 막 단백질 이동 factor로 동정 되었다 (Bae et al., 2008). 또한 엽록체로 targeting되는 외막 단백질의 signal sequence를 확인하고자 하였다. AKR2는 ribosome에 binding하는 특성을 가지고 있다는 것을 확인하였다. 이를 분자 수준에서 규명하기 위해서 정확한 ribosome binding domain을 AKR2로부터 확인하고자 하였다. Serial deletion construct를 만들고 이들을 E. coli에서 발현하는 방법을 이용하여 AKR2의 deletion mutant를 확보하였다. Deletion construct들은 GST tagging을 하였으며 이 GST tagging을 이용하여 순수하게 purify한 후 protein pull-down assay를 수행하였다. ribosome은 wheat germ extract에 있는 ribosome 사용하였다. 그 결과 AKR2의 specific domain이 ribosome의 binding에 관여한다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 30). 이 binding assay를 통해서 확인한 것은 AKR2의 central domain과 첫 번째 ankyrin repeat domain이 ribosome의 binding에 대단히 중요하다는 것을 확인하였다.

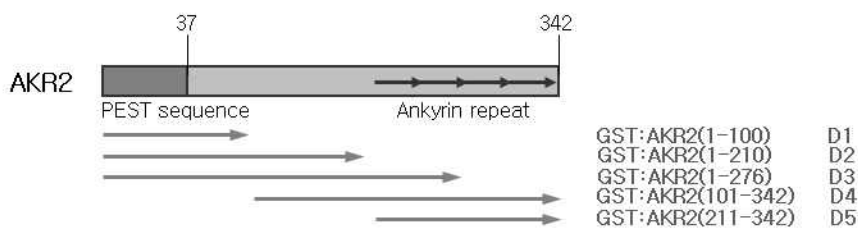






그림 30. Generation of serial deletion mutant and AKR2 binding to ribosomes

Serial deletion mutants were generated and fused to GST. These fusion constructs were expressed in *E. coli* and purified using glutathion agarose affinity column chromatography. The purified proteins were used for protein pull-down assay using wheat germ extracts.

이러한 연구 결과는 AKR2가 엽록체 외막 단백질을 cytosol에서 엽록체로 이동할 때 아마도 ribosome에서 바로 translation 되는 엽록체 외막 단백질을 escort하여 translation이 완료된 후에 엽록체로 이동한다는 가설을 제시해 준다고 할 수 있다.

이어서 ribosome에 binding하는 기작을 규명하기 위해서 어떤 특정 ribosomal protein이 AKR2의 binding에 관여하는지를 규명하고자 하였다. 이를 위하여 다양한 ribosomal protein 선 발하고 이들을 *E. coli*에서 발현하고 이들 fusion protein과 AKR2의 binding assay를 수행하여 binding candidate를 확보하였다. 흥미롭게도 여러 ribosomal protein들 중에서 RLP23B와 RLP23aB가 AKR2와 *in vitro*에서 tight하게 binding한다는 것을 확인하였다 (그림 31, 그림 32). 이는 두가지 방법, protein pull-down 방법과 biacore 방법을 이용하여 연구를 수행하였다.

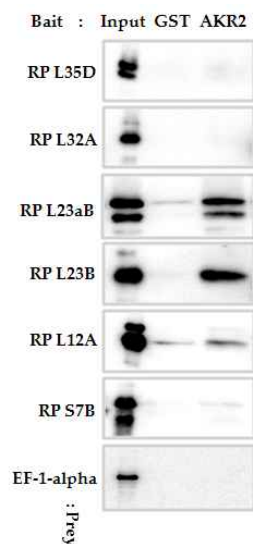


그림 31. Binding of AKR2 to selective ribosomal proteins

Various ribosomal proteins were expressed in *E. coli* and used for protein pull-down assay using AKR2.

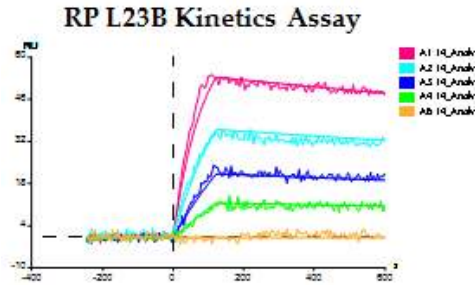


그림 32. AKR2 binding to RPL23B

이러한 binding assay를 통해서 얻은 흥미로운 결과는 AKR2가 RPL23aB와 strong하게 interaction한다는 것이다. RPL23aB는 ribosome에서 nascent protein이 만들어져 ribosome을 빠져 나올 때 long exit tunnel의 exit site에 존재하는 단백질이며, 특히 ER 단백질의 이동 기작에 관여하는 signal recognition particle (SRP)가 binding하는 것으로 잘 알려져 있다 (Wegrzyn et al., 2006). 따라서 이 RPL23aB와 AKR2의 direct interaction은 엽록체 외막 단백질이 ribosome에서 만들어져 ribosome을 빠져 나올 때 바로 AKR2가 escort할 것이라는 가설을 제시해 주었다. 이러한 연구 결과에 바탕을 두고 SRP와 AKR2의 RPL23aB에 대한 interaction에 대한 competition 실험을 수행하였다. SRP 중에서 RPL23aB와 interaction하는 단백질로는 SRP54가 알려져 있으므로 (Wild et al., 2004) 이 SRP54 중에서 RPL23aB binding domain인 N-terminal domain을 E. coli에서 발현하여 competition assay에 이용하였다. 그 결과 SRP54N이 존재하는 환경에서 AKR2의 RPL23aB의 binding 현저하게 줄어들음을 확인할 수 있었다 (그림 33).

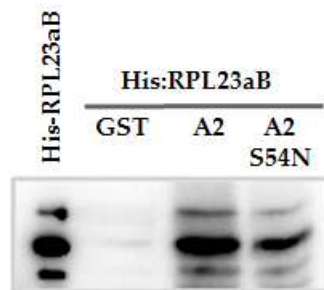


그림 33. Competition between AKR2 and SRP54 for RPL23aB binding

엽록체의 내로 단백질을 이동시키는 signal sequence를 transit peptide라 한다 (Bruce, 2000). 본 연구실에서는 수 년 전부터 transit peptide의 다양성에 대한 해답을 찾기 위해 여러 연구들을 진행 중에 있고 (Lee et al., 2003; Lee et al., 2006; Lee et al., 2008). 본 연구에서는 transit peptide에 공통적으로 상당수 분포되어 있다고 알려진 proline 잔기의 역할을 규명하고자 하였다. 그림 34에서 보이는 바와 같이 wild type RbcS-nt:GFP와 대부분의 P/A mutants는 엽록체로 이동을 하였다 (transformation 후 12시간). 이는 proline 잔기가 세포질을 통한 navigation 단계에는 관여하지 않는다는 것을 의미한다. 하지만 T2,4-P/A, T4,7-P/A, T2,4,7-P/A, T3,4,7-P/A, T2,3,4,7-P/A의 경우에는 엽록체로 이동한 후에 정상적으로 stroma에 들어가지 못하고 엽록체 외/내막에 묶여있는 양상을 보였다 (상당부분이 pellet fraction에 존재). 이 결과는

proline 잔기의 적절한 배치가 엽록체 내부 단백질의 효율적인 외/내막 통과에 요구된다는 것을 의미한다.

그림 34에서 이상이 생긴 P/A mutants가 엽록체에 어떠한 형태로 존재하는지를 알아보기 위해 transformation 후 6시간 때, subcellular fractionation 실험을 실시하였다.

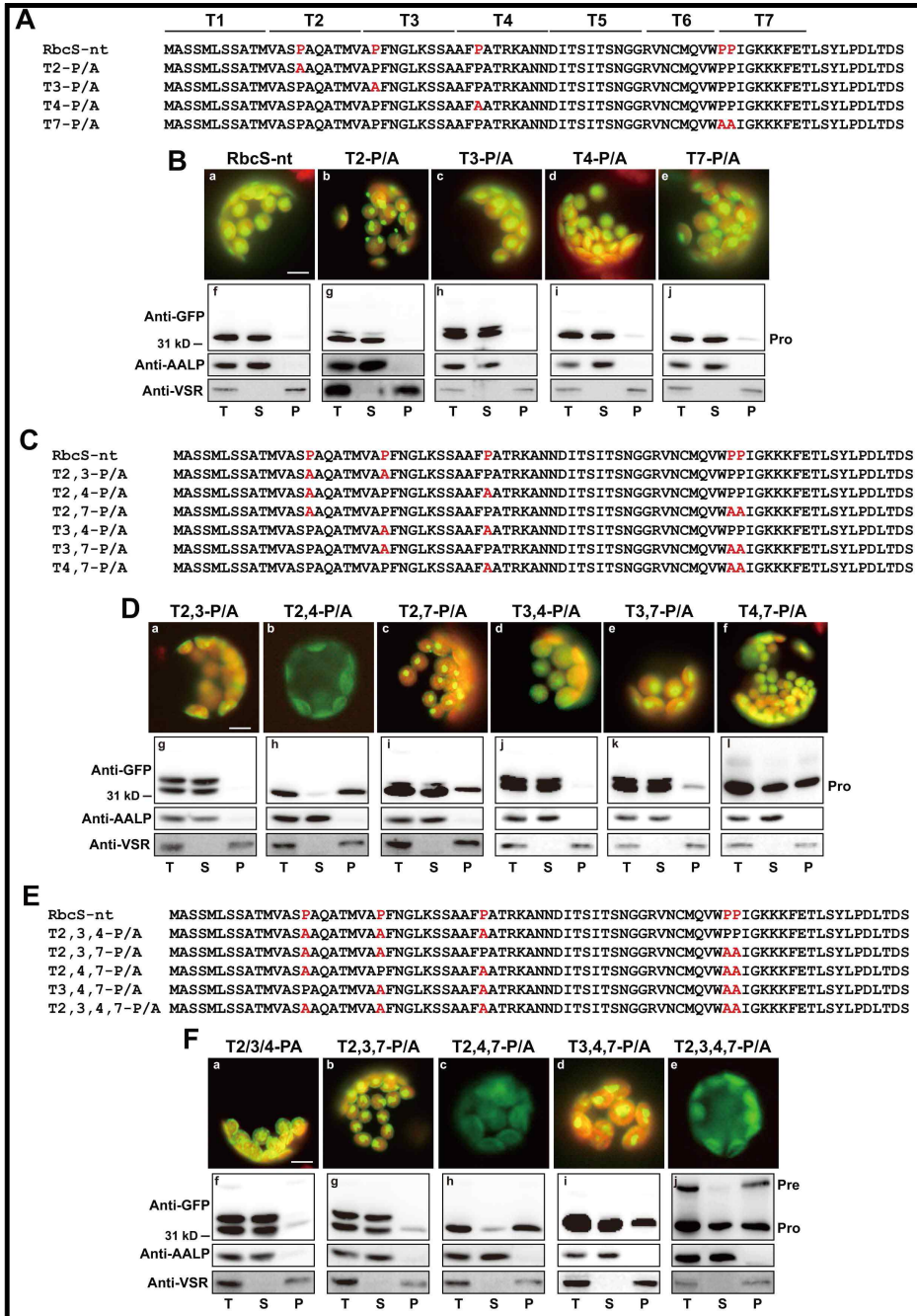


그림 34. wild type RbcS-nt:GFP와 proline 잔기를 alanine으로 치환시킨 constructs의 세포내 행동

(Pre : precursor forms, Pro : processed forms, T : total fraction, S : soluble fraction, P : pellet fraction, AALP : soluble fraction을 나타내는 marker, VSR : pellet fraction을 나타내는 marker)

흥미롭게도 분석한 모든 P/A mutants의 경우 모두 SDS-PAGE에서 조차aggregation된 상태로 존재하였다 (그림 35; A). 좀 더 확실한 aggregation 패턴을 보기 위해 Blue-native PAGE를 실시하였다 (그림 35; B). wild type RbcS-nt:GFP와는 달리 T2,4-P/A, T4,7-P/A:GFP의 경우에 모두 720 kDa이 훨씬 넘는 부분에 aggregation이 된 상태로 존재하는 것을 확인하였다. 엽록체를 분리하여 분석한 결과 aggregation이 엽록체에서 이루어진다는 사실을 알 수 있었고 (그림 35; C), 엽록체 외막 단백질을 제거시킬 수 있는 thermolysin을 처리하였을 때, T4,7-P/A:GFP만의 일부 band가 사라지는 것을 통해 (그림 35; D), P/A mutants는 엽록체 외/내막에 aggregation 상태로 묶여 있으면서 C-terminal 부분이 여전히 세포질 쪽을 향해 노출되어 있다는 사실을 알 수 있었다.

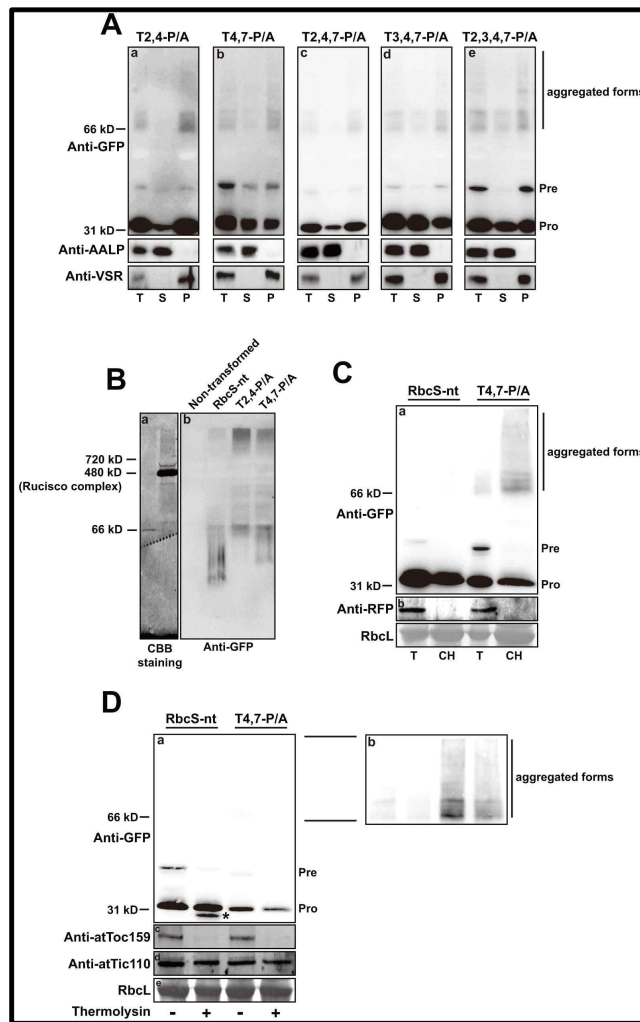


그림 35. Aggregation behaviors of P/A mutants, CH : chloroplast fraction

P/A mutants는 엽록체로 정상적으로 이동할 뿐만 아니라 transit peptide가 정상적으로 잘리는 양상을 보여준다. 하지만 processed form이 여전히 membrane에 묶여있다는 사실은 proline 잔기가 엽록체로의 이동 과정 중 late step에 관여한다는 사실을 시사해준다. 따라서 wild type RbcS-nt:GFP와 T4,7-P/A:GFP의 행동을 엽록체 이동 마지막 단계에 관여한다고 알려진 Hsp93의 한 가지 isoform인 Hsp93-V가 결핍된 애기장대 원형질체에서 분석하였다 (그림

36). 흥미롭게도 RbcS-nt:GFP의 상당 부분은 *hsp93-V*에서 세포질에 존재하고 있었다 (그림 36; A). 하지만 T4,7-P/A는 같은 조건에서 여전히 엽록체에 존재하고 있는 것을 확인하였다 (그림 36; B). 이 결과는 subcellular fractionation 결과에도 잘 나타나 있다 (그림 36). 한 가지 가능성은 wild type RbcS-nt:GFP는 *hsp93-V* 결핍 상황에서 다시 세포질로 retrotranslocation이 일어나는 반면 P/A mutant의 경우에는 이 과정도 저해가 될 수 있을 것으로 판단된다. 실질적으로 Hsp93를 활성화시킨다고 알려진 Tic40가 없는 상황에서 엽록체 단백질이 다시 세포질로 release가 된다는 보고가 있었다 (Chou 등., 2003).

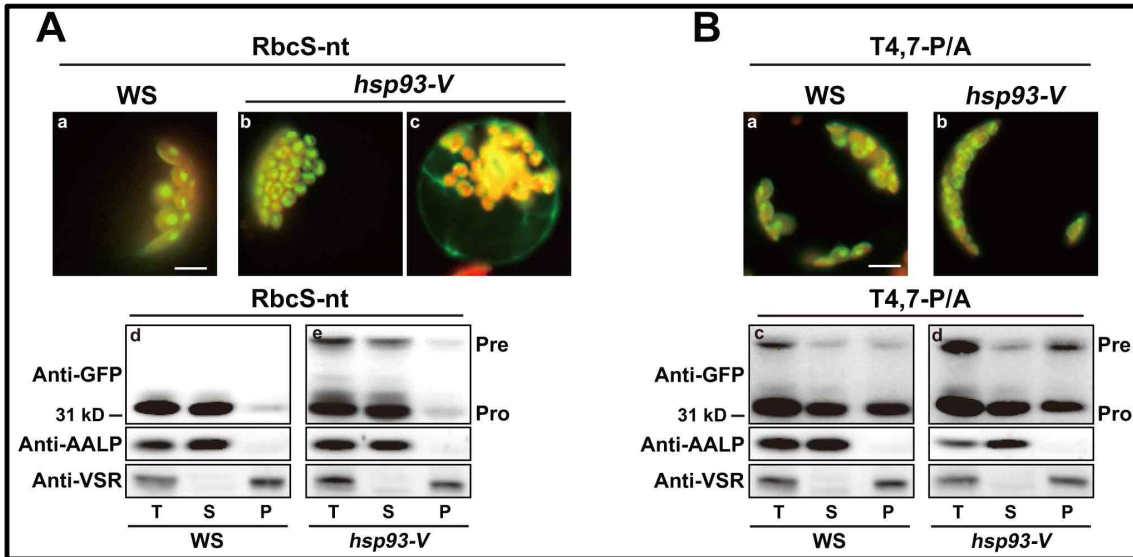


그림 36. T4,7-P/A:GFP의 *hsp93-V* knockout mutant에서의 targeting pattern

결론적으로 transit peptide에 상당부분 분포하고 있는 proline 잔기는 엽록체 내부로의 단백질 이동에 있어서 필수적인 역할들을 담당하고 있다. 구체적으로 proline 잔기는 세포질에서의 과정에는 관여하지 않지만, 엽록체 이중막을 통과하는데 필수적인 역할을 담당하고 있고, 또한 효율적인 엽록체 발달을 위해 필요하다고 여겨지는 retrotranslocation 과정에도 관여함으로써, 원활한 엽록체의 생성과 발달에 중요할 것으로 사료된다.

#### 나. 막단백질 이동기작의 이해와 세포 내 위치 정보 규명

생명체의 기본 단위인 세포는 표면을 둘러싼 지질막을 통해 외부와 세포 내 환경을 구분하여 독립적인 개체로 존재하고 있다. 또한, 지질막은 세포 내 소기관들을 구획화하여 각각의 특별한 기능을 수행할 수 있게 한다. 지질막을 통해 세포는 외부의 자극에 반응하고 물질을 수송하는 등의 다양한 생명 현상들을 유도하고 있다 (). 하지만, 실제 이런 현상들은 많은 경우 지질막에 존재하는 막단백질들이 관여하고 있다. 예를 들어 세포는 세포 표면에 존재하는 각종 신호 수용기와 물질 수송기를 통해 외부 신호를 받아 성장, 발달 등의 작용을 유도하거나 이온, 물, 단백질 등 각종 물질을 수송하여 항상성을 유지해 준다. 막단백질의 기능은 세포 내 위치와 밀접한 연관이 있는데, 세포를 둘러싸는 세포막에는 결합 단백질, 신호 수용기 등의 막단백질들이 주로 존재하고 있고 세포 간 신호 전달, 외부 자극 반응 등의 생명 현상에 관여하고 있다. 반면, 엽록체와 미토콘드리아 등의 세포 내 소기관의 내외막에 존재하는 막단백질들은



대표적으로 광합성 작용과 에너지 생성에 관련된 기능을 담당하고 있다. 막단백질을 제대로 이해하고 응용하기 위해서는 기능뿐 아니라 단백질의 생성 후 이동신호서열 인식과 소기관별로의 특이적 이동을 담당하는 분류 및 이동기작을 분자 수준에서 규명하고 그 원리를 이해하는 것이 필요하다. 더 나아가 위치 정보와 기능을 결합하여 특정 막단백질이 세포 내에서 어떤 생명 현상에 관여하는지 예측할 수 있고 이에 맞춰, 새로운 학술 정보를 획득하거나 산업적으로 응용할 수도 있을 것이다. 이렇듯, 막단백질 이동기작 연구는 기능 연구와 더불어 생명체를 이해하는데 중요한 요소이다.

생명체 단백질들의 서열을 분석한 결과, 막단백질이 전체 단백질의 25-30%를 차지할 거라 예상하고 있다. 하지만, 막단백질은 세포 내에서 다양한 기능을 수행하며 생명 현상에 중요한 위치를 점하고 있는데 반해 실제로 동정된 수는 적은 편이다. 그러므로 아직 밝혀지지 않은 많은 수의 막단백질이 소기관별로 존재할 수 있다. 현재까지 단백질의 위치 정보를 얻기 위해서는 특정 소기관을 분리하여 단백질을 정제한 후 MS/MS assay를 통해 분석하는 proteomics 기법이 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 막단백질의 경우, 특유의 소수성으로 말미암아 쉽게 집적되고 정제하기 어려우므로 기존의 proteomics 기법으로는 동정하기 어려운 상황이다. 또한, 세포 내 존재하는 양 자체가 적거나 조직, 발달 과정 별로 발현양의 차이가 큰 경우에도 정확한 막단백질 분석이 힘들어진다. 이를 극복하기 위해서, 막단백질의 이동 신호 서열을 분석하여 특정 소기관으로의 이동에 필요한 규칙을 찾고 연관된 이동기작을 알아내는 것이 새로운 대안이 될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 막단백질의 이동신호서열 상의 규칙과 이동기작을 이해할 중요한 단서를 찾았고 이를 토대로 막단백질을 보다 세세하게 소기관별로 분류한 데이터베이스를 구축하고 하며 또한 세포 내 위치를 정확히 예측해 낼 수 있는 프로그램을 개발하고자 한다. 더 나아가 생명 현상에 관여하는 중요한 막단백질을 새롭게 발굴해 낼 수 있을 것이다.

막단백질의 이동기작을 연구하기 위한 모델로서 signal-anchored (SA) 단백질을 사용하였다. SA 단백질은 막단백질의 가장 간단한 형태 중 하나로서 아미노 말단에 하나의 막관통영역을 가지고 있다. 이런 SA 단백질은 일반적인 이동 신호 서열이 없이, 아미노 말단의 막관통영역 그 자체가 이동 신호와 지질 막 삽입을 매개하는 두 가지 역할을 동시에 담당한다 (Lee et al., 2001; Rapaport, 2003; Lee et al., 2004; Lee et al., 2011). 하지만 소수성을 지닌 것 이외에는 아미노산 서열상에 특징이 나타나지 않는 막관통영역이 어떻게 각 소기관으로의 이동을 특이적으로 매개하는지 의문이었다. 선행 연구결과 막관통영역의 카복시 말단 쪽에 위치하는 양성을 띠는 아미노산으로 구성된 영역 - CPR (C-terminal positive region)과 소포체 단백질과 비교하면 상대적으로 낮은 소수성을 지닌 막관통영역이 엽록체와 미토콘드리아 SA 단백질들의 특이적 운반에 중요하다는 가설이 제시된 바 있다. SA 단백질의 엽록체와 미토콘드리아 이동에서 CPR의 중요성을 검증하기 위해 엽록체와 미토콘드리아 SA 단백질을 선정해 CPR 내의 아르기닌과 라이신을 글라이신으로 치환시킴으로 CPR을 제거해 주었다. 그 결과 기존에 엽록체와 미토콘드리아로 이동하던 SA 단백질들이 전형적인 소포체 네트워크 패턴을 보이는 것으로 보아 소포체로 이동했음을 알 수 있다. 이는 CPR이 엽록체와 미토콘드리아로 이동하는데 필요조건임을 알려준다. 0.4 소수성 값이 SA 단백질의 소포체와 엽록체/미토콘드리아 이동에 중요한 기준이 될 수 있는지 여부를 검증하기 위해 0.4 값을 기준으로 소수성을 증감시키는 돌연변이체를 만들고 이를 식물 세포에 발현시켜 보았다. 발현된 단백질의 세포 내 위치 변화를 동정하기 위해 형광 현미경과 소기관 분리를 통한 생화학적 방법을 이용하였다. 먼저 소포



체 SA 단백질을 선택하여 막관통영역의 소수성 값을 0.4이하로 낮춘 돌연변이체의 경우, 기존에 소포체로 이동하던 모습과 달리 엽록체/미토콘드리아로 이동하는 것을 형광 현미경과 confocal 현미경으로 확인 할 수 있었다. 추가적으로 소기관 분리를 통해 검증 실험을 하였는데 이 결과 역시, 소수성 값이 0.4이하로 낮아짐에 따라 SA 단백질은 소포체 대신 엽록체/미토콘드리아 분리 층에서 주로 검출이 되었다 (그림 37). 이 결과들을 토대로 막관통영역의 소수성 값이 0.4이하로 낮아지게 되면 막단백질의 엽록체/미토콘드리아 이동이 유도된다는 사실을 알 수 있었다. 다음으로 엽록체/미토콘드리아 SA 단백질의 소수성을 0.4이상으로 높여주었을 때에는, 앞선 실험 결과들과 달리 SA 단백질들이 소포체로 이동하는 것을 현미경을 통해 관찰할 수 있었다. 또한, 소기관 분리 실험에서도 0.4이상의 소수성을 가지는 단백질들은 엽록체/미토콘드리아가 아닌 소포체 분리 층에서 주로 검출됨을 확인할 수 있었다 (그림 38). 이들 결과를 종합해 볼 때, 막관통영역의 0.4 소수성 값은 SA 단백질을 소기관에 따라 분류할 수 있는 적절한 기준 값이 될 수 있음을 증명하고 있다. 더불어, 인간과 효모의 미토콘드리아 SA 단백질들을 선별하여 소수성 값을 조사한 결과, 이들 단백질들의 막관통영역도 0.4 이하의 소수성 값을 가지고 있었다 (표 1). 이는 0.4 소수성 기준 값이 식물뿐 아니라 다른 생명체에서도 SA 단백질의 위치를 결정할 때 공통적으로 쓰일 수 있는 가능성을 보여준다.

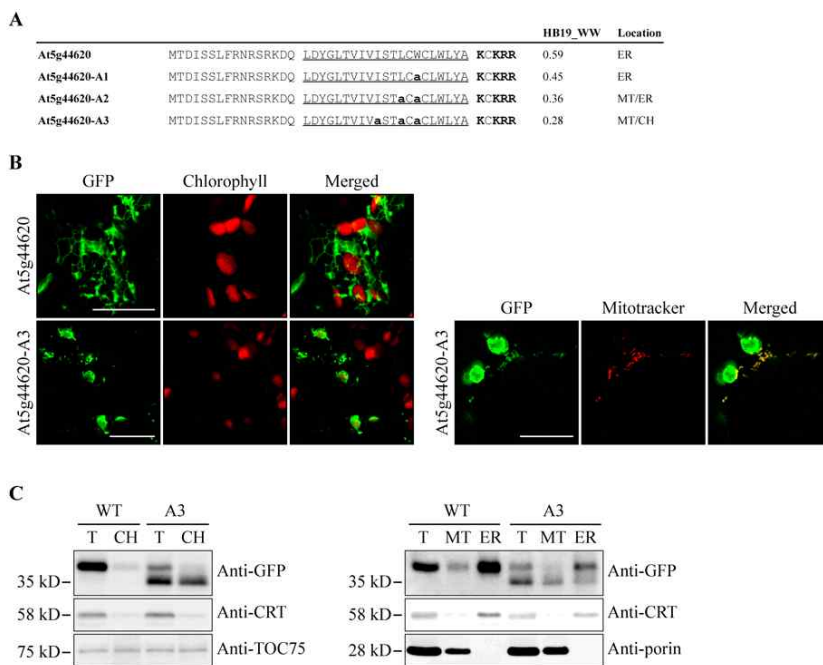


그림 37. 소포체 SA 단백질인 At5g44620의 소수성을 감소시키면 엽록체와 미토콘드리아로 위치가 변하게 된다.

- (A) At5g44620 그리고 각각의 돌연변이체의 아미노 말단 아미노산 서열. 소수성 값을 감소시키기 위해 류신, 아이소류신 그리고 트립토판 아미노산을 굵은 소문자로 표시한 것처럼 알라닌으로 치환하였다. 막관통영역의 소수성 값은 WW 소수성 기본값으로 계산하였다. 막관통영역은 밑줄로 표시되었고 CPR의 아르기닌과 라이신은 굵은 대문자로 강조했다.
- (B) GFP와 결합된 At5g44620 또는 At5g44620-A3의 DNA를 지닌 *Agrobacterium tumefaciens*를 식물 잎에 침투시켰다. 침투된 식물 잎을 confocal 레이저 현미경으로 동정하였다. Bars = 20  $\mu$ m.

(C) GFP와 결합된 At5g44620:GFP(glyNC) 또는 At5g44620-A3:GFP(glyNC)를 protoplast에 발현시킨 다음 엽록체, 미토콘드리아, 소포체 별로 소기관을 분리하였다. 각 분리 층을 표시된 항체와 면역 블로팅법을 이용하여 분석하였다. T, 전체 추출물; CH, 분리된 엽록체 추출물; MT, 분리된 미토콘드리아 추출물; ER, 분리된 소포체 추출물. Anti-TOC75, anti-CRT (calreticulin) 그리고 anti-porin 항체는 각각 엽록체, 소포체 그리고 미토콘드리아의 마커이다. WT, At5g44620:GFP(glyNC); A3, At5g44620-A3:GFP(glyNC).

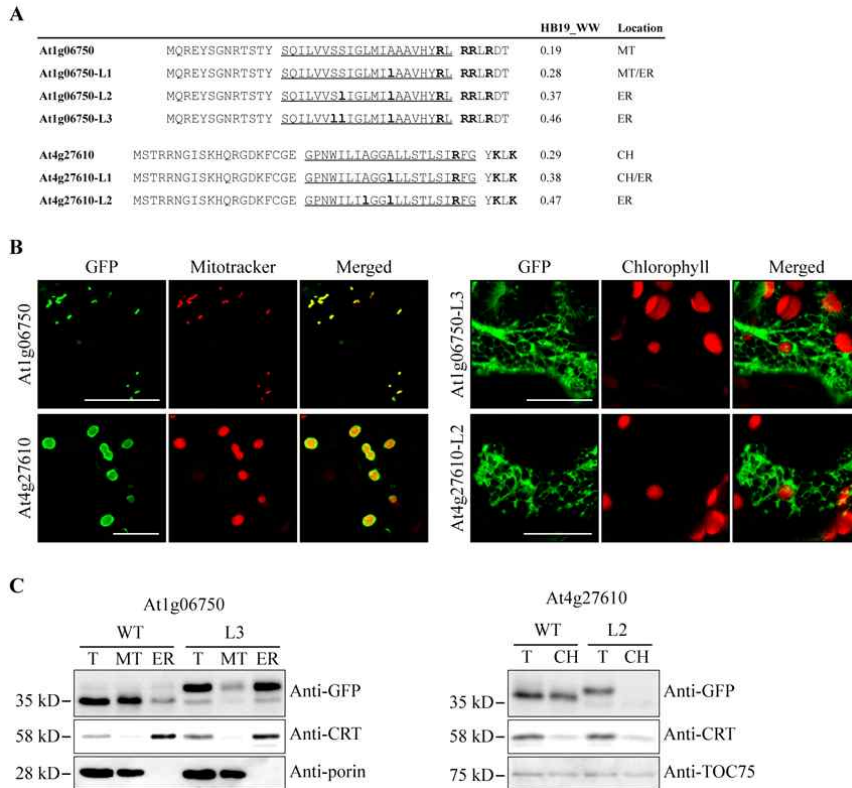


그림 38. 엽록체/미토콘드리아 SA 단백질들의 소수성을 증가시키면 소포체로 위치가 변한다.

(A) Atlg06750, At4g27610 그리고 각각의 돌연변이체의 아미노 말단 아미노산 서열. 소수성 값을 증가시키기 위해 막관통영역의 알라닌, 세린을 굵은 소문자로 표시한 것처럼 류신으로 치환하였다. 막관통영역의 소수성 값은 WW 소수성 기본값으로 계산하였다. 막관통영역은 밑줄로 표시되었고 CPR의 아르기닌과 라이신은 굵은 대문자로 강조했다.

(B) GFP와 결합된 Atlg06750, Atlg06750-L3, At4g27610 또는 At4g27610-L2의 DNA를 지닌 *Agrobacterium tumefaciens*를 식물 잎에 침투시켰다. 침투된 식물 잎을 confocal 레이저 현미경으로 동정하였다. Bars = 20 μm.

(C) GFP와 결합된 Atlg06750(glyNC), Atlg06750-L3(glyNC), At4g27610(glyC) 또는 At4g27610-L2(glyC)를 protoplast에 발현시킨 다음 엽록체, 미토콘드리아, 소포체 별로 소기관을 분리하였다. 각 분리 층을 표시된 항체와 면역 블로팅법을 이용하여 분석하였다. T, 전체 추출물; CH, 분리된 엽록체 추출물; MT, 분리된 미토콘드리아 추출물; ER, 분리된 소포체 추출물. Anti-TOC75, anti-CRT (calreticulin) 그리고 anti-porin 항체는 각각 엽록체, 소포체 그리고 미토콘드리아의 마커이다. WT, Atlg06750(glyNC) 또는 At4g27610(glyC); L3, Atlg06750-L3(glyNC); L2, At4g27610-L2(glyC).

NAME	ACCESSION	N-terminal sequences	HB19_WW
Tom20 ( <i>H.s.</i> )	NP_055580	MVGRNS <u>AIAAGVCGALFIGYCIYF</u> <b>DRKRRSDPNFKNRL</b>	0.21
Tom70 ( <i>H.s.</i> )	NP_055635	--PGTGGGLPR <u>WOLALAVGAPLLLGGAGAIYLW</u> <b>SRQQRRREA</b>	0.30
MAPL ( <i>H.s.</i> )	NP_078820	MESGGRPS <u>LCOFILLGTTSVVTAALYSVY</u> <b>RQKARVSQELK</b>	0.26
MitoPLD ( <i>H.s.</i> )	NP_849158	MGRL <u>SWQVAAAAAVGLALTLEALPWVL</u> <b>RWLRSSRRRPRREA</b>	0.19
Tom20 ( <i>S.c.</i> )	NP_011596	MSQSNPIL <u>RGLAITTAIAALSATGYAIY</u> <b>FDYQRRNSPQFRK</b>	0.19
Tom70 ( <i>S.c.</i> )	NP_014278	MKSFITRNKT <u>AILLATVAATGTAIGAYYYYN</u> <b>QLQQQQQRGKK</b>	0.04
OM45 ( <i>S.c.</i> )	NP_012130	MSSR <u>IIVGSAALAAAITASIMV</u> <b>REQKAKGQRREGNV</b>	0.01
Mcr1 ( <i>S.c.</i> )	NP_012772	MFSRLSRSHSK <u>ALPIALGTVAIAAATAFYFAN</u> <b>RNQHSEFVFN</b>	0.21
Ubp16 ( <i>S.c.</i> )	NP_015253	--TSLIKKVC <u>GLIIAASLYAIAPSLALVFG</u> <b>DSKQSIGKY</b>	0.38

표 1. 인간과 효모의 미토콘드리아 SA 단백질의 소수성 값

단백질들의 소수성 값은 WW 소수성 기본 값을 사용해 계산했다. 이어서 엽록체의 외막으로 targeting되는 membrane protein들의 signal sequence에 대한 consensus를 확인하기 위하여 다양한 membrane protein들의 transmembrane domain을 확보하고 이들을 이용하여 GFP reporter construct를 만들고 이들의 targeting을 protoplast와 Agrobacterium infiltration 기법으로 transient expression한 후 확인하고 이들로부터 targeting signal에 대한 원리를 확보하고자 하였다. 이들 다양한 construct를 종합하여 엽록체로 targeting되는 단백질들의 signal sequence를 확인한 결과 엽록체 단백질의 경우 transmembrane domain에 존재하는 hydrophobic amino acid들의 종합적인 hydrophobicity가 moderate한 것이 대단히 중요하며 동시에 transmembrane domain의 C-terminal region에 positively charged region이 존재하여야 한다는 것을 확인하였다 (그림 39). 흥미롭게도 93% 의 total chloroplast/mitochondrial protein들이 hydrophobicity가 0.4 이하로 나타났으며 ER protein들의 경우에는 0.4 이상으로 나타났다.

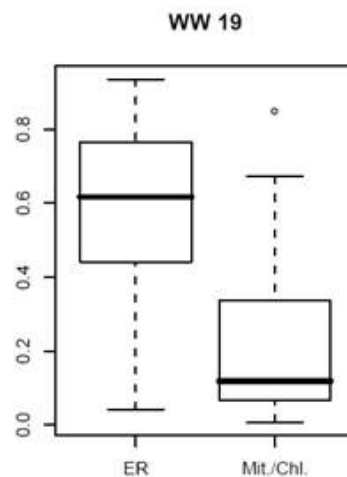


그림 39. Hydrophobicity of ER and chloroplast/mitochondrial membrane proteins.

위와 같은 조건을 검증하기 위해서 ER로 targeting되는 hydrophobicity가 0.47인 transmembrane domain으로 C-terminal에 positive charged residue가 있는 단백질을 선택하여







mutant들을 제작하였다. FA presequence를 아미노 말단부터 아미노산 10개마다 구역을 지정하여 각각 P1 ~ P6라 명명하고, 각 부분의 아미노산을 Alanine으로 치환한 mutant presequence를 제작한 뒤 GFP를 붙여 세포 내에서의 이동 양상을 관찰할 수 있게 하였다 (그림 43A). 이렇게 제작한 플라스미드를 애기장대의 원형질체 (protoplasts) 에 도입하여 이들 각각의 세포 내 위치와 미토콘드리아로의 이동 효율을 측정된 결과, P2 (11st - 20th) 와 P4 (31st - 40th), P5 (41st - 50th) region을 alanine으로 치환한 경우 단백질 이동 효율이 다른 mutant들에 비해 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다 (그림 43B). 이는 P2와 P4, P5 region에 단백질 이동에 중요한 역할을 하는 sequence motif가 포함되어 있음을 의미한다. 이들 돌연변이 단백질들의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰한 결과 모두 미토콘드리아에 있다는 것을 알 수 있었고, 이 결과를 통해 돌연변이 단백질의 미토콘드리아 이동 효율은 감소했지만 각각의 돌연변이로 인해 미토콘드리아 외 다른 기관으로 이동하지는 않는다는 것을 확인하였다 (그림 43C).

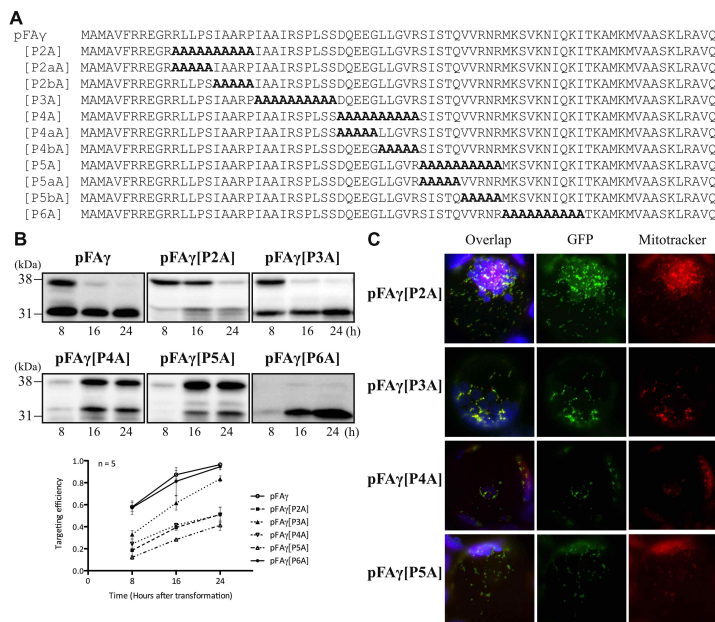


그림 43. Various alanine substitution mutant의 protein targeting patterns

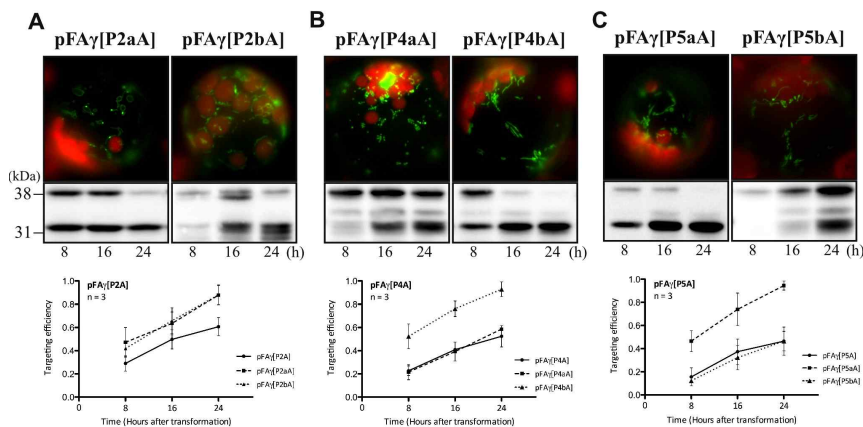


그림 44. Various alanine substitution mutant의 Protein targeting pattern

앞에서 동정한 P2, P4, P5 구역의 성질을 더욱 정교하게 분석하기 위해 각 구역을 절반씩 alanine으로 치환한 mutant들을 제작하였다. P2 region의 경우는 P2a와 P2b 모두 단백질



이동 효율이 회복되는 것으로 보아, P2 region 전체가 sequence motif로써 기능할 것이라 추측할 수 있었다 (그림 44A). P4a 부분을 치환했을 때의 낮은 이동 효율은 P4 치환 단백질과 차이가 거의 없으나, P4b 치환 단백질의 경우는 wild-type 수준으로 회복되는 것을 관찰하였다 (그림 44B). 마찬가지로 P5 region을 분석한 결과 P5a 치환 단백질은 이동 효율이 크게 증가하였고 P5b 치환 단백질은 변화가 없었다 (그림 44C). 따라서 P4a (DQEEG; 31-35) 와 P5b (VVRNR; 46-50) 부분이 FA presequence의 대표적인 모티프라는 결론을 내릴 수 있었다.

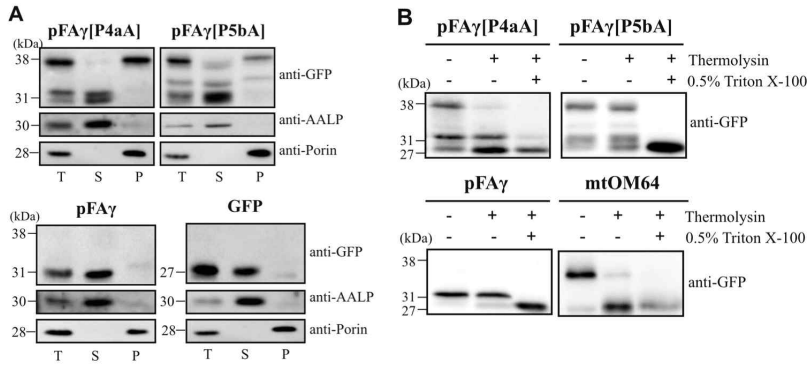


그림 45. 미토콘드리아로의 단백질 targeting 분석

- A. Fractionation assay
- B. Thermolysin treatment assay

위의 실험에서 중요한 모티프로 동정된 DQEEG (P4a) 와 VVRNR (P5b) 모티프가 제거되었을 때 미토콘드리아 이동 효율이 감소한 이유를 규명하기 위하여 Fractionation assay와 Thermolysin treatment assay를 수행하고, wild-type 단백질에서의 결과와 비교하였다. 미토콘드리아 내부와 외/내막 에 위치하는 단백질을 분리하기 위한 fractionation assay를 수행한 결과, 미토콘드리아로 이동하지 못한 단백질들이 membrane fraction에서 검출되었다. 이 실험 결과를 토대로 DQEEG 또는 VVRNR 모티프는 미토콘드리아를 인식하는 능력에는 영향을 미치지 않지만, 미토콘드리아의 이중막을 통과하는 과정에서 특정한 역할을 수행할 것이라 추측하였다. 미토콘드리아 외막에 위치하는 단백질을 선택적으로 제거할 수 있는 Thermolysin treatment assay를 수행한 결과, DQEEG 치환 단백질은 thermolysin에 의해 분해되었으나, VVRNR 치환 단백질은 분해되지 않았다. 이 실험 결과를 통해 DQEEG motif는 미토콘드리아 외막을 통과하는 데 중요한 역할을 하며, VVRNR motif은 미토콘드리아 내막을 통과하는 과정에서 역할을 수행할 것임을 알 수 있었다.

DQEEG와 VVRNR 모티프를 모두 alanine으로 치환한 단백질의 경우 미토콘드리아로의 단백질 이동이 완전히 막히는 것을 관찰하였는데, 이는 DQEEG와 VVRNR 모티프가 미토콘드리아 이동 과정 중 서로 다른 부분에서 역할을 수행하고 있다는 것을 의미한다. 이러한 현상에 착안하여, presequence 내에는 두 모티프 외에도 이들 모티프의 기능을 보조하는 추가적인 모티프들이 존재할 것이라는 가설을 세웠다. 상호 보완적 기능을 수행하고 있는 모티프 후보들을 규명하기 위하여 이중 치환 돌연변이 (double substitution mutant) 들을 제작한 뒤 각 돌연변이들의 단백질 이동 효율을 측정하여 수치화하였다 (표 2). In vivo import 실험 결과 단일 치환에 비해 단백질 이동 효율이 유의미하게 감소하는 motif들의 조합을 발굴하였다. 그 중에서도 특

히 여섯 가지 조합 (2a-3a, 2a-4b, 2a-5a, 2b-3a, 2b-5a, 3b-4a) 의 alanine 치환 돌연변이의 경우 미토콘드리아로의 단백질 이동이 심각하게 저해되는 것을 관찰하였는데, 2a와 2b, 그리고 4a 모티프는 선행 실험에서 중요한 기능적 모티프로 이미 동정된 것들이다. 이 실험 결과를 통해 3a와 4b 모티프는 P2 모티프와 상보적인 기능을 수행하며, 3b 모티프는 4a (DQEEG) 의 기능을 보완할 것이라 추측할 수 있었다. 또한, 세 가지 조합 (3a-4b, 3b-5a, 4b-5a) 의 경우는 각 모티프의 단일 치환으로는 표현형이 나타나지 않았으나, 각 조합 내의 모티프를 같이 치환했을 경우에는 유의미한 이동 효율의 저하를 보였다 (표 2). 따라서 3a와 4b, 3b와 5a, 4b와 5a 는 각각 서로 redundant한 기능을 수행하고 있다는 결론을 도출할 수 있다.

**Table 1. Double substitution of F1-ATPase  $\gamma$  subunit presequence**

Name	Targeting efficiency			Localization
	12 h	24 h	36 h	
P2a3aA	0.20	0.32	0.44	Mito
P2a3bA	0.67	0.71	0.82	Mito
P2a4aA	0.49	0.53	0.55	Mito
P2a4bA	0.23	0.43	0.56	Mito
P2a5aA	-	-	-	Mito
P2a5bA	0.31	0.51	0.52	Cyto/Mito
P2b3aA	-	-	-	Cyto
P2b3bA	0.49	0.71	0.84	Mito
P2b4aA	0.22	0.30	0.29	Cyto
P2b4bA	0.34	0.57	0.82	Cyto
P2b5aA	0.21	0.49	0.68	Mito
P2b5bA	0.47	0.55	0.70	Mito
P3a4aA	0.68	0.91	0.99	Mito
P3a4bA	0.22	0.33	0.44	Mito
P3a5aA	0.32	0.56	0.68	Mito
P3a5bA	0.57	0.61	0.80	Mito/Cyto
P3b4aA	-	-	-	Cyto
P3b4bA	0.40	0.81	0.99	Mito
P3b5aA	0.31	0.45	0.62	Mito/Cyto
P3b5bA	0.50	0.66	0.85	Mito/Cyto
P4a5aA	0.32	0.47	0.60	Mito
P4a5bA	-	-	-	Cyto
P4b5aA	0.12	0.33	0.50	Mito
P4b5bA	0.58	0.71	0.78	Mito

Time-course analysis of targeting efficiency was performed for double-substitution mutant presequences. Transformed protoplasts were harvested at each time point and the samples were analyzed by western blotting. Subcellular localization was observed at 24 hours after transformation.

표 2. FA presequence의 이중 치환 돌연변이 (double substitution mutant)의 목록과 각각의 시간별 단백질 이동 효율.

앞의 연구에서 F1-ATPase- $\gamma$  subunit의 presequence에 존재하는 DQEEG와 VVRNR 모티프가 애기장대 미토콘드리아로의 단백질 이동에 중요한 역할을 한다는 것을 규명하였다. 이렇게 발견한 모티프들이 F1-ATPase- $\gamma$  subunit 외 다른 애기장대 미토콘드리아 단백질에도 존재하는지 알아보려고 global sequence alignment를 수행하였다. 현재까지의 연구 결과에서 애기장대의 미토콘드리아 단백질에 존재한다고 알려진 198개의 단백질을 문헌 조사를 통해 찾아내었고, 이들 단백질들의 아미노 말단 50개의 아미노산을 모티프 분석을 위한 범위로 지정하여 그 아미노산 서열을 추출하였다. 이들 아미노산 서열에서 DQEEG 또는 VVRNR 모티프와 유사성을 갖는 부분을 alignment하였고 각 부분의 유사성을 통계학적으로 검증하기 위해 BLOSUM52 matrix에 따라 p-value를 계산하였다. 이 때 p-value가 0.2 이하로 계산되는 부분을 각각 DQEEG-like와 VVRNR-like motif로 정의하였다. 분석 결과 198개의 애기장대 presequence 중 각각 32개와 40개의 presequence 에 DQEEG-like 또는 VVRNR-like 모티프

가 존재한다는 것을 알 수 있었다. 이들 중 NDS8B와 FAb의 presequence를 각각 동정하고 각 presequence에서 기능적 모티프로 예측된 부분이 실제로 미토콘드리아로의 단백질 이동에 중요한 역할을 하는지를 실험적으로 알아보려고 하였다.

NDS8B은 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8-B단백질로, 이 단백질의 presequence에서는 DQEEG-like 모티프인 DDEEA (p = 0.024) 와 VVRNR-like 모티프인 ALRAR (p = 0.064) 가 매우 높은 확률로 예측되었다. 이들 두 모티프 후보를 각각 알라닌으로 치환한 돌연변이 presequence를 제작한 뒤 그 이동 효율을 측정해본 결과, pNDS8B[DDEEA/AAAAA]:GFP 의 경우는 pNDS8B:GFP와 거의 동일한 이동 효율 (69% at 24 HAT) 을 보였으나, pNDS8B[ALRAR/AAAAA]:GFP는 같은 시간에 43%의 이동 효율을 보였다. 이는 ALRAR 모티프는 실제로 pNDS8B의 이동 효율에 영향을 미치지, DDEEA 모티프는 이동 효율에 큰 영향을 미치지 않음을 의미한다. 또 다른 예로 ATP synthase subunit  $\beta$ -2의 presequence인 pFA  $\beta$ 를 분석하였고 그 결과 VVRNR-like 모티프인 VVRNPR을 발굴할 수 있었다 (p = 0.070). 이 모티프가 알라닌으로 치환된 돌연변이인 pFA  $\beta$ [VVRNPR/AAAAA]:GFP 의 세포 내 위치와 미토콘드리아로의 이동 효율을 측정해본 결과, 이 돌연변이 presequence의 이동 효율이 야생형인 pFA  $\beta$ :GFP에 비해 약 50% 가량 감소한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 실험 결과들을 토대로, VVRNR 모티프는 다수의 애기장대 미토콘드리아 단백질 이동에 관여하는 중요한 기능적 모티프임을 알 수 있다. 본 연구는 Plant Cell에 발표하였다 (Lee et al., 2012).

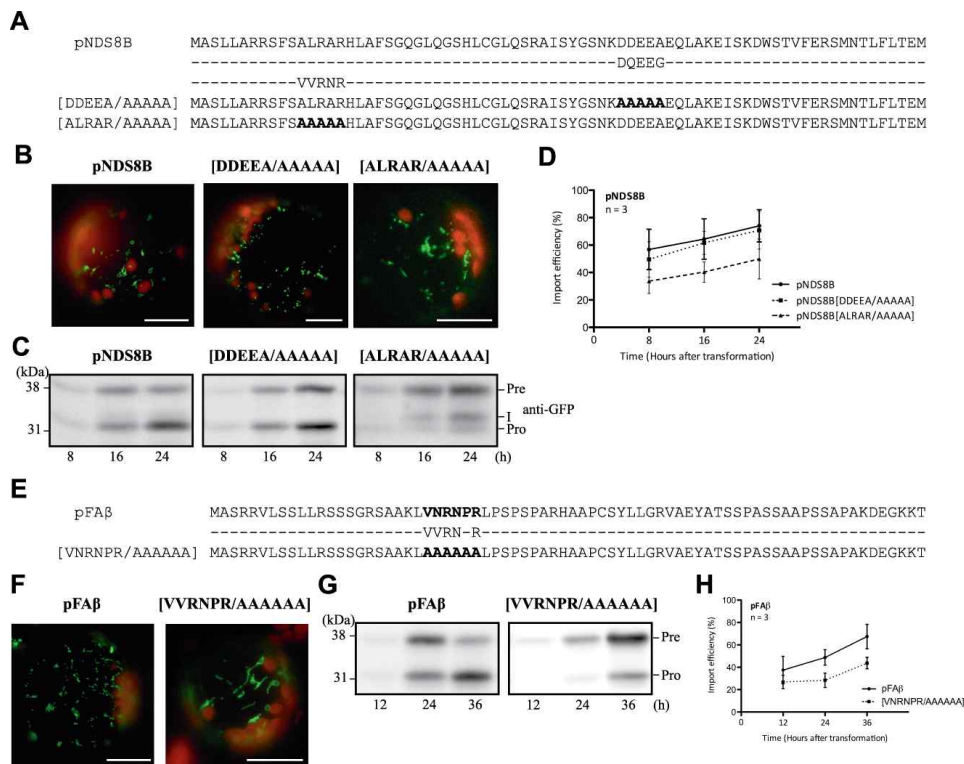


그림 46. NDS8B와 FAb presequence서열과 와 각 presequence의 기능적 모티프 예측 결과

F1-ATPase gamma subunit (accession number: At2g33040; 이하 FA) 단백질의 presequence와, 선행연구로 그 특성을 밝혀낸 RbcS (Rubisco small subunit; At1g67090)의 transit peptide를 이용하여, Presequence와 transit peptide의 아미노산 구성이 서로 상당히 유

사하지만 각 소기관을 특이적으로 구분할 수 있는 분자 기작에 대해 이해하고자 하였다. 각 이동 신호의 아미노 말단에 위치한 서열의 정보가 소기관 특이성 결정 과정에 관여한다는 선행 연구를 바탕으로, 각 신호 펩타이드의 아미노말단 일부분에 미토콘드리아 또는 엽록체로의 단백질 이동을 결정하는 데 필요한 모티프가 존재할 것이라 가설을 세울 수 있었다. 이 가설을 바탕으로 FA presequence와 RbcS transit peptide의 서열 일부분을 서로 맞바꾼 swapping mutant들을 고안하여 제작하였다 (그림 47; A). 예를 들어 tRbcS[12]pFA  $\gamma$ [65] 같은 펩타이드는 아미노 말단 1번부터 12번까지의 아미노산은 RbcS의 transit peptide에서 온 것이고, 그 뒤의 13번부터 79번 아미노산은 FA의 presequence에서 가져온 것이다. 마찬가지로 pFA  $\gamma$  [12]tRbcS[67] 은 RbcS transit peptide의 아미노 말단 1번부터 12번까지의 부분을 FA의 presequence로 치환한 것이다.

이렇게 제작한 swapping mutant peptide에 GFP를 결합한 construct를 제작하여 애기장대 protoplast에 발현시켜 세포 내 위치를 관찰한 결과, tRbcS[12]pFA  $\gamma$ [65]가 엽록체로 이동한 것을 알 수 있었다 (그림 47; B). 이는 돌연변이 펩타이드의 아미노 말단에 위치한, RbcS transit peptide로부터 온 12개의 아미노산이 엽록체로의 단백질 이동을 유도했다는 것을 의미한다. RbcS transit peptide의 아미노 말단 12개만을 포함한 펩타이드는 단백질을 엽록체로 이동시키지 못하기 때문에 (data not shown), 이는 카르복시 말단에 있는, FA presequence로부터 가져온 약 70여 개의 아미노산 서열에 포함된 기능적 모티프들이 엽록체로의 단백질 이동에 기여했다는 것을 뜻한다.

엽록체로의 이동 신호인 RbcS transit peptide의 아미노 말단 부분 아미노산 12개를 미토콘드리아로의 FA presequence로 치환한 돌연변이인 pFA  $\gamma$ [12]tRbcS[67]의 경우는 앞서 수행한 실험결과에 따르면 미토콘드리아로 이동할 것이라 예상했으나, 실험 결과 이 돌연변이 시퀀스는 미토콘드리아나 엽록체로 이동하지 못하고 세포질에 남아있는 양상을 보였다 (그림 47; B). 이러한 현상의 이유를 설명하기 위해, 앞서 발표된 FA presequence의 기능적 모티프 분석 연구 (Lee et al., 2012) 에서 P2b 모티프 (IAARP) 가 Tom20과 상호 작용하는 데 중요한 모티프임을 발견한 사실에 주목하였다. RbcS transit peptide에는 Tom20과의 상호작용에 필요한 모티프가 없기 때문에 미토콘드리아로의 단백질 이동이 불가능할 것이라는 가설을 세울 수 있었다. 이를 테스트해 보기 위해 RbcS transit peptide의 아미노 말단 부분 아미노산 20개를 FA presequence로 치환한 돌연변이인 pFA $\gamma$ [20]tRbcS[59]를 제작하고 그 세포 내 위치를 관찰한 결과, 예상대로 미토콘드리아로의 단백질 이동을 관찰할 수 있었다 (그림 47; B). 이러한 실험 결과들을 바탕으로 각 단백질 이동 신호의 아미노 말단은 각자 소기관으로의 특이적인 이동을 가능하게 하는 부분이며, 그 뒷부분의 신호들은 상호 교환이 가능하다는 사실을 알 수 있었다.

**A**

pFA $\gamma$ (77)	<b>MAMAVFREGRRLLP</b> SIAAIRPIAAIRSPLSSDQEGLLGVRISISTQVVRNRMKSVKNIQKITKAMKMWAAASKLRAVQ
tCab	MASNSLMSCGIAAVYPSLLSSSKSK ---
pFA $\gamma$ (20) tCab (60)	<b>MAMAVFREGRRLLP</b> SIAAIRSSSKSK ---
tDnaJ-J8	MTIALTIGGNFSGGLPGSSFSSSSS ---
pFA $\gamma$ (20) tDnaJ-J8 (60)	<b>MAMAVFREGRRLLP</b> SIAAIRSSSSS ---
tPORA	MALQAASLVSSAFSVRKDGKLNASA ---
pFA $\gamma$ (20) tPORA (60)	<b>MAMAVFREGRRLLP</b> SIAAIRLNASA ---
tTOCC	MEIRSLIVSMNPNLSSFELSRPVSP ---
pFA $\gamma$ (20) tTOCC (60)	<b>MAMAVFREGRRLLP</b> SIAAIRPVSP ---
tGlu2	MALQSPGATGASSVSRLLSSAKLS ---
pFA $\gamma$ (20) tGlu2 (60)	<b>MAMAVFREGRRLLP</b> SIAAIRSAKLS ---

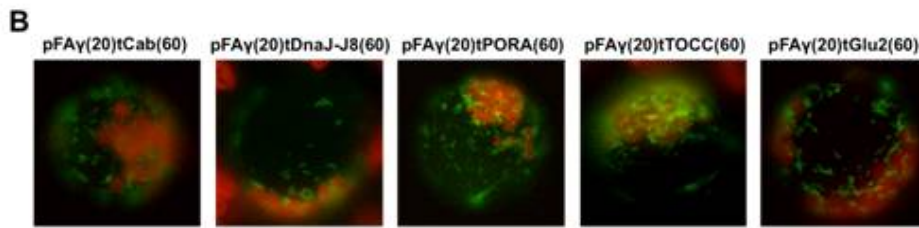


그림 47. The C-terminal regions of tRbcS and pFA  $\gamma$  contain information for protein import into both organelles without specificity.

- (A) Sequences of swapping mutant. Numeral in a bracket represents a number of amino acids corresponding to the pFA  $\gamma$  or tRbcS. Bold letter indicates the sequences from pFA  $\gamma$ .
- (B) Subcellular localization of pFA  $\gamma$ [12]tRbcS[67]:GFP, pFA  $\gamma$ [20]tRbcS[59]:GFP, and tRbcS[12]pFA  $\gamma$ [65]:GFP. The mutants were introduced to protoplasts and their localization was observed by fluorescence microscopy at 24 HAT. To simplify the labels, GFP was omitted from the construct names. Green; GFP; Red, autofluorescence of chlorophyll. Scale bar = 20  $\mu$ m.
- (C) Time-course expression of pFA  $\gamma$ [12]tRbcS[67]:GFP, pFA  $\gamma$ [20]tRbcS[59]:GFP, and tRbcS[12]pFA  $\gamma$ [65]:GFP. Protein extracts from transformed protoplasts at the indicated incubation time points were analyzed by immunoblotting using anti-GFP antibody. Pre, precursor; Pro, processed form; Asterisk, intermediate.

이러한 현상이 RbcS transit peptide와 FA presequence의 조합에 국한된 것인지 아니면 다른 transit peptide 또는 presequence에서도 보존되어 있는 성질인지 여부를 알아보기 위해 다양한 transit peptide와 presequence들을 사용하여 동일한 치환 실험을 수행하였다. 본 연구실에서 앞서 발표한 연구에 따르면, 엽록체의 transit peptide들은 각 펩타이드들이 보유한 모티프의 특성에 따라 크게 일곱 종류의 subgroup으로 분류할 수 있다 (Lee et al., 2008). 이들 각각의 subgroup을 대표하는 transit peptide들을 선정한 뒤, 이들과 FA presequence의 swapping mutant를 앞서 설명한 방법으로 제작하여 각 돌연변이 시퀀스들의 세포 내 이동 양상을 관찰하였다. 실험에서 사용된 transit peptide는 각각 Cab, DnaJ, TOCC, PORA, Glu2였으며, 각 transit peptide들의 아미노 말단 20개 아미노산을 그 위치에 해당하는 FA presequence의 서열로 치환하였다. 실험 결과, 모든 경우의 돌연변이에서 아미노말단 부분이 FA presequence의



아미노말단 서열로 치환되었을 때, 단백질의 이동 양상이 엽록체에서 미토콘드리아로 바뀌는 것을 알 수 있었다(그림 48). 이는 FA presequence의 아미노 말단 부분이 미토콘드리아로의 단백질 이동을 유도하는 성질이 있음을 의미한다.

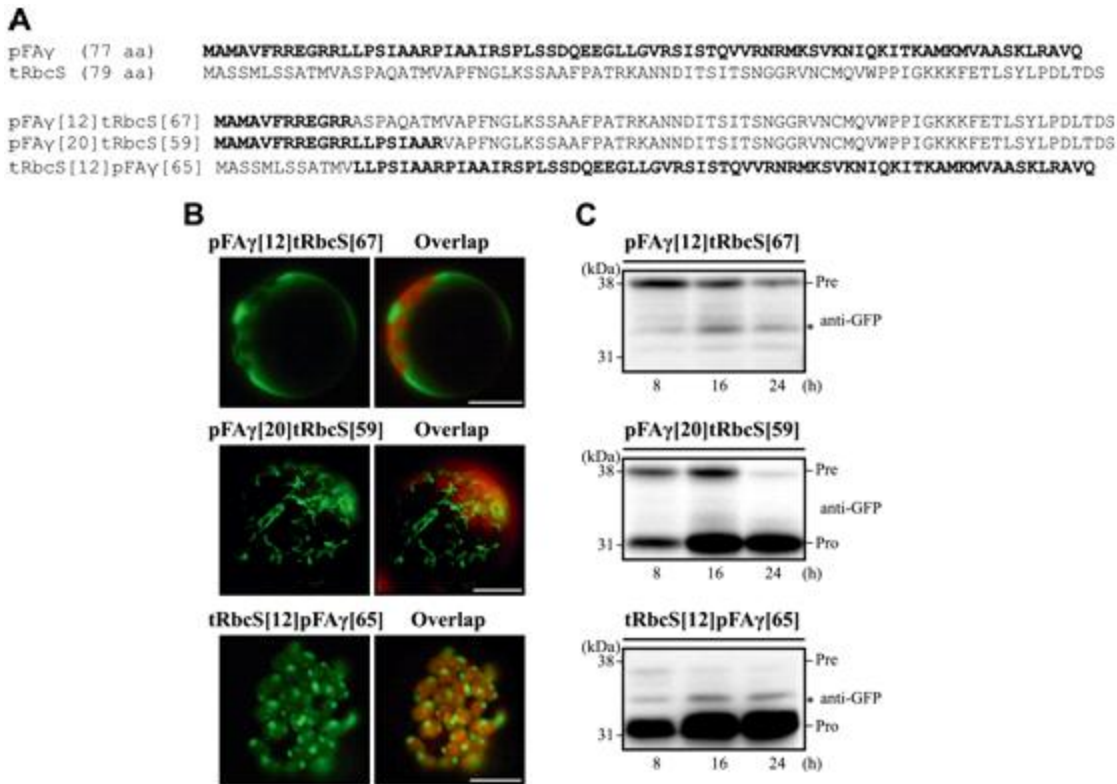


그림 48. The N-terminal region of FA presequence can induce the transit peptides targeted to mitochondria in Arabidopsis protoplasts.

(A) Sequences of swapping mutants. Red letter indicates the sequences derived from FA presequence, and blue letter indicates the sequences from transit peptides. The number in the name is corresponding to the number of amino acids in each targeting sequence.

(B) Subcellular localization of swapping mutants. The mutants were introduced to protoplasts and their localization was observed by fluorescence microscopy at 24 HAT. To simplify the labels, GFP was omitted from the construct names. Green; GFP; Red, autofluorescence of chlorophyll.

#### 나. Signal anchored (SA) membrane protein의 mitochondria targeting 기작 규명

미토콘드리아에도 다양한 SA protein들이 존재한다 (Kanaji et al., 2000; Waizenegger et al., 2003). 미토콘드리아 SA 단백질의 특이적 이동을 결정짓는 요소를 찾기 위해 엽록체 SA 단백질의 이동신호 서열과 비교 분석한 다음 추출된 특이 요소들이 인간 미토콘드리아 SA 단백질의 이동신호 서열에도 존재하는지 알아보았다. 엽록체 및 미토콘드리아 SA 단백질들의 막관통영역 내의 아미노산별 존재 비율은 큰 차이를 보이지 않았지만 미토콘드리아 SA 단백질 막관통 영역의 아미노 및 카르복시 말단 부근에서 3가지 특이적 요소들이 관찰되었다. 첫째, 아미노 말단 부위에 1개 이상의 라이신 또는 아르기닌 등의 양성을 띠는 아미노산이 존재하였



고 둘째, 카르복시 말단 부위에 타이로신, 트립토판 및 페닐알라닌 등의 방향족 아미노산들이 1개 이상 분포하였다. 마지막으로, CPR이 라이신보다는 아르기닌 아미노산 위주로 구성되어 있음을 알 수 있었다 (그림 49; A, B). 식물 미토콘드리아 SA 단백질에서 발견된 3가지 특이적 요소들은 인간 미토콘드리아 SA 단백질들도 공통적으로 가지고 있었고 (그림 49; C) 이를 통해 이런 특이적 요소들은 식물과 동물 미토콘드리아 SA 단백질들의 특이적 수송을 위한 필수 요소임을 추측할 수 있었다 (그림 49; D).

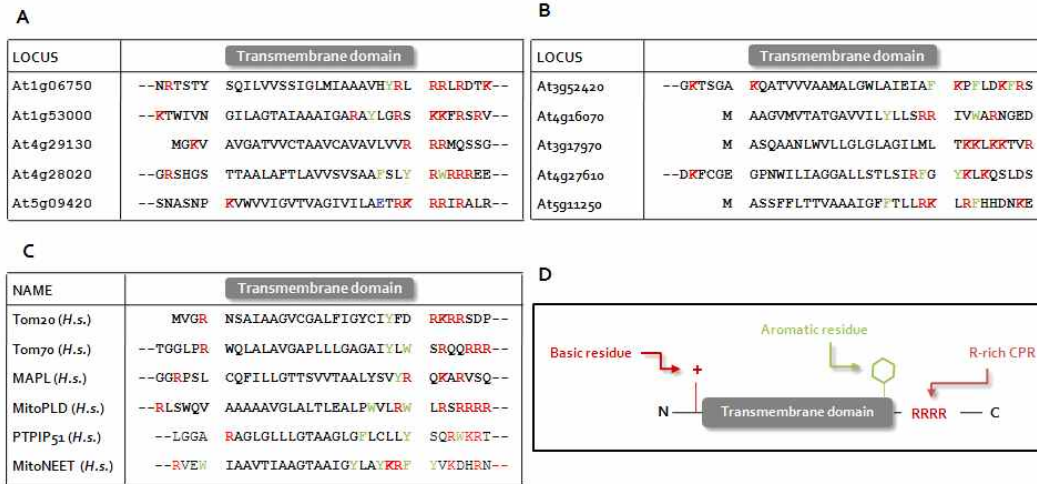


그림 49. 애기 장대 및 인간 내에 존재하는 엽록체 및 미토콘드리아 SA 단백질의 이동신호서열 비교

- (A) 애기 장대 미토콘드리아 SA 단백질들의 이동신호서열
- (B) 애기 장대 엽록체 SA 단백질들의 이동신호서열
- (C) 인간 미토콘드리아 SA 단백질들의 이동신호서열
- (D) 미토콘드리아 SA 단백질 이동신호서열에 존재하는 3가지 특이 요소들

앞서 발견된 3가지 특이 요소들이 실제로 미토콘드리아 SA 단백질의 특이적 이동에 중요한 지 검증하기 위해 3가지 특이 요소들을 변형시킨 다양한 돌연변이체 조합을 제작하여 이들의 세포 내 위치 변화를 관찰하였다. 아미노 말단 부위에 존재하는 양성을 띠는 아미노산은 중성 아미노산인 글라이신으로 바꿔주었고 카르복시 말단 부위에 존재하는 방향족 아미노산들은 같은 소수성 아미노산이 알라닌으로 치환하였다. CPR의 경우 아르기닌을 라이신으로 치환함으로써 라이신 위주의 CPR로 바꿔주었다. 하나의 요소만 바꿔주었을 때에는 세포 내 큰 위치 변화는 나타나지 않았다 (그림 50; A). 하지만, 2개 이상의 특이 요소를 변형시켰을 경우 기존의 미토콘드리아로 이동하던 SA 단백질들의 상당량이 엽록체에 존재함을 현미경을 통해 확인할 수 있었다 (그림 50; B). 더불어 3개의 특이 요소들을 모두 바꿔주었을 때 SA 단백질의 이동 방향이 엽록체로 대부분 옮겨 갔음을 알 수 있었다 (그림 50; C). 이를 통하여 이동신호서열 분석을 통해 밝혀진 미토콘드리아 SA 단백질에 존재하는 3가지 특이 요소들은 SA 단백질의 미토콘드리아 특이적 이동에 매우 중요함을 알 수 있고 이들 요소들은 각각 독립적으로 작동하기 보다는 서로 유기적으로 연결되어 미토콘드리아 이동을 매개하고 있음을 유추할 수 있었다.

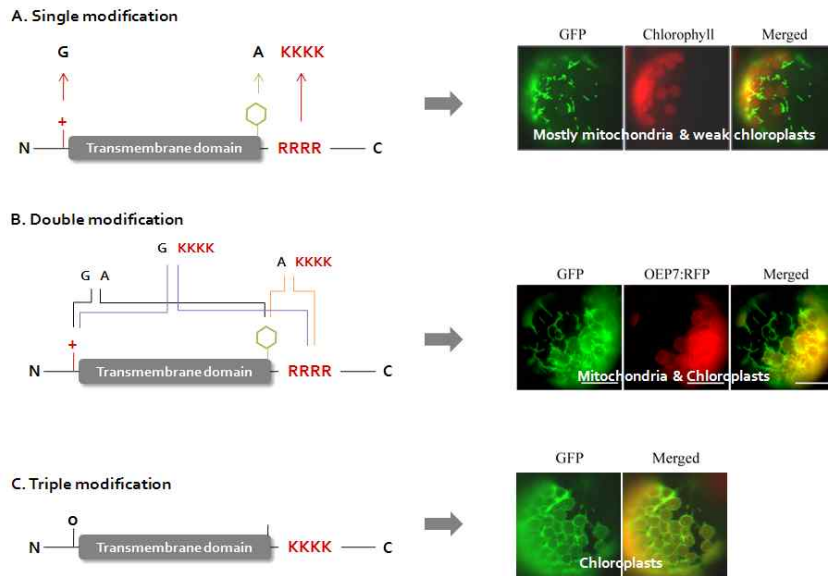


그림 50. 미토콘드리아 SA 단백질의 3가지 특이 요소들의 돌연변이체의 세포 내 위치 동정 및 비교

- (A) 미토콘드리아 SA 단백질의 3가지 특이 요소들 각각의 돌연변이체의 세포 내 위치 변화
- (B) 미토콘드리아 SA 단백질의 3가지 특이 요소들 중 2개씩 그룹을 지어 돌연변이체를 만들었을 때 세포 내 위치 변화
- (C) 미토콘드리아 SA 단백질의 3가지 특이 요소들을 모두 묶어서 돌연변이체를 만들었을 때 세포 내 위치 변화

이전 연구 결과를 통해서 애기 장대 미토콘드리아 SA 단백질의 이동 신호 서열에는 3가지 특이 요소가 공통적으로 존재함을 확인하였다. 3가지 특이 요소는 막관통영역을 중심으로 했을 때 아미노 말단 부위의 라이신 또는 아르기닌 등의 양성을 띠는 아미노산, 카르복시 말단 부위의 타이로신, 트립토판 등의 방향족 아미노산, 아르기닌 아미노산 위주로 구성되어 있는 CPR들이다. 이들 3가지 특이 요소들을 변형시킨 일련의 미토콘드리아 SA 단백질 돌연변이체들을 통해 3가지 특이 요소들이 미토콘드리아로의 특이적 이동에 중요함을 알 수 있었다. 이번 연구에서는 소기관 분리를 통해 특이 요소 변화 시 미토콘드리아 SA 단백질들의 세포 내 위치 변화를

검증하고 특이 요소를 엽록체 SA 단백질 또는 미토콘드리아/엽록체 동시 이동 SA 단백질에 도입했을 때 미토콘드리아로의 이동이 유도되는 지 여부를 관찰하여 그 중요성을 검증해 보고자 하였다. At1g53000은 식물 미토콘드리아 SA 단백질 중의 하나로서 이동 신호 서열에 앞서 언급한 3가지 특이 요소를 모두 가지고 있다 (그림 51; A). 이 중 하나 또는 두 개의 특이 요소를 변화시켰을 때는 At1g53000의 세포 내 위치가 크게 달라지지 않고 대부분 정상적인 미토콘드리아 패턴을 보였다. 하지만, 3가지 특이 요소를 모두 변화시킨 돌연변이체 KtoG\_YtoA\_K6의 경우 미토콘드리아로 이동하는 대신 엽록체에서 대부분 관찰되었다 (그림 51; B). 엽록체 분리를 수행하여 이 돌연변이체가 실제로 엽록체에 존재하는지를 western blot 분석을 통한 생화학적 기법으로 검증해 보았을 때, 80% 이상의 돌연변이체 단백질이 엽록체 분리 층에서 검출됨을 확인할 수 있었다 (그림 51; C). 이런 형광 현미경 관찰과 엽록체 분리 후 생화학적 분석을

통해 볼 때 미토콘드리아 SA 단백질의 3가지 특이 요소는 SA 단백질의 엽록체 이동을 억제하고 대신 미토콘드리아 이동을 매개하고 있음을 알 수 있다.

미토콘드리아로의 특이적 이동에 있어서 3가지 특이 요소의 중요성을 보다 면밀히 검증하기 위해 엽록체 SA 단백질의 이동신호서열에 3가지 특이 요소를 도입하여 세포 내 위치 변화를 동정해 보았다. 엽록체 SA 단백질들의 경우 3가지 특이 요소들을 이동신호서열에 가지고 있지 않고 이런 특이 요소 결핍으로 인해 미토콘드리아 대신 엽록체로 이동할 것으로 예상하고 있었다 (그림 52; A). 실험에 사용된 엽록체 SA 단백질들은 AtToc64과 At5g11250 이고 각각의 이동신호서열에 미토콘드리아의 3가지 특이 요소들을 도입하였을 때 AtToc64의 돌연변이체인 +R\_LtoY\_R5는 미토콘드리아와 엽록체로 동시에 이동하는 것을 형광현미경을 통해 관찰할 수 있었다. At5g11250 역시 3가지 특이 요소를 도입한 돌연변이체 +R\_LtoY\_R6의 미토콘드리아 이동이 크게 증가하고 엽록체에서는 거의 관찰되지 않았다 (그림 52; B). 이를 통해 볼 때 3가지 특이 요소들은 SA 단백질의 엽록체 이동을 크게 억제하고 미토콘드리아 이동을 유도하고 있음을 알 수 있다.

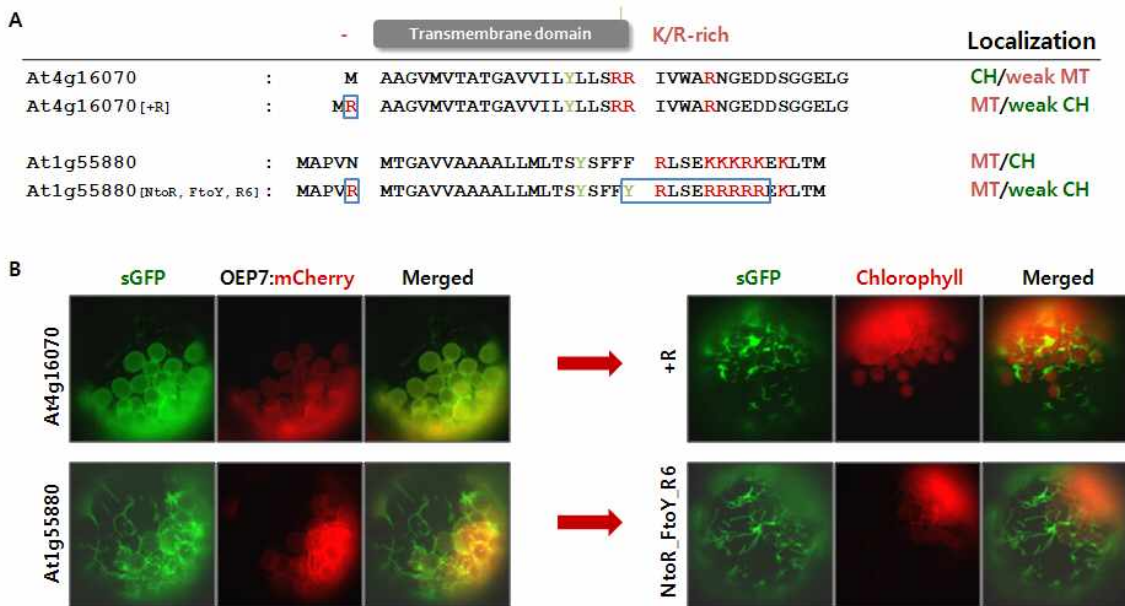


그림 51. At1g53000과 돌연변이체의 세포 내 위치 변화

(A) 애기 장대 미토콘드리아 SA 단백질인 At1g53000과 돌연변이체들의 이동신호서열

(B) 애기 장대 미토콘드리아 SA 단백질인 At1g53000과 돌연변이체들의 세포 내 위치와 그 변화

(C) 엽록체 분리와 western blot 분석을 통한 At1g53000과 돌연변이체들의 세포 내 위치 검증

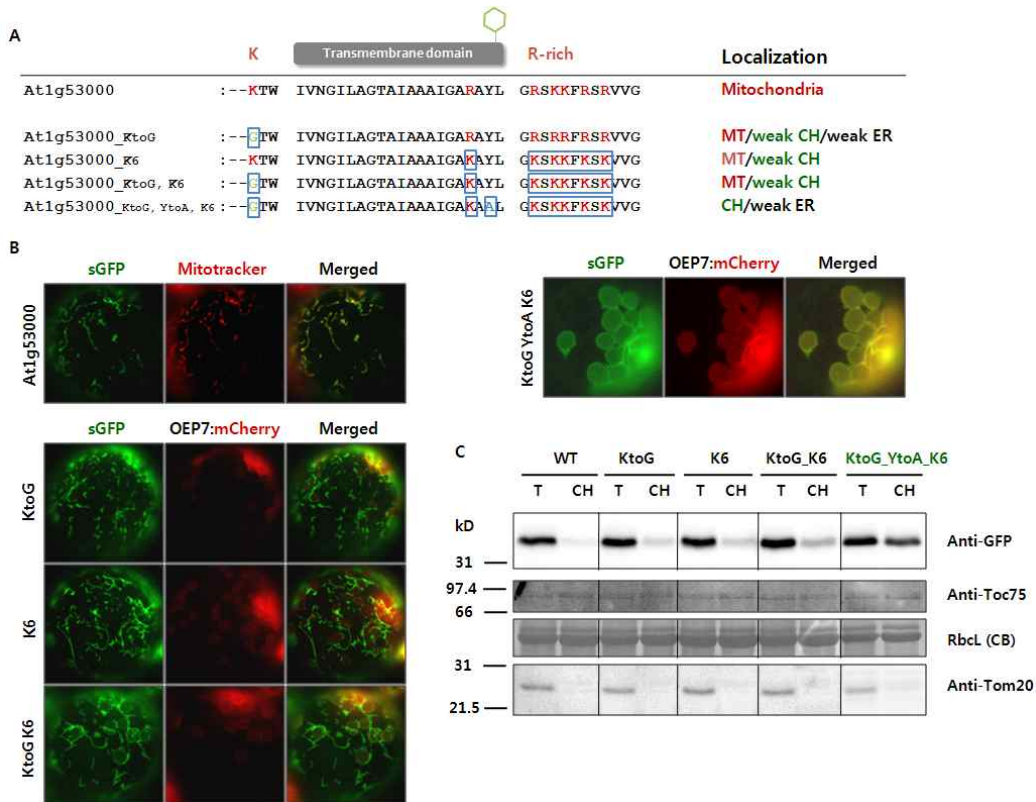


그림 52. AtToc64, At5g11250과 각각의 돌연변이체의 세포 내 위치 변화

(A) 애기 장대 엽록체 SA 단백질인 AtToc64, At5g11250과 각각의 돌연변이체들의 이동신호서열

(B) 애기 장대 엽록체 SA 단백질인 AtToc64, At5g11250과 각각의 돌연변이체들의 세포 내 위치와 그 변화

3가지 특이 요소의 미토콘드리아 이동 유도성을 더 검증하기 위해 미토콘드리아와 엽록체로 동시에 이동하는 단백질을 사용하여 3가지 특이 요소들을 도입해 보았다. 이들 동시 이동 단백질들은 미토콘드리아 또는 엽록체 SA 단백질들과는 달리 3가지 특이 요소들을 1 또는 2개 식으로 부분적으로 가지고 있다. 미토콘드리아 SA 단백질의 경우 3가지 특이 요소 중에 1 또는 2개를 변형시켰을 때 미토콘드리아와 엽록체로 동시 이동한 패턴을 보여주고 있다. 그러므로 엽록체/미토콘드리아 동시 이동 SA 단백질 역시 불완전한 특이 요소 조합으로 인해 양쪽 소기관으로 이동하고 있다고 추측해 볼 수 있다. 이를 증명하기 위해 동시 이동 SA 단백질인 At4g16070과 At1g55880을 이용하여 특이 요소를 회복시킨 돌연변이체를 제작해 보았다. At4g16070은 3가지 특이 요소 중 하나인 아미노 말단 부위에 위치하는 양성을 띠는 아미노산이 존재하지 않는다 (그림 53; A). At4g16070의 아미노 말단 부위에 양성을 띠는 아미노산이 아르기닌을 인위적으로 도입했을 때 그의 돌연변이체인 At4g16070\_+R이 미토콘드리아로 대부분 이동하는 것을 형광 현미경을 통해 관찰할 수 있었다 (그림 53-B). 또 다른 동시 이동 단백질인 At1g55880의 경우 3가지 특이 요소 중 하나인 방향족 아미노산 타이로신을 가지고 있지만 그 정확한 위치인 카르복시 말단에 존재하고 있지는 않다 (그림 53; A). 이렇듯 불완전한 특이 요소 구성을 가진 At1g55880을 변형하여 전형적인 미토콘드리아 SA 단백질처럼 특이 요소들을 도입시켰을 때 그 돌연변이체인 NtoR\_FtoY\_R6는 미토콘드리아로 주로 이동하였고 엽록



체로 이동한 단백질은 거의 관찰하기 어려웠다 (그림 53; B). 이러한 결과들은 종합해 보았을 때 동시 이동 단백질은 불완전한 특이 요소 구성으로 인해 엽록체와 미토콘드리아로 동시에 이동할 수 있다고 추측할 수 있고 3가지 특이 요소들은 다양한 SA 단백질들의 미토콘드리아 이동을 좌우하고 있다고 결론을 내릴 수 있다.

식물에서 발견된 3가지 특이 요소들이 다른 종에 존재하는 미토콘드리아 SA 단백질들의 특이적 수송에도 중요한 지 알아보기 위해 효모와 인간의 대표적 미토콘드리아 SA 단백질들을 선정하여 앞서와 마찬가지로 3가지 특이 요소들을 변형한 돌연변이체를 제작한 다음 식물 및 동물 세포 내에서의 위치 변화를 동정하였다. 먼저 식물 세포 내에서 발현 시 효모 및 인간 미토콘드리아 SA 단백질들 모두 정상적으로 미토콘드리아로 이동하였다. 그리고 3가지 특이 요소들을 바꿔 주었을 때 각각의 돌연변이체들은 식물 미토콘드리아 SA 단백질들의 경우와 마찬가지로 그 이동 경로가 미토콘드리아에서 엽록체로 변경되었음을 확인할 수 있었다 (그림 54; A). 인간 미토콘드리아 SA 단백질과 그 돌연변이체를 동물 세포인 HEK293 cell line에 발현시켰을 때에는 정상 단백질의 경우 예상대로 미토콘드리아로 이동한 반면 3가지 요소가 결여된 돌연변이체의 경우 어느 소기관으로도 이동하지 못하고 세포질에 남아있는 모습을 보였다 (그림 54; B). 이 두 결과들을 토대로 볼 때 식물 미토콘드리아 SA 단백질에서 발견된 3가지 특이 요소들은 효모 및 인간 미토콘드리아 SA 단백질에서 공통적으로 존재할 뿐 아니라 미토콘드리아 이동에도 중추적인 역할을 수행함을 알 수 있다.

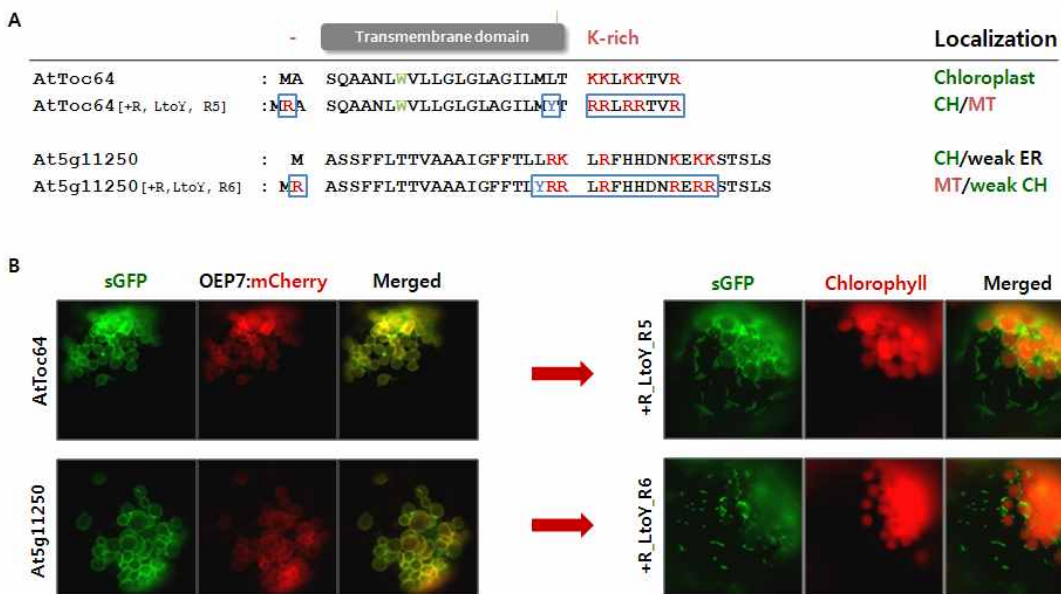


그림 53. At4g16070, At1g55880과 각각의 돌연변이체의 세포 내 위치 변화

- (A) 애기 장대 엽록체/미토콘드리아 동시 이동 SA 단백질인 At4g16070, At1g55880과 각각의 돌연변이체들의 이동신호서열
- (B) 애기 장대 엽록체/미토콘드리아 동시 이동 SA 단백질인 At4g16070, At1g55880과 각각의 돌연변이체들의 세포 내 위치와 그 변화

### Triple modification

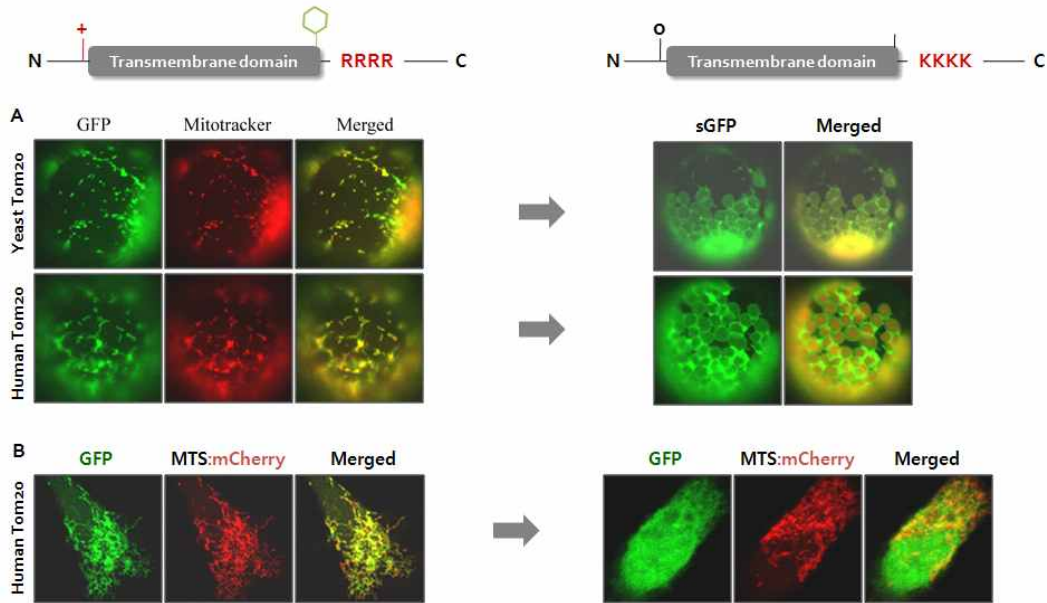


그림 54. 효모 및 인간 미토콘드리아 SA 단백질의 3가지 특이 요소들의 돌연변이체의 세포 내 위치 동정 및 비교

- (A) 효모 및 인간 미토콘드리아 SA 단백질들과 각각의 3가지 특이 요소 돌연변이체들의 식물 세포 내 위치 동정
- (B) 인간 미토콘드리아 SA 단백질과 3가지 특이 요소 돌연변이체의 HEK293 세포 내 위치 동정

### 4. Protein trafficking기작의 규명을 통한 단백질 고축적 기술 개발

가. AtYip1A의 식물 세포 내 protein trafficking 에서의 역할 규명에 대한 연구:

최근에 연구된 AtPRA1은 animal Yip3인 PRA1의 Arabidopsis homologue protein으로 animal에서와 마찬가지로 여러 Rab protein들과의 interaction 가능성을 보여주었다 (Bucci et al., 1999; Figueroa et al., 2001; Calero and Collins, 2002; Lee et al., 2011b). 이런 PRA1외에 활발히 연구된 다른 Yip subfamily는 yeast Yip1으로, COPII vesicle formation에 중요한 역할을 하며 knock mutant의 경우 lethal한 것으로 보고되는 등 중요한 역할을 담당한다고 알려졌다. 하지만 아직까지 Yip1의 Arabidopsis homologue protein들에 대한 연구는 진행된 바가 없었다. 이번 연구는 Arabidopsis의 Yip1 homologue인 AtYip1A에 대한 첫 보고로써, AtYip1A가 식물 세포에서 어떤 trafficking pathway를 담당하는지를 localization test, interaction partner protein 찾기를 통해 알아보려고 하였다. 또한 AtYip1A의 overexpression이 다른 protein의 intracellular trafficking이나 세포 내에서의 behavior에 미치는 영향을 파악, 이를 통해 식물세포 내 protein 들의 trafficking mechanism을 좀 더 세밀히 이해하고자 하였다.

Arabidopsis 내에는 7개의 Yip1 homologue protein들이 존재하며 그 중 Yip1과 가장 homology가 높은 AtYip1A의 기능을 규명하기 위해 AtYip1A의 N-terminus에 T7 tagging을 지닌 fusion protein construct를 제작하여 protoplast에서 발현시켜 보았다 (그림 55). 이 T7:AtYip1A를 이용하여 AtYip1A의 식물 내에서의 localization을 파악하고자 Dex-inducible promoter



system을 이용한 transgenic plant를 만들어 발현형태를 관찰하였다. Western blotting 결과에서 나타나듯이 pTA::T7:AtYip1A transgenic plant는 뿌리에서만 그 발현이 확인되었고 immunohistochemistry로 signal을 직접 detection하는 경우에도 뿌리에서만 발현형태를 확인할 수 있었다. 잎과 뿌리에서 각각 protoplast를 isolation해서 immunostaining을 진행하였을 때에도 뿌리에서만 ER과 punctate signal이 관찰되었다 (그림 56). 다른 marker protein과 localization을 비교하여 좀 더 세밀한 localization pattern을 관찰하기 위해, PEG transformation method를 통해 leave protoplasts에 T7:AtYip1A나 GFP:AtYip1A를 다른 marker proteins를 함께 발현시켜 immunostaining을 실시하였다. 그 결과, AtYip1A는 ER과 ERES (ER exit site)에 존재함을 확인하였다 (그림 57).

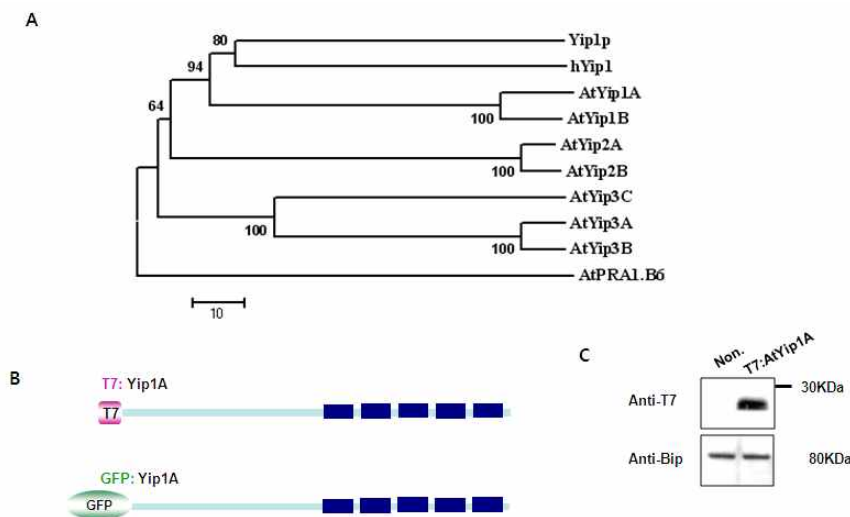


그림 55. AtYip1A is the homologue of Yip1p in *Arabidopsis thaliana*

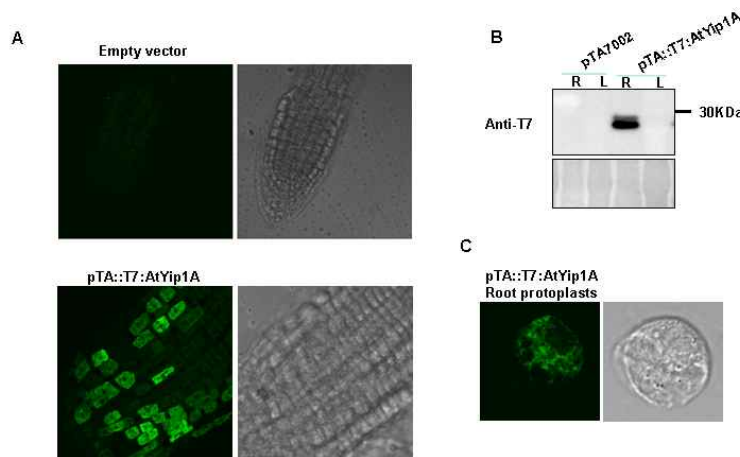


그림 56. Localization patterns of T7:AtYip1A in pTA::T7:AtYip1A transgenic plants

지금까지 Yip family protein들은 Rab 이라고 불리는 small GTPase protein들과 interaction 하며 작용한다고 보고되었던 점에 착안하여, AtYip1A의 interaction partner 역시 ER과 ERES상의 Rab protein일 가능성이 높을 것이라고 예상하였다. AtSar1p는 ERES에 존재하

며 COP II vesicle을 통해 ER에서의 anterograde trafficking의 key protein이지만, 그 interaction partner는 COP II vesicle component 외엔 아직까지 알려진 바가 없는 protein이다. 이 AtSar1p:HA와 T7:AtYip1A를 protoplast에 함께 발현시켜서 co-immunoprecipitation을 실시한 결과, AtYip1A가 AtSar1p와 interaction함을 알 수 있었다. 또한 AtYip1A의 cytosolic

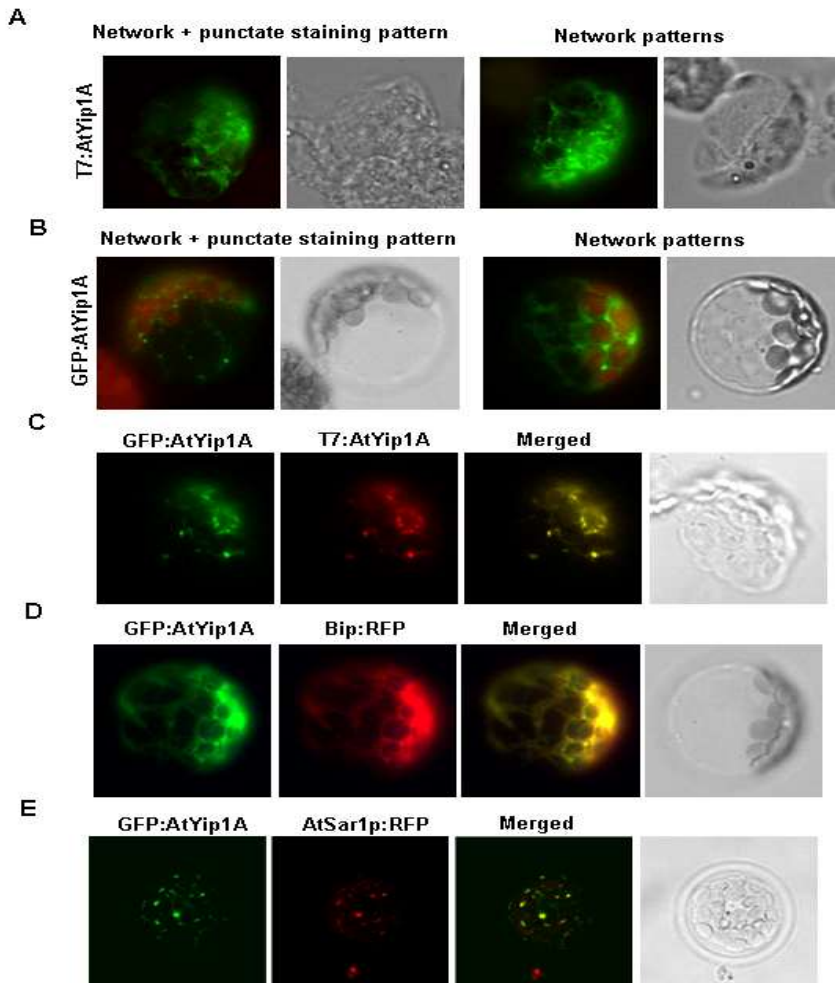


그림 57. AtYip1A localizes to the ER and ERES in protoplasts

region 만을 지닌 T7:AtYip1Ad1 mutant를 만들어 AtSar1p와의 interaction을 같은 방식으로 실험한 경우에도 두 protein간의 interaction이 확인되었다. 이 실험으로 AtYip1A의 interaction partner가 AtSar1p이며, AtYip1A의 cytosolic region이 interaction에 관여함을 알 수 있었다 (그림 58). 본 연구는 Plant Physiology에 발표되었다 (Jung et al., 2011; Lee et al., 2011b)

AtYip1A의 function을 알아보기 위해 overexpression시 다른 marker protein들에 어떤 영향을 끼치는 지를 실험하였다. Central vacuole로 targeting 되는 AALPI:GFP의 경우, control과 달리 T7:AtYip1A가 과발현되면 ER에서 빠져나가지 못하고 accumulation되고 있음이 현미경으로 관찰되었고 Western blot analysis에서도 protein processing band pattern 차이를 통해 드러났다. ER에서 Golgi를 거쳐 secretion되는 Inv:GFP 또한 ER에서 빠져나가지 못하고 trafficking이 저해되는 양상을 보였다 (그림 59).

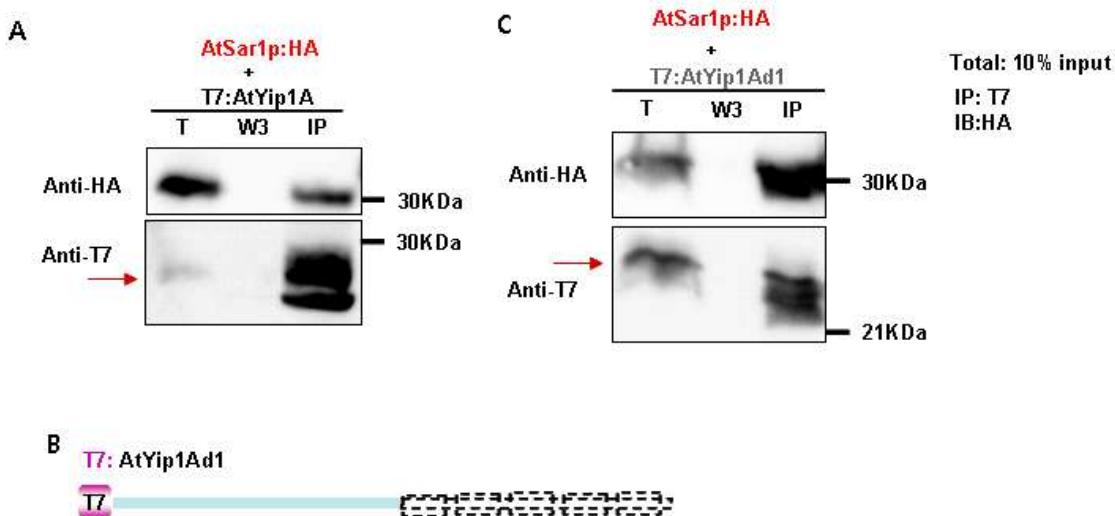


그림 58. AtYip1A interacts with AtPRAL.B6, AtSar1p using its cytosolic domain. Co-immunoprecipitation was performed using protoplasts transformed with AtSar1p:HA and T7:AtYip1A or T7:AtYip1Ad1, a AtYip1A transmembrane deletion mutant. When T7:AtYip1A or T7:AtYip1Ad1 was precipitated with anti-T7 antibody, AtSar1p:HA was detected in precipitated fraction.

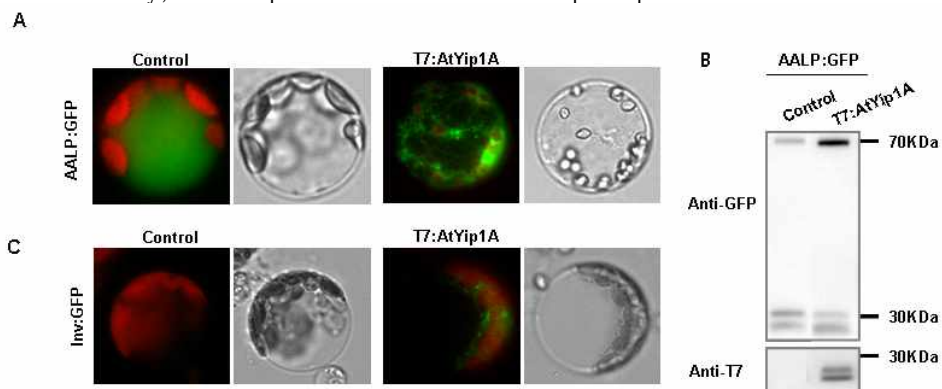


그림 59. Effects of AtYip1A overexpression on the several cargoes trafficking. When T7:AtYip1A was overexpressed with AALP:GFP or Inv:GFP into protoplasts, AtYip1A inhibited anterograde trafficking of these cargoes at the ER.

이러한 AtYip1A overexpression의 negative effect의 원인을 찾기 위해 AtYip1A의 interaction partner인 AtSar1p에 AtYip1A가 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해, 우선 AtSar1p의 subcellular fractionation을 실시하였다. 지금까지 Yip1 family protein들은 Rab protein의 membrane binding을 촉진시키는 interaction partner이자 일종의 recruitment factor로 Rab protein의 subcellular fraction에 영향을 미친다고 보고되어 왔다. 하지만 실제 protoplast에 T7:AtYip1A와 AtSar1p:HA를 함께 발현시킨 뒤 fractionation을 실시하였을 때, 오히려 AtYip1A의 overexpression이 AtSar1p의 soluble fraction을 증가시키는 결과를 보였다 (그림 60).

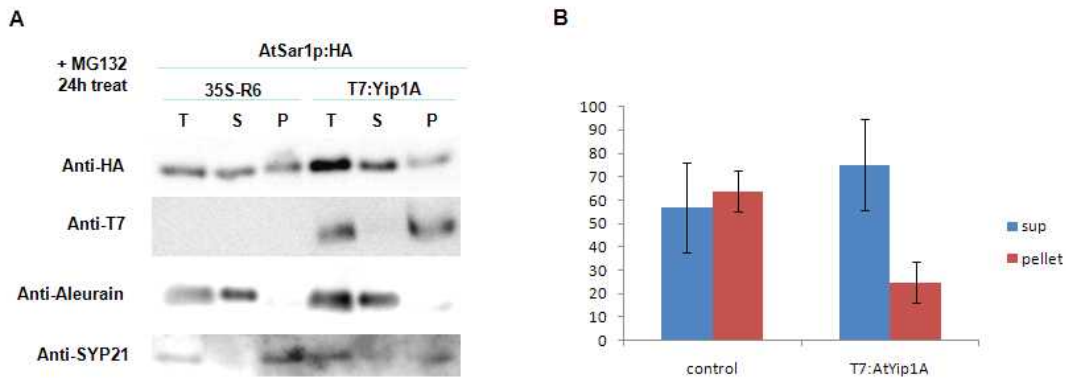


그림 60. Increase of soluble fraction of AtSar1p:HA under T7:AtYip1A overexpression Protein extracts from protoplasts co-transformed with AtSar1p:HA and T7:AtYip1A were fractionated into soluble and membrane fraction. The amount of soluble form of AtSar1p was increased under overexpression of AtYip1A.

이런 결과는 AtYip1A의 overexpression이 왜 cargo protein들의 anterograde trafficking을 ER에서 저해했는가에 대한 의문에 AtSar1p의 GDP에 binding한 soluble form을 증가시키기 때문이란 답을 주지만, 이것은 기존에 연구된 Yip family protein들과는 상반되는 결과이다. 실제로 AtYip1A가 AtSar1p의 행동에 어떤 영향을 끼치는 지 알아보기 위해 MBP fusion된 MBP:AtYip1A와 His tagging된 AtSar1p:His을 *E.coli*에서 발현시키고 purify한 protein들을 이용하여 AtSar1p의 GTPase activity를 실험하였다. MBP 만을 넣어준 control과 달리, MBP:AtYip1A가 있을 때 AtSar1p가 GTP를 GDP로 hydrolysis하는 activity가 더 증가함을 보여주었다. 이는 AtYip1A가 AtSar1p의 GTPase activity를 증가시키는 역할을 함을 말한다 (그림 61).

In vitro 실험이 아닌 in vivo에서 AtYip1A가 AtSar1p의 행동에 어떤 영향을 끼치는지 알아보기 위해 protoplasts에서 AtSar1p:RFP를 이용해 FRAP(Fluorescence recovery after photobleaching) test를 실시하였다. Control에서 bleaching 후 AtSar1p:RFP의 signal이 서서히 회복된 것과 달리, T7:AtYip1A를 overexpression시 거의 recovery가 일어나지 않음이 드러났다 (그림 62). 이것은 AtYip1A의 overexpression이 AtSar1p의 membrane으로의 recycling을 저해하고 있음을 말해주며, subcellular fractionation 실험이나 AtSar1p GTPase activity 실험의 결과와도 일치하는 결과이다. 일련의 실험을 통해, 식물에서 처음으로 Yip1p의 homologous protein인 AtYip1A의 localization을 확인하고 AtSar1p라는 interaction partner를 가지는 것을 알 수 있었다. AtSar1p의 새로운 partner로써 확인된 것뿐만 아니라, 지금까지 yeast나 animal Yip family protein들에 대해 알려진 것과 다른 새로운 function을 규명하여 intracellular trafficking mechanism에 대한 새로운 이해를 더할 수 있었다.

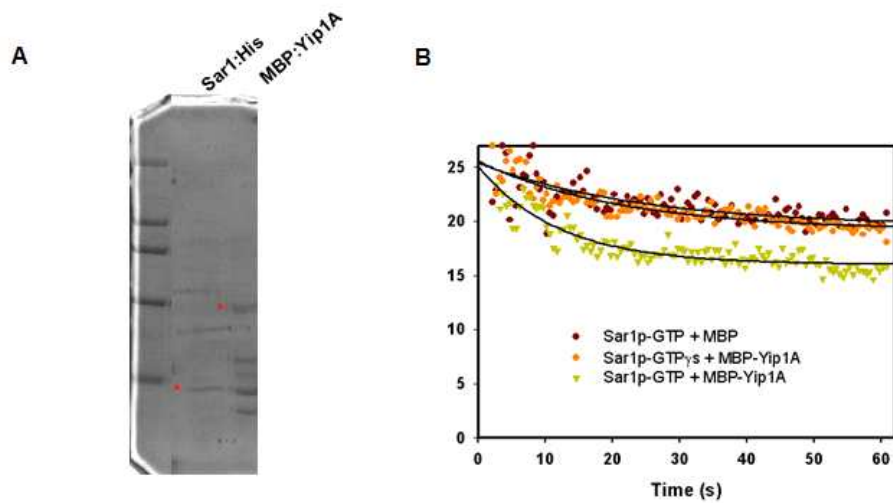


그림 61. GTPase activity assay of AtSar1p:His with MBP:AtYip1A

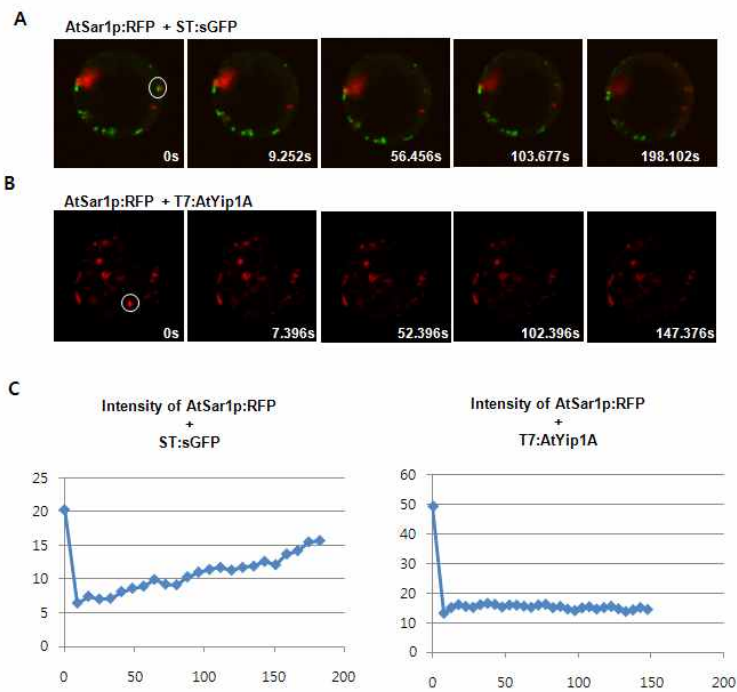


그림 62. FRAP of AtSar1p:RFP under T7:AtYip1A overexpression

When AtSar1p:RFP transformed into protoplasts was photobleached its signal was recovered.

However, under T7:AtYip1A overexpression, AtSar1p:RFP signal was not recovered at all.

AtPRA1.B6의 기능을 추가적으로 연구하기 위해서 과발현에 의한 anterograde trafficking에서의 기능을 규명하고자 하였다. AtPRA1(AtPRA1.B6)이 과 발현된 Transgenic plants와 Transient expression system을 통해 AtPRA1이 ER과 Golgi에 존재한다는 결과를 얻은 후, AtPRA1의 N-말단과 C-말단이 제거된 mutant를 만들어 세포내 위치를 관찰하였다. AtPRA1의 N-말단이 제거된 mutant는 PVC (prevacuolar compartment) 로 위치가 변하고, C-말단을 제거한 mutant는 ER에 머문다는 결과를 얻었다. 따라서 N-말단이 Golgi retention에 중요하고 C-말단이 ER에서 Golgi로의 위치 이동에 중요한 역할을 한다는 결과를 얻었다. 또한 AtPRA1의 발현 level이 높아짐에 따라 ER에 더 많이 존재한다는 결과를 얻었다. 따라서 AtPRA1이 ER에서 anterograde pathway에서 기능을 할 것이라는 추측을 하였고 그 역할을 규명하고자 하였다. 우선 ER에서 AtPRA1이 과 발현 되었을 때 수송단백질들의 localization에 영향을 줄 것이라는 가설을 세웠다. 이를 증명하기 위해 AtPRA1의 발현 level이 낮아지는 RNAi plant를 제조한 후 qRT-PCR로 확인을 하였다. 우선 AtPRA1 과 발현 식물체나, Wild type 식물의 Protoplast에서 AtPRA1을 과 발현 시킨 상태에서 액포에 localization 되는 Sporamin:GFP 또는 AALP:GFP를 같이 발현 시켰을 때 단백질의 액포로의 이동이 저해가 되는 것을 확인하였다 (그림 63)

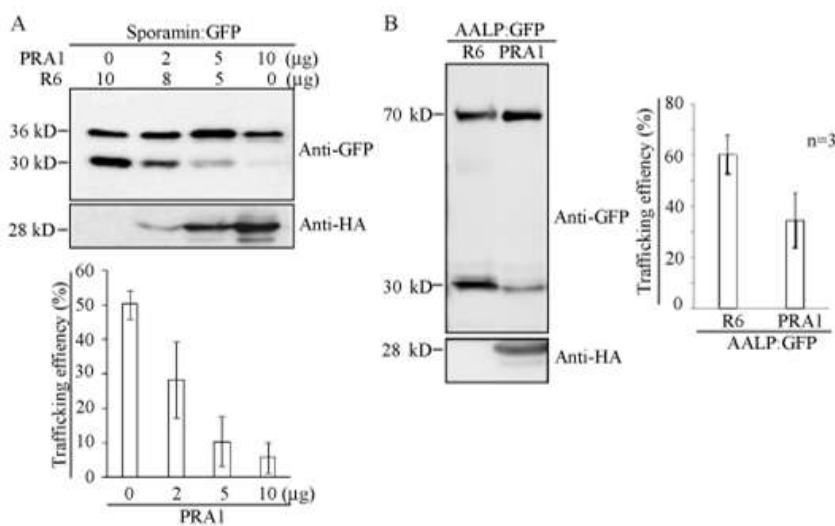


그림 63. HA:AtPRA1.B6 expressed transiently in protoplasts inhibits the trafficking of sporamin:GFP and AALP:GFP in a dose-dependent manner.

A, Inhibition of vacuolar trafficking of sporamin:GFP to the vacuole by HA:AtPRA1.B6 in a dose-dependent manner.

B, Inhibition of vacuolar trafficking of AALP:GFP by HA:AtPRA1.B6. AALP:GFP was cotransformed with HA:AtPRA1.B6 or R6 into protoplasts, and protein extracts from protoplasts were analyzed by western-blot analysis using anti-GFP and anti-HA antibodies.

AtPRA1의 level이 낮은 경우에는 protein의 trafficking에 어떤 영향이 있는지를 규명하기 위해서 AtPRA1에 대한 RNAi transgenic plant를 만들었다. Homozygote plant를 selection하여 다양한 cargo를 이용하여 protein trafficking에 대한 영향을 조사하였다. Vacuole로 targeting되는 AALP:GFP를 이용하여 vacuolar trafficking에 대한 영향을 조사하였다. Protoplast



를 AtPRA1 RNAi plant에서 얻어서 AALP:GFP를 transformation한 후 AALP:GFP의 trafficking을 Western blot analysis를 통해서 확인하였다. 그 결과 overexpression line에서와는 반대로 AALP:GFP의 trafficking이 더 많은 것을 관찰할 수 있었다 (그림 64).

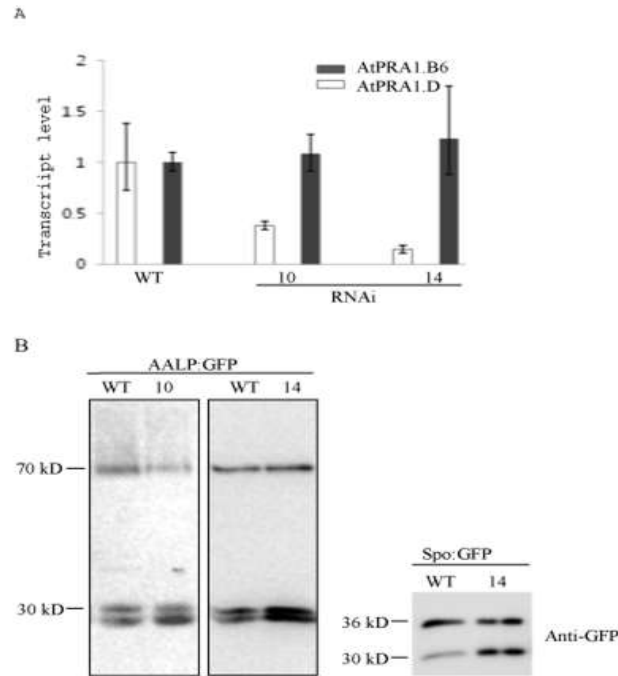


그림 64. Trafficking efficiency of vacuolar proteins is increased in AtPRA1.B6 RNAi plants. A, qRT-PCR analysis of AtPRA1.B6 transcript levels in RNAi plants. Total RNA was obtained from RNAi plants and used for qRT-PCR analysis with gene-specific primers. As a negative control, AtPRA1.D, a homolog of AtPRA1.B6, was included. Actin levels were used as an internal control.

B, Trafficking efficiency in RNAi plants. Protoplasts from two independent RNAi plants (lines 10 and 14) were transformed with sporamin:GFP or AALP:GFP, and their trafficking to the vacuole was examined by western-blot analysis using anti-GFP antibody.

이 결과로 AtPRA1이 액포로의 단백질 이동에 중요한 기능을 한다는 것을 알 수 있었다. 다른 위치로 이동하는 단백질들에서의 영향도 알아보기 위해 세포막 밖으로 secretion되는 invertase:GFP, 세포막으로 localization되는 H<sup>+</sup>-ATPase:GFP 와 PMP:GFP의 이동을 조사하였다. 마찬가지로 AtPRA1 RNAi transgenic plant로부터 protoplast를 만든 후 invertase:GFP와 H<sup>+</sup>-ATPase:GFP construct를 각각 transformation한 후, invertase:GFP의 경우 western blot analysis를 통해서, H<sup>+</sup>-ATPase:GFP의 경우 fluorescence microscopy를 통해서 trafficking을 확인하였다. 특히 invertase:GFP의 경우 protoplast 뿐만 아니라 incubation medium으로부터 protein extract를 확보하여 Western blot analysis를 하였다 (그림 65). 그 결과 invertase:GFP의 trafficking이 AtPRA1의 overexpression인 경우에는 감소함을 관찰할 수 있었다. 마찬가지로 H<sup>+</sup>-ATPase의 세포막으로의 이동이 감소하는 것을 형광 현미경을 통해 확인하였다.

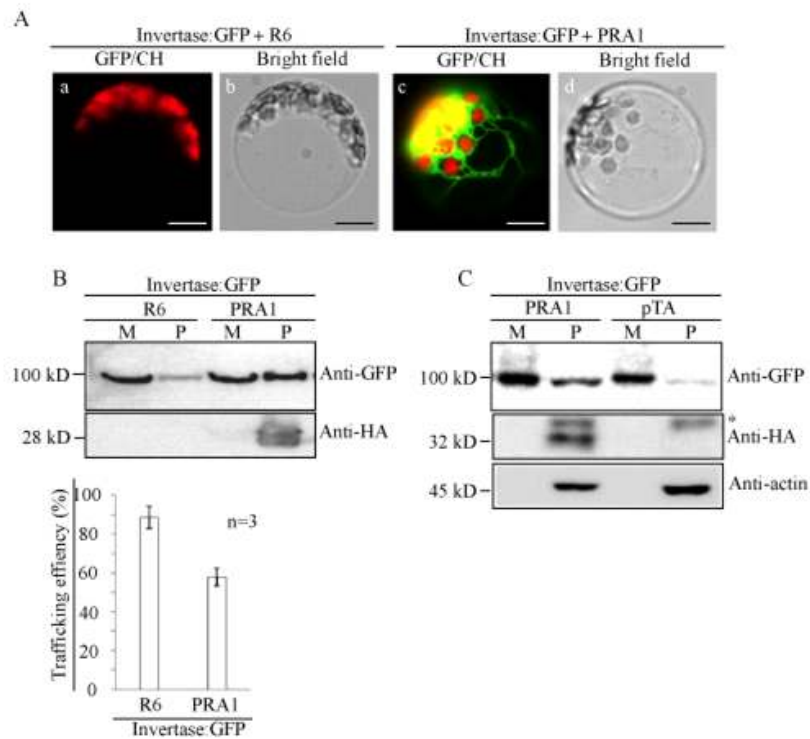


그림 65. HA:AtPRA1.B6 inhibits trafficking of the secretory protein invertase:GFP.

A, Inhibition of invertase:GFP trafficking by HA:AtPRA1.B6. Invertase:GFP was cotransformed with AtPRA1.B6 or R6 into protoplasts, and the localization of invertase:GFP was examined.

B, Western-blot analysis. Invertase:GFP was cotransformed with HA:AtPRA1.B6 or R6, and the protein extracts from protoplasts and incubation medium were analyzed by western-blot analysis using anti-GFP and anti-HA.

Plasma membrane으로의 단백질 이동을 다시 확인하기 위해서 새로운 plasma membrane의 marker 단백질인 PMP:GFP의 trafficking을 현광현미경 하에서 관찰하였다. 이들의 plasma membrane으로의 이동이 감소하는 것을 현광 현미경을 통해 확인하였다 (그림 66). 특히 이단백질의 plasma membrane으로의 trafficking을 Western blot analysis를 통해서 확인하기 위해서 PMP에 glycosylation site를 갖는GFP를 fusion한 construct를 제조하였다. AtPRA1의 overexpression이 이 단백질의 trafficking에 영향을 미치는 것을 확인하기 위해서 protoplast를 만들고 여기에 AtPRA1과 PMP:GFP-gly construct를 cotransformation한 후 protoplast로부터 protein extract를 만들고 이들을 Western blot analysis를 통해서 분석하였다. 그 결과 AtPRA1 overexpression이 PMP:GFP-gly의 trafficking을 inhibition한다는 것을 확연히 관찰할 수 있었다 (그림 67).

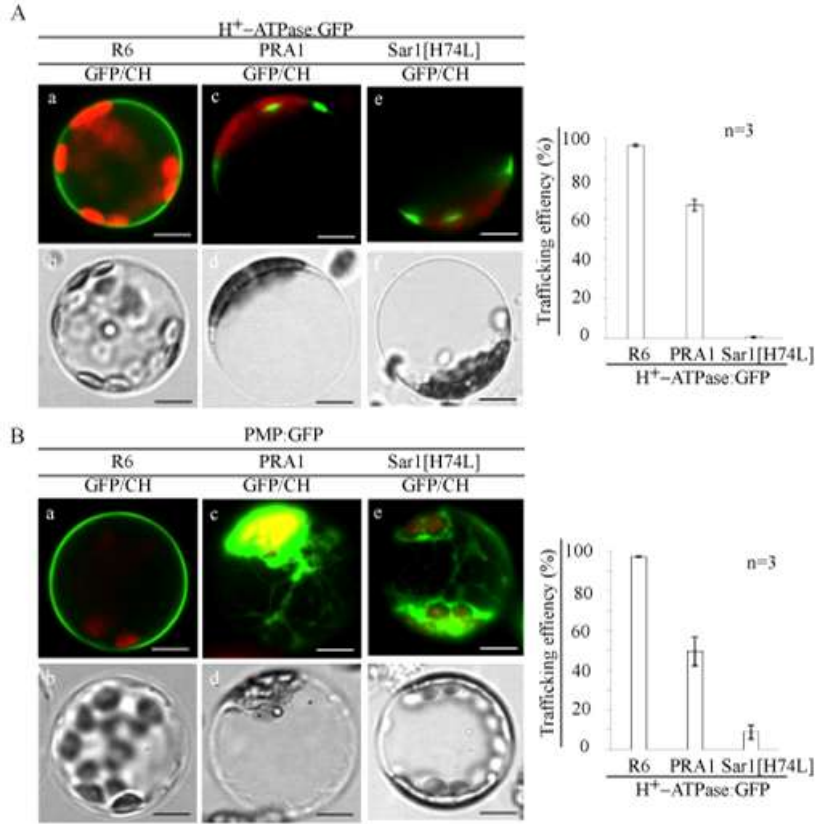


그림 66. HA:AtPRA1.B6 inhibits trafficking of plasma membrane proteins H<sup>+</sup>-ATPase:GFP and PMP:GFP. H<sup>+</sup>-ATPase:GFP (A) or PMP:GFP (B) was introduced into protoplasts together with empty expression vector R6, HA:AtPRA1.B6, or Sar-1[H74L], and localization of the plasma membrane proteins was examined.

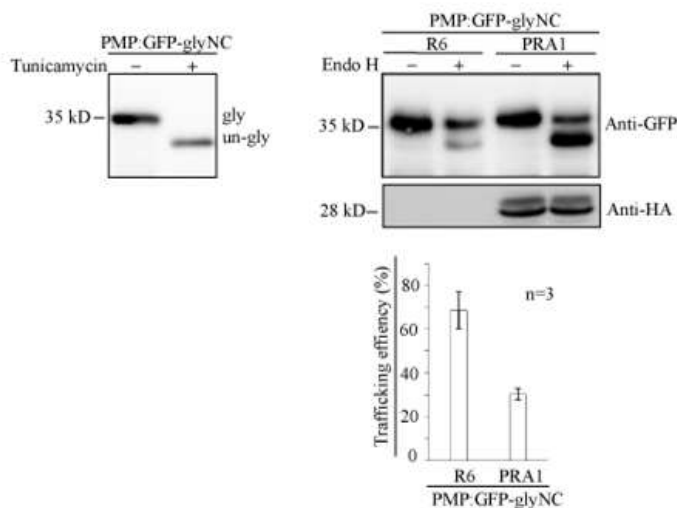


그림 67. HA:AtPRA1.B6 inhibits trafficking of plasma membrane protein PMP:GFP-gly. Protoplasts were cotransformed with PMP:GFP-glyNC, incubated with (+) or without (-) tunicamycin, and analyzed by western blotting using anti-GFP.

또한 Golgi로 이동하는 단백질의 영향을 관찰하기 위하여 Golgi로 위치하는 ST:GFP와 KAM1( $\Delta$ C):mRFP를 같이 발현시켰을 때 ST:GFP와 KAM1( $\Delta$ C):mRFP의 localization에는 변화가 없는 것을 형광 현미경을 통해 관찰하였고, endogenous  $\gamma$ -COP antibody를 이용하여 한 번 더 확인을 하였다. ST:GFP 발현 후 Endo-H 처리를 통하여 AtPRA1의 과 발현에 의해서 ST:GFP의 위치에는 영향을 주지 않는 것을 western blotting으로 확인을 하였다 (그림 68).

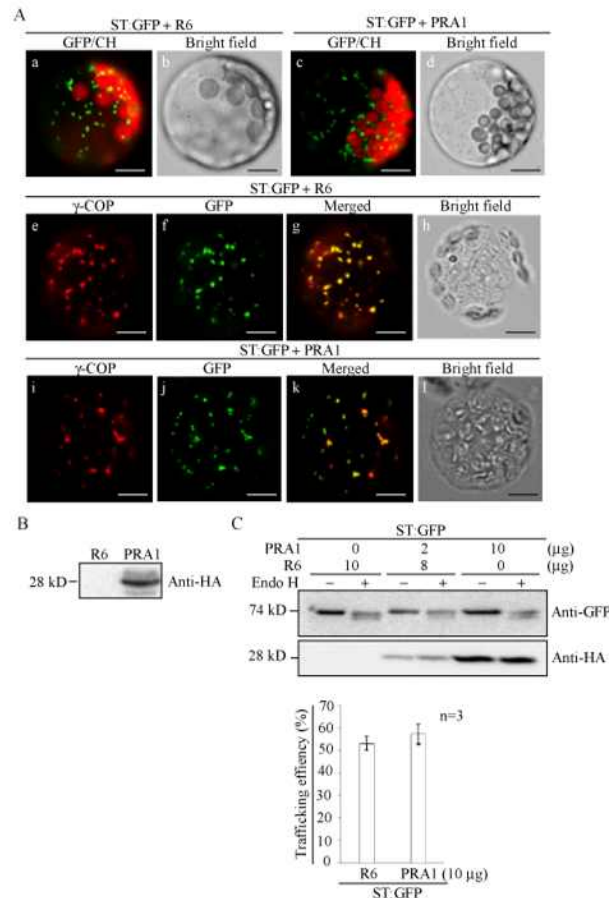


그림 68. HA:AtPRA1.B6 does not inhibit the trafficking of ST:GFP to the Golgi apparatus. A, Localization of ST:GFP to the Golgi apparatus in the presence of HA:AtPRA1.B6. Wild-type protoplasts were transformed with the indicated constructs, and localization of ST:GFP and  $\gamma$ -COP was examined directly by GFP fluorescence and by immunostaining with anti- $\gamma$ -COP antibody, respectively.

B, Western-blot analysis of HA:AtPRA1.B6 expression. Protein extracts from transformed protoplasts (A) were analyzed by western blotting using anti-HA.

C, Endo H-resistant form of ST:GFP N-glycans in the presence of HA:AtPRA1.B6. ST:GFP was cotransformed with the indicated amounts of AtPRA1.B6 or R6, and protein extracts from the transformed protoplasts were treated with (+) or without (-) Endo H.

AtPRA1.B6가 세포내 ER과 Golgi에 존재하며 26S proteasome-dependent pathway에 의해 단백질양이 조절 된다는 결과를 얻었다. 그리고 AtPRA1.B6가 과 발현 되었을 때 ER에 머물

며 ER과 Golgi를 거쳐 가는 단백질들을 특이하게 조절한다는 결과를 얻었다.

이 결과들을 바탕으로 AtPRA1.B6의 세포내 단백질의 조절이 식물체에 어떤 영향을 주는지 알아보려고 하였다. AtPRA1.B6가 외부 환경적 스트레스나 pathogen의 침입에 대항한 방어 기작으로 세포내 단백질을 조절 할 수 있을 것이라 추측을 하고 이를 조사하고자 하였다.

AtPRA1.B6 inducible 과 발현 형질 전환체에 곰팡이 병원균인 *A. brassicicola*를 처리하여 방어 능력을 관찰하였다. *A. brassicicola* 처리에 의하여 AtPRA1.B6의 단백질의 발현양이 증가 하였고, 대조군보다 AtPRA1.B6 과 발현 형질 전환 식물체 내에서 *A. brassicicola* 포자 형성이 감소하는 것을 관찰 하였다. 또한 lactophenol-aniline blue로 죽은 세포를 염색했을 때 대조군보다 죽은 세포가 염색 되는 범위가 감소하는 것을 관찰하였다 (그림 69).

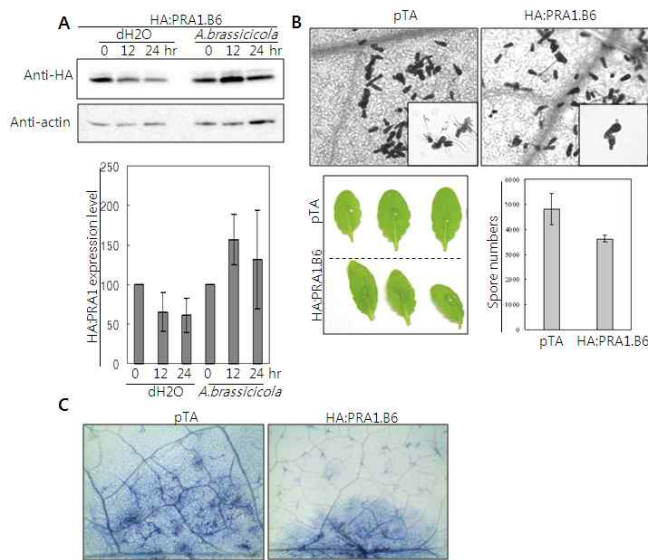


그림 69. 곰팡이 병원균 *A. brassicicola*에 대한 저항성

다음으로 AtPRA1.B6 inducible 과 발현 형질 전환 식물체에 박테리아 병원균이인 *P. syringae*를 처리하여 방어 능력을 관찰 하였다. SA 식물 호르몬에 의해서 AtPRA1.B6의 단백질 양이 증가 하였으며, 박테리아 병원균인 *P. syringae*의 성장이 감소하는 것을 관찰하였다 (그림 70).

이 현상들을 바탕으로 AtPRA1.B6가 과 발현 되었을 때 defense 기능을 하는 단백질들의 수송에는 negative한 영향을 주지 않을 거라고 추측을 하고, defense 기능을 하는 PR1:GFP의 세포 밖으로의 secretion을 조사하였다. AtPRA1.B6의 과 발현이 PR1:GFP 단백질의 세포 밖으로의 secretion에는 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다 (그림 71). 따라서 AtPRA1.B6의 과 발현이 세포내 단백질의 조절을 통해 병원균에 대한 저항성을 가지는 것을 알 수 있었다.

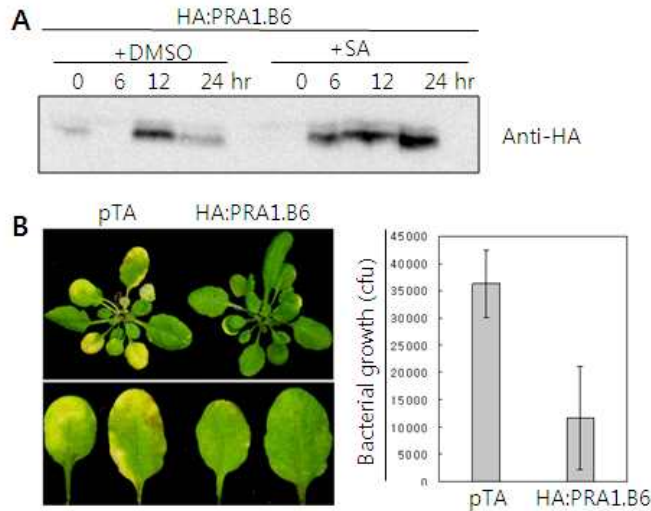


그림 70. AtPRA1.B6의 박테리아 병원균 *P.syringae*(DC3000)에 대한 저항성

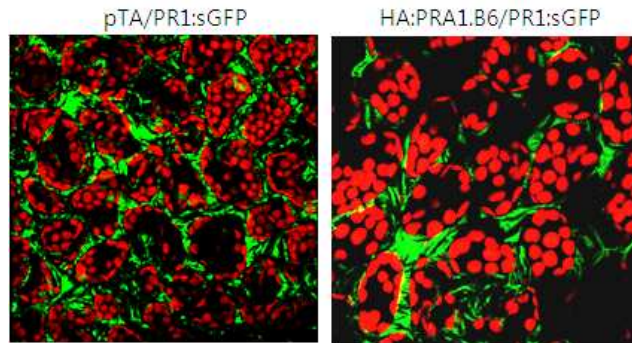


그림 71. AtPRA1.B6의 PR1::GFP의 세포 밖으로의 이동에의 영향

이전 연구결과 AtPRA1 family중 하나인 AtPRA1.B6는 세포내 소포체(ER)와 골지(Golgi)에 위치하며 세포내에서 액포와 세포 밖으로 이동하는 단백질을 특이적으로 조절함을 보였다. 그리고 AtPRA1.B6 과발현 식물체는 세포내 단백질 이동을 조절하여 외부 pathogen에 저항성을 나타내는 결과를 얻었다. 이 결과들을 바탕으로 AtPRA1 family 단백질들이 외부 환경 스트레스를 조절하기 위하여 다양한 세포내 endomembrane system에서 단백질들을 조절 할 수 있을 거라 가정하고, 19개의 AtPRA1 상동 유전자중 6개의 mutant를 확보한 후 그중에서 가뭄 스트레스에 저항성을 가지는 PRA11(AtPRA1.F4) mutant를 선발하였다.

PRA11이 제거된 돌연변이 식물의 가뭄 저항성에 견디는 정도를 알아보기 위해 흙에서 13일 동안 키운 후 25일 동안 물을 주지 않고 계속 키웠다. 그 후 다시 물을 준 후 5일 뒤에 Wild-type (WT) 식물과 PRA11이 제거된 돌연변이 식물의 생존율을 관찰 하였다. WT 식물에서는 20% 정도의 식물이 회복된 반면에 PRA11이 제거된 돌연변이 식물은 95% 이상의 회복율을 보였다. 다음으로 WT 식물과 PRA11이 제거된 돌연변이 식물의 잎에서 건조에 의한 수분 감소율을 관찰하기 위하여 각각의 식물에서 잎을 채취하여 건조에 노출 시킨 후 시간별로 잎의 무게를 측정하였다. 그 결과 PRA11이 제거된 돌연변이 식물체의 잎의 무게 감소율이 WT 식물보다 적음을 관찰하였다. 이결과로 건조 상태에서 PRA11이 제거된 돌연변이 식물이 WT



식물보다 저항성을 가진다는 결론을 얻었다.

식물은 잎에 있는 기공의 개폐를 조절함으로써 수분 조절이 이루어진다. PRA11의 기공 조절에서의 역할을 보기 위하여 PRA11이 제거된 돌연변이 식물에서 강한 빛을 쬐여준 후 기공 개폐정도를 WT과 비교하였다. 그 결과 PRA11이 제거된 돌연변이 식물의 기공이 빛을 쬐여주어도 완전히 열리지 않음을 알았다. 이 결과로 PRA11 mutant에서 기공의 개폐를 조절하는 기작에 결함이 생겼음을 알 수 있었다 (그림 72).

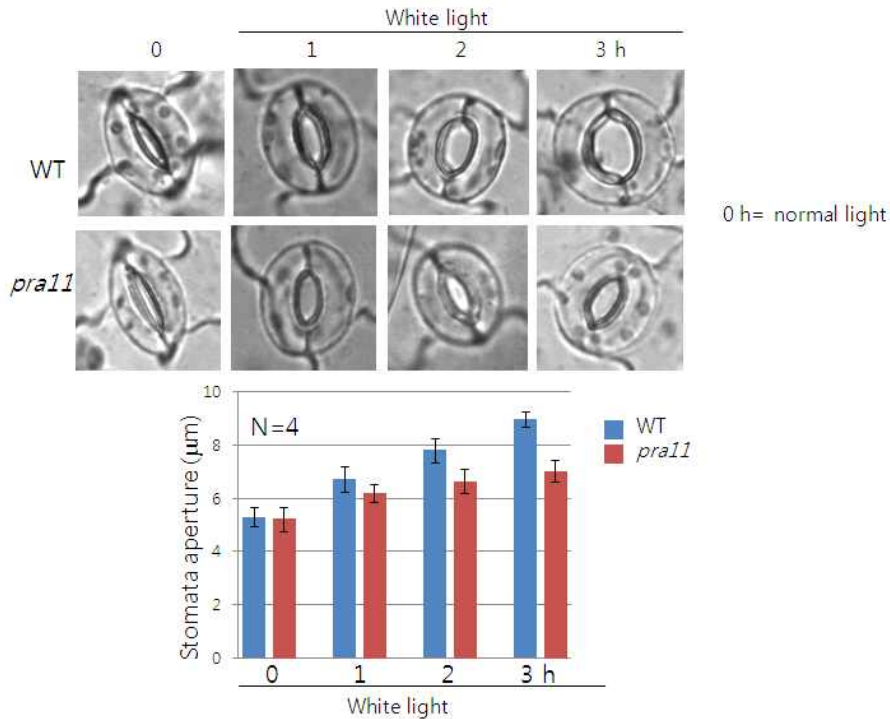


그림 72. Guard cell opening in the *pra11* mutant plants.

PRA11의 기능을 규명하고자 먼저 PRA11의 세포내 위치를 조사하였다. ST:GFP와 Ara7:RFP 과발현 형질 전환 식물체에서 원형질체를 분리한 후 HA 항체를 이용한 세포 면역염색기법 (immunostaining)과 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy, CLSM)을 이용하여 PRA11 단백질이 골지(Golgi apparatus)에 존재함을 규명하였다.

다음으로 단백질들의 다양한 세포내 소기관으로의 이동에서 PRA11의 역할을 규명하고자 WT 식물과 PRA11 mutant 식물 그리고 PRA11 과발현 식물체에서 각각 Protoplast를 분리한 후 다양한 소기관으로 가는 marker 단백질을 발현 시켜 marker 단백질들의 이동을 관찰하였다. 그 결과 TGN(Trans-Golgi-network), 세포막(plasma membrane) 그리고 액포(Vacuole)로 이동하는 단백질들의 이동에 결함이 생긴 것을 알 수 있었다. 따라서 PRA11은 세포내 골지(Golgi apparatus)에 위치하면서 소포체와 골지를 거쳐서 TGN, 세포막 그리고 액포로의 단백질 이동을 조절하는데 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

나. At  $\beta$ Frcut4의 intracellular targeting pathway의 규명과 이에 관여하는 sorting motif들에 대한 연구

식물 세포의 대부분을 차지하는 central vacuole은 식물 세포의 homeostasis 조절, 여러 물질의 deposition 혹은 degradation 등의 중요한 기능을 수행하고 있으며, 그 중요성으로 인해 central vacuole로의 intracellular targeting pathway는 활발히 연구되어 관련된 여러 종류의 regulatory proteins, sorting receptor들도 보고되었다 (Vitale and Chrispeels, 1992; Bethke and Jones, 2000; Sohn et al., 2003). 하지만 이것은 대부분 soluble protein에 대한 것으로, central vacuole로 targeting되는 membrane protein의 경우에는 어떤 organelle을 통해 이동하는지, 관련된 regulatory factor들은 무엇인지에 대해 아직 알려진 바가 없다. 이번 연구에서는 vacuolar invertase로 알려진 *At*  $\beta$ Fructosidase4 (*At*  $\beta$ Fruct4)를 이용하여 식물에서 membrane protein이 어떠한 organelle들을 거쳐 central vacuole로 이동하는지를 자세히 밝히고, 이에 관련된 factor들과 *At*  $\beta$ Fruct4의 specific sorting motif들을 알아봄으로써 식물 세포에서 central vacuole로 이동하는 membrane protein에 대한 자세한 mechanism을 규명하고자 하였다.

이를 위해 먼저 N-terminal region에 하나의 transmembrane domain을 지닌 *At*  $\beta$ Fruct4의 C-terminus에 GFP를 fusion시킨 *At*  $\beta$ Fruct4:GFP protein을 생성한 뒤, central vacuole로 이동시 통과할 가능성이 있는 각각의 organelle에 관련된 dominant mutant effector들이나 inhibitory chemical 등을 이용하여 *At*  $\beta$ Fruct4 targeting pathway 과정을 파악하고자 하였다. 그 첫 단계로 *At*  $\beta$ Fruct4가 대부분의 intracellular trafficking protein들처럼 ER membrane에서 Sar1 protein에 의해 조절되는 COP II vesicle을 이용하는지 여부를 알아보기 위해, Sar1의 dominant negative mutant인 *At*Sar1[N74L]과 *At*  $\beta$ Fruct4:GFP를 함께 protoplasts에서 발현시킨 뒤 *At*  $\beta$ Fruct4:GFP의 localization pattern과 Western blotting pattern을 살펴보았다 (그림 73). 그 결과 vacuole targeted *At*  $\beta$ Fruct4:GFP control이 vacuole localization pattern과 함께 Western blotting상에서 100kD과 30kD의 두 band pattern을 보인 것과 달리, *At*Sar1[N74L]이 함께 발현된 경우에는 ER membrane을

빠져 나가지 못한 채 100kD의 하나의 band만을 Western blotting pattern을 보였다. 이는 *At*  $\beta$ Fruct4:GFP가 COP II vesicle을 통해 ER을 빠져나감으로써 vacuole targeting을 시작한다는 사실을 보여준다. 또한 이로써 *At*  $\beta$ Fruct4가 ER 이후의 organelle인 Golgi complex를 이용하리란 추측이 가능하므로, Golgi complex의 TGN에서의 export를 저해하는 Latrunculin B (Lat B)를 처리하는 실험을 진행하여 그 추측을 확인 해보았다. Lat B 처리 시, *At*  $\beta$ Fruct4:GFP는 punctate staining pattern을 보이며 이런 inhibited spot pattern은 TGN marker protein인 ATV12:HA와 80% 가량이 overlap되는 결과를 보여주었다. 이로써 *At*  $\beta$ Fruct4:GFP가 ER에서 Golgi complex, TGN을 통과하여 vacuole로 trafficking됨을 확인 할 수 있었다 (그림 74).

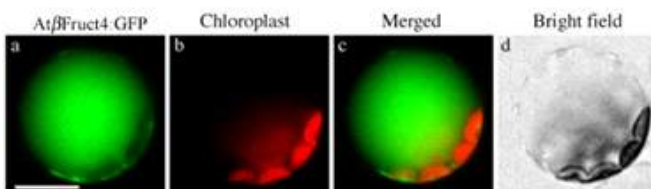


그림 73. Central vacuolar targeting of *At*  $\beta$ Fruct4:GFP was inhibited by *At*Sar1[N74L] mutant at the ER.

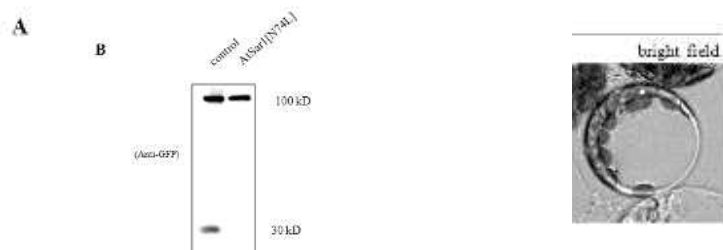


그림 74. At  $\beta$ Frcut4:GFP is targeted to the central vacuole through out the TGN.

When Lat B was treated, At  $\beta$ Frcut4:GFP showed spot patterns and precursor form of proteins and 80% of inhibited At  $\beta$ Frcut4:GFP spot patterns were overlapped with AtVTI12:HA, the TGN marker protein.

이후에 추측 가능한 vacuole로의 trafficking pathway 상의 organelle은 prevacuolar compartment (PVC)로, PVC 상에서 중요한 역할을 담당하는 AtRabF2a의 dominant mutant인 HA:AtRabF2a[S24N]을 이용하여 이 mutant가 At  $\beta$ Frcut4:GFP의 trafficking에 어떤 영향을 미치는지를 관찰한 결과, PVC maker protein인 AtPEP12:myc과 overlap되는 spot patterns를 보였다. 그리고 같은 sample을 이용해 subcellular fractionation시 HA:AtRabF2a[S24N]에 의해 inhibited At  $\beta$ Frcut4:GFP가 대부분 membrane fraction에 존재함이 나타났다 (그림 75). 이는 At  $\beta$ Frcut4:GFP이 PVC를 통과해 central vacuole로 targeting됨을 보여줌과 동시에 PVC에 머무를 때까지 membrane protein의 성질을 여전히 띠고 있음을 의미한다. 이와 같은 일련의 실험을 통해, At  $\beta$ Frcut4:GFP이 ER에서 빠져 나온 뒤 Golgi complex, TGN, 그리고 PVC를 거쳐 central vacuole로 targeting 되는 pathway를 지님을 자세히 규명할 수 있었다. 그리고 이 결과는 이러한 여러 종류의 organelle들을 통과하는 데 중요한 sorting motif들이 At  $\beta$ Frcut4에 존재함을 간접적으로 보여주고 있다. 어떤 sequence motif가 At  $\beta$ Frcut4의 sorting signal로 작용하는지를 확인하기 위한 실험을 진행하기 위해 100kD에 달하는 큰 사이즈의 full length At  $\beta$ Frcut4 보다 쉽게 다룰 수 있도록 작은 사이즈의 protein인 transmembrane domain을 포함한 N-terminal region 일부분만을 가진 FN:GFP fusion construction을 생성한 뒤, 이런 N-terminal region만으로 FN:GFP가 vacuole로 targeting 됨을 확인하고 중요한 sorting motif들을 찾기 위해 다양한 종류와 길이의 alanine substitution을 일으킨 mutant들을 protoplasts에 발현시켜 localization pattern들과 Western blot상의 band pattern들을 관찰하였다. 그 결과, LL/AA, PI/AA, EEE/AAA, LCPY/AAAA, YTRL/AAAA 등의 mutation시, FN의 vacuolar targeting이 inhibition 받음을 Western blotting 결과 확인할 수 있었다 (그림 76).

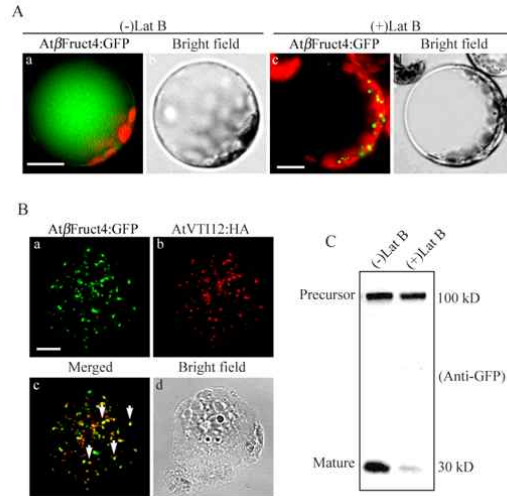


그림 75. Central vacuolar targeting of *AtβFruct4:GFP* was regulated by *AtRabF2a* at the PVC.

The dominant mutant of *AtRabF2a[S24N]* affected the targeting of *AtβFruct4:GFP* to produce punctated spot patterns and these patterns were confirmed as PVC by overlapping with PVC marker protein, *AtPEP12:myc*. Western blotting results also showed inhibited *AtβFruct4:GFP* by *AtRabF2a[S24N]* was partially secreted and remained in the membrane fraction.

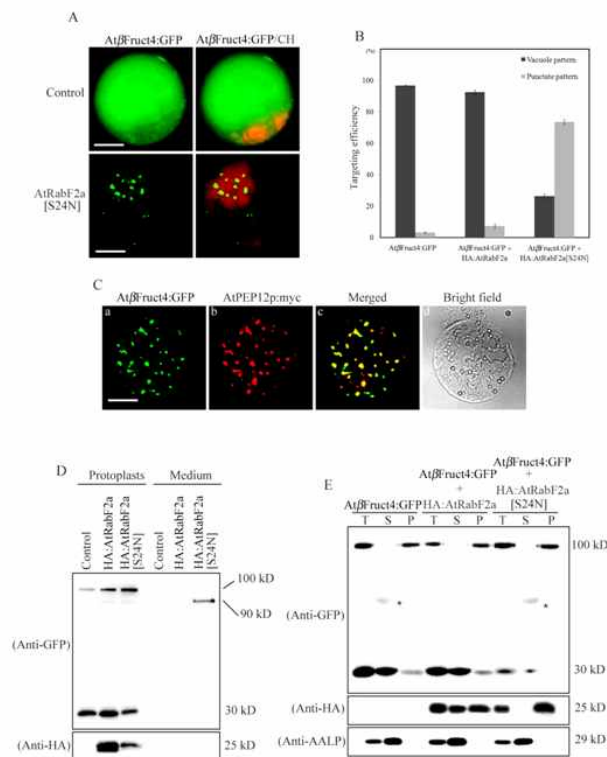


그림 76. Several kinds of alanine substitution mutants of FN:GFP showed meaningful inhibited targeting patterns in Western blotting.

Mutation이 일어난 경우 blocking되며 이는 반대로 At $\beta$ Frcut4의 ER export signal로 LL, PI motif가 필요함을 의미한다. 특히 PI motif의 경우 지금까지 보고된 바 없는 새로운 ER export signal motif로서 At $\beta$ Frcut4의 독특한 sorting motif 성향을 보여주고 있다 (그림 77). 다음으로 EEE/AAA mutation은 At $\beta$ Frcut4을 일정비율 TGN에 머무르게 하였으며, Yxx $\Phi$ 라 불리는 PVC targeting motif로 추정 가능한 LCPY, YTRL 모두를 deletion한 DYxx $\Phi$  mutant의 경우, At $\beta$ Frcut4의 PVC export signal로도 작용할 수 있음을 PVC marker protein인 AtVSR1와의 colocalization 실험으로 확인할 수 있었다 (그림 78, 그림 79, 그림 80).

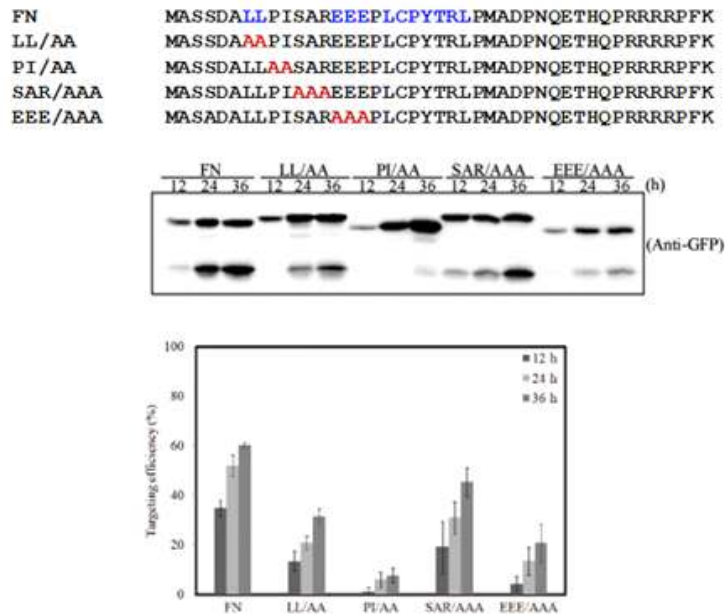


그림 77. At $\beta$ Frcut4 is harboring several kinds of sorting motifs which are needed at exports from various organelles. LL/AA and PI/AA showed ER localization patterns, which means these motifs are critical for ER export of At $\beta$ Frcut4. EEE/AAA mutant made At $\beta$ Frcut4 to be remained in the TGN mainly, whereas putative Yxx $\Phi$  motifs, LCPYTRL deleted mutant, DYxx $\Phi$  showed almost PVC patterns.

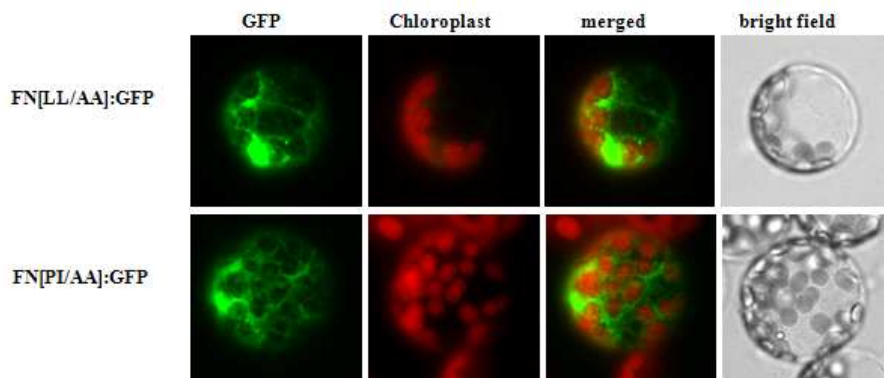


그림 78. LL and PI are critical for ER exit of  $\beta$ -fructosidase 4:GFP

FN : GFP            MASSDALLPISAREEEPLCPYTRLPMADPNQETHQPRRRRPFK  
 PLC/AAA            MASSDALLPISAREEEAAPYTRLPMADPNQETHQPRRRRPFK  
 LCPY/AAAA        MASSDALLPISAREEEPAATATRLPMADPNQETHQPRRRRPFK  
 YTRL/AAAA        MASSDALLPISAREEEPLCPAAAAPMADPNQETHQPRRRRPFK  
 RLP/AAA            MASSDALLPISAREEEPLCPYTAAPMADPNQETHQPRRRRPFK  
 ΔYXXΦ            MASSDALLPISAREEEP-----PMADPNQETHQPRRRRPFK

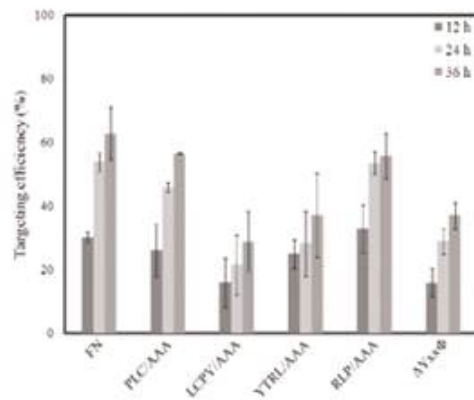
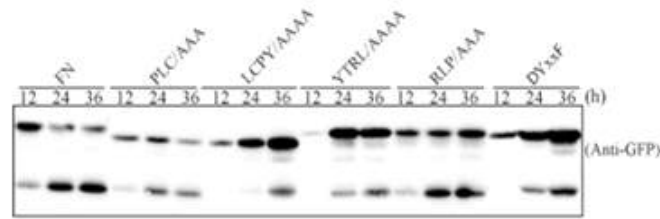


그림 79. YXXF motif is critical for trafficking to the vacuole of b-fructosidase

이러한 결과들은 지금까지 알려진 바 없는 vacuolar membrane protein의 trafficking이 어떠한 intracellular organelles를 통과하는 지를 알려줌과 동시에 전혀 새로운 sorting motif들의 발굴해 낸 성과를 거두었다고 여겨진다. 본 연구는 Traffic에 발표 되었다 (Jung et al., 2011b)

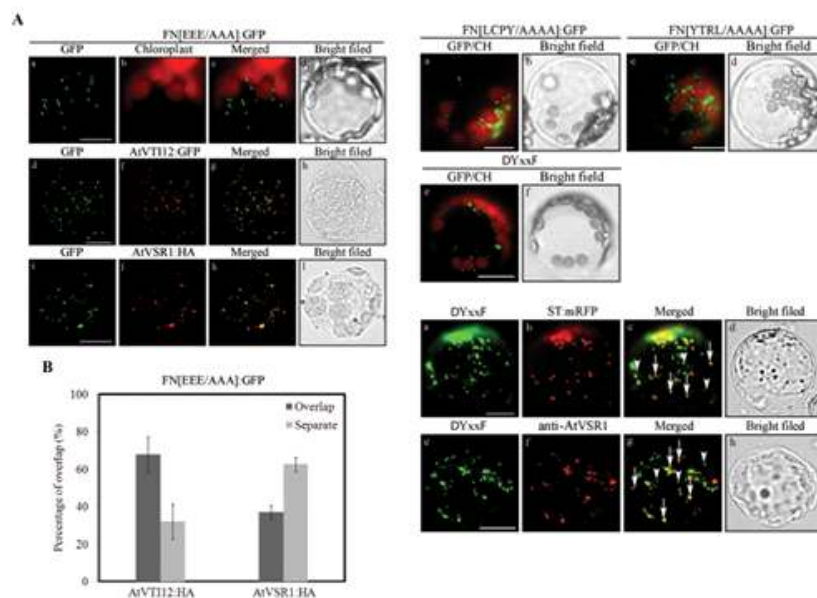


그림 80. Mutation in YXXF motif causes Golgi localization of b-fructosidase



다. 애기장대 식물의 endocytic adaptor의 발견과 그 기능에 대한 연구

식물은 세포 막(Plasma membrane)에는 존재하는 무수히 많은 막 단백질들(nutrient transporters, receptors, ion channels)의 재분배를 통해서 다양한 외부 환경의 변화와 자극에 반응한다. 이러한 막 단백질들의 재분배 과정은 vesicle trafficking에 의해서 조절되는데 그 중 하나의 pathway는 세포막에서 세포 내로 함입되는 endocytosis이다. Endocytosis는 외부 신호(ligands)를 인지한 수용체에 의한 신호 전달에 중요하다. 예를 들면, pathogene elicitor, flg22를 인지하는 FLS2 receptor나 Brassinosteroid (BR) receptor인 BRI1은 endocytosis를 통해 immune response를 유도하거나 endosomes에서 BR signaling을 세포 내로 전달한다. 뿐만 아니라 영양분을 식물 체내로 흡수하는 transporters들은 토양에 존재하는 영양 성분의 농도에 따라 endocytosis를 통해 세포 막에 존재하는 transporters의 양을 조절한다. 하지만, 세포 막에 존재하는 다양한 종류와 수의 막 단백질들이 어떤 ligand에 의해 함입되는지, 어떤 환경 변화를 통해 조절되는지, 어떠한 세포 내의 accessory proteins에 의해서 이들의 endocytosis가 조절되는지에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 따라서 식물 세포의 endocytosis 연구는 환경에 변화에 적응하는 응용 식물의 개발을 위해서 매우 중요한 기초 연구가 될 것이라 기대한다. 이에 우리는 식물 세포에서 endocytic adaptor로서 기능할 가능성이 높은 유전자를 찾아 biochemical and in vivo imaging approaches를 통해서 그 기능을 이해하고자 한다.

그래서 Arabidopsis Epsin-like clathrin adaptor1 (AtECA1)과 그의 homologs인 AtECA2, AtECA4을 연구하였다. in vitro protein-protein interaction assay를 통해서 AtECA1이 C-terminal region을 통해서 Clathrin과 결합하여 같은 complex에 존재하는 것을 관찰 하였고 이러한 결과를 통해 AtECAs이 clathrin-dependent endocytosis에 관여하는 clathrin adaptor로서 기능할 것이라고 유추하였다. 흥미롭게도, 뿌리 세포에서는 분열하는 세포와 그렇지 않은 세포를 함께 관찰 할 수 있었는데 분열하는 세포에서 AtECAs이 분열의 마지막 시기에 세포질의 분리를 위해 형성되는 세포판으로 accumulation되는 것을 관찰하였다. 식물의 cytokinesis는 골지에서 합성한 많은 양의 단백질과 지질들을 포함한 vesicles의 fusion과 팽창에 의한 세포 판의 형성에 의해 완성되는 반면에 동물의 cytokinesis는 세포 막의 압축 (constriction)에 의해 완성된다. 식물 특이적 proceses 중의 하나인 cytokinesis 과정 중에 AtECA1-dependent endocytosis를 cell plate 형성에 관여하는 다른 단백질들 (KNOLLE, DRP1C, and CLC)와 관찰한 결과 골지에서 유도되는 베지클들이 서로 fusion하는 세포 판 형성의 초기단계가 아니라 세포 판이 maturation 되고 expansion되는 시기에 clathrin을 세포 판으로 유도하여 세포판에서 일어나는 clathrin-mediated endocytosis에서 기능할 것이라고 제시하였다. 뿐만 아니라, AtECA1의 연구를 통해 동물 세포에서 endocytosis에서 기능하는 epsin에 분화된 것으로 생각되는 epsin-related proteins이 식물 세포에서 cell plate의 형성에 관여한다는 것을 제시하였다 (그림 81).

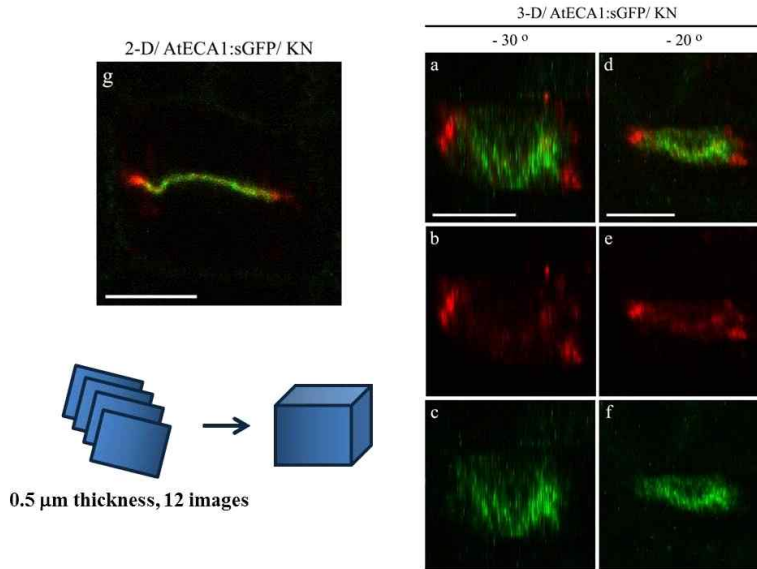


그림 81. AtECA1:sGFP temporal and spatial localization patterns to the cell plate differ from those of KNOLLE (KN). Three-dimensional (3-D) images of AtECA1:sGFP and KNOLLE localization to the cell plate.

이전 연구 결과 AtECA1(Epsin-like clathrin adaptor 1)은 분열 하지 않는 세포에서는 세포막(PM)과 엔도솜에 위치하고, 분열하는 세포에서는 세포판이 maturation, expansion되는 시기에 Clathrin H chanin 과 결합하여 세포판에서 CCV의 adaptor로서의 역할을 함을 보였다.

AtECA1-dependent endocytosis의 기능을 알아보하고자 AtECA1이 제거된 mutant 식물과 AtECA1이 감소된 mutant 식물체를 선발하였고, salt stress에서의 AtECA1에 의한 endocytosis의 역할을 규명하고자 하였다. 먼저 AtECA1의 RNA level이 salt stress에 의해 변화하는 것을 관찰하기 위해 Wild-type(WT) 식물에 120 mM NaCl을 3시간 동안 처리한 후 RNA를 분리하였다. 그 후 qRT-PCR을 통해 AtECA1의 RNA level이 salt stress 처리에 의해 증가함을 관찰하였다. 다음으로 *atecal* mutant에서 ROS 생성의 변화를 관찰하기 위해 DCF-DA 염색법을 이용하여 *atecal* mutant에서 ROS 생성이 WT보다 감소함을 관찰하였다 (그림 82). ROS는 Rboh 단백질에 의해 생성되는데 Rboh는 세포막에서 salt stress에 의해 endocytosis 됨을 알 수 있었고, *atecal* mutant에서 Rboh의 RNA level이 감소함을 qRT-PCR을 통해 관찰하였다. 다음으로 ECA1과 Rboh의 상관관계를 조사하기 위해 GST tagging된 ECA1 단백질을 분리한 후 Rboh와 pull-down assay 방법을 이용하였고, 그 결과 두 단백질이 결합 하는 것을 관찰하였다. 이 결과들로 ECA1이 salt stress에 의한 endocytosis에서 Rboh와의 관계를 알 수 있었다.

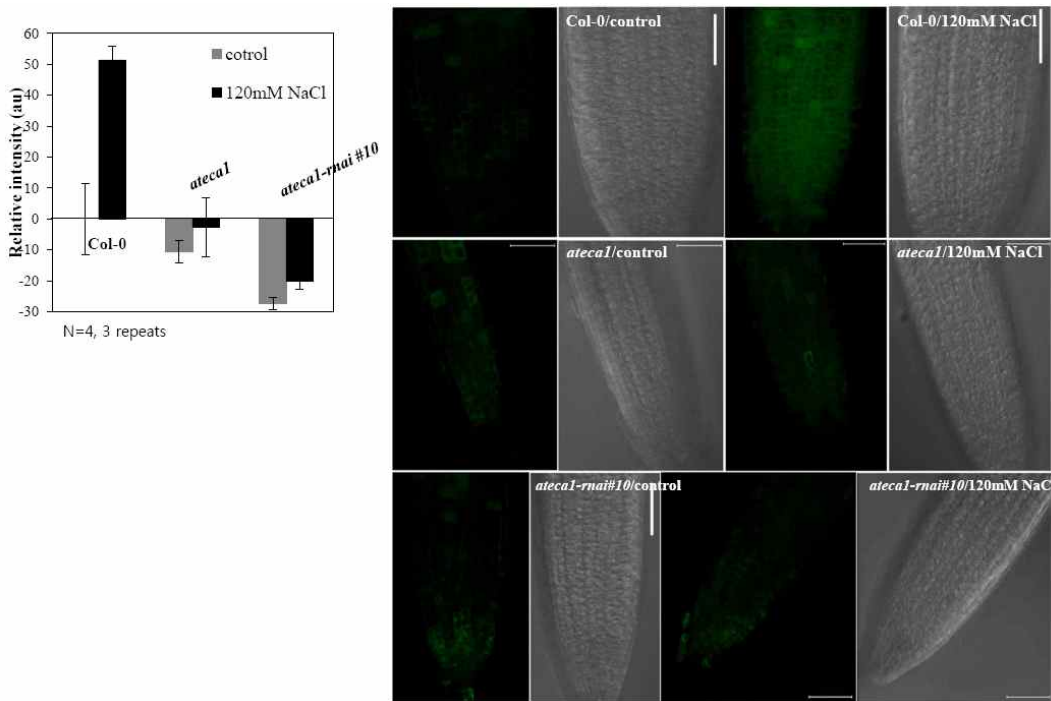


그림 82. ROS production in atecal mutant.

라. 세포내 골지체 구조 유지와 식물 생장에 필수적인 역할을 하는 Glo3p-type ArfGAP들로 매개된 골지체로의 Arf1-GDP 이동에 관한 연구

ADP-ribosylation factor (Arf1)는 small GTP-binding proteins 중 하나로, 다양한 세포 소기관으로의 단백질 이동에 매우 중요한 역할을 한다 (Balch et al., 1992; Cukierman et al., 1995; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). GDP-bound Arf1이 세포질에서부터 세포막으로 이동이 되어져, vesicles을 매개된 단백질 이동에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 Arf1-GDP가 어떠한 메커니즘을 통해 골지 세포막으로 이동이 되어지는지에 대한 연구가 아직 미미하다. 본 연구를 통하여 애기장대 식물내 Glo3p-type Arf GTPase activating proteins (ArfGAPs)인 ArfGAP domain 8 (AGD8)와 AGD9이 Arf1-GDP의 골지 세포막 이동에 중요한 역할을 하고 있음을 보여주었다. 먼저 AGD8과 AGD9 유전자가 정상보다 낮은 수준으로 발현이 되는 RNAi 형질전환 식물체가 야생형 애기장대에 비해 식물 발달과 성장에 아주 큰 결함을 보여 주었다. 흥미롭게도 transmission electron microscopy를 이용하여 RNAi 형질전환 식물체내 골지체의 구조 형태가 아주 심각하게 변형되어 있음을 보여주었다. 이를 통해 AGD8과 AGD9이 골지체 형태 유지에 있어 아주 중요한 역할을 하고 있음을 보여주었다. 뿐만 아니라 골지체를 통해 액포로 이동이 되어지는 sporamin-GFP 단백질 운송이 크게 저해 되어 있음을 알 수 있었다. 우선 AGD8과 AGD9의 세포내 기능을 알아보려고 immunotaining을 이용하여 HA-AGD8과 HA-AGD9의 세포내 위치를 confocal microscopy로 확인하였다. 그 결과 HA-AGD8과 HA-AGD9이 골지체에 위치해 있는 마커인 ST-GFP,  $\gamma$ -COP, KAM1 $\Delta$ C-mRFP들과 co-labeling이 되어지는것을 확인함으로써 AGD8과 AGD9이 골지체에 위치해 있는 것을 보여주었다. 그 다음 AGD8과 AGD9이 골지체의 구조 유지에 어떠한 역할을 하는지 알아보려고 하였다. 기존 연구에 의하면, AGD7의 과발현이 Arf1에서의 GTP bound-form 불완전한 가수분해로 인해 골지체가 분열되는 현상을 일으킨다고 알려져 있다. 그러나 AGD7과 달리, AGD8의

과발현은 오히려 AGD7의 과발현에 유도된 골지체의 분열을 억제하고 있음을 보여주었다. 그리고 Co-immunoprecipitation과 BiFC를 통하여 AGD8이 골지체에서 Arf1와 Arf1[T31N]와 상호 결합하는것을 알수 있었다. 이 결과를 토대로 AGD8/9 이 GDP-bound form 의 Arf1를 골지체로 운송하는데 역할을 할 것이라 기대하였다. 흥미롭게도 골지체 분열을 일으키게 하는 Arf1[T31N]의 영향이AGD8과 AGD9의 과발현에 의해 억제가 되는 것을 알수 있었다. 이를 통해 AGD8 과 AGD9 이 Arf1을 골지체로의 이동을 강화하는것을 알수 있었다. 뿐만 아니라 AGD8의 과발현이 AGD7과발현에 의한 액포로 운송이 되는 단백질 이동 저해 현상이 회복되어 지는 것을 알수 있었다. 따라서, 본 연구를 통하여 AGD8과 AGD9에 의해 매개되는 골지 세포 막으로의 Arf1-GDP와의 결합이 골지체의 구조 및 형태 유지그리고 단백질 운송에 있어 필수적인 역할을 할 뿐 아니라 식물 성장 및 발달에 아주 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다 (그림 83). 본 연구는 Plant Physiology에 발표 하였다 (Min et al., 2013).

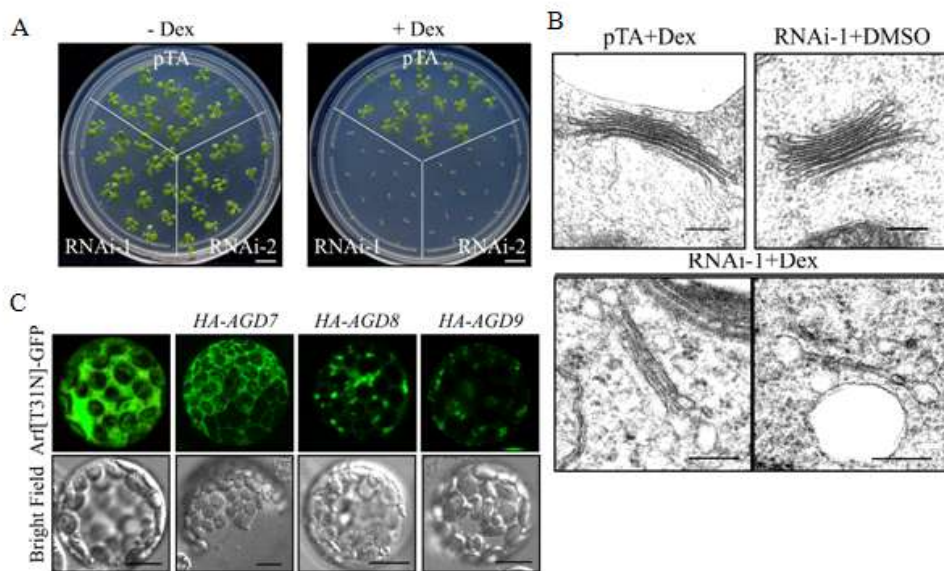


그림 83. The AGD8/9-mediated recruitment of Arf1-GDP to the Golgi apparatus is crucial for the maintenance of the Golgi apparatus, which are essential for plant growth and development

- (A) Phenotype of RNAi plants. Two independent lines of RNAi plants (RNAi-1 and RNAi-2) and control plants (pTA7002) were planted on MS plates with or without dex (30  $\mu$ M). The phenotype was observed 10 days after planting. Scale bar = 1 cm.
- (B) Morphological alteration of the Golgi apparatus in RNAi plants. RNAi and pTA plants treated with or without dex (30  $\mu$ M) for 4 days were fixed, and ultrathin sections of root tissues were examined by electron microscopy. Scale bar = 200 nm.
- (C) Arf1[T31N]-sGFP was introduced into protoplasts alone or together with HA-AGD7, HA-AGD8, or HA-AGD9, and the localization of Arf1[T31N]-sGFP was examined. Scale bar = 10  $\mu$ m.

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1 절 연구 목표 달성도

### 1. 연구 개발의 최종 목표

#### 가. 연구사업단 최종 목표

고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물의 개발을 통한 신품종을 개발하여 국내 농업분야의 고도화 추진

#### 나. 연구과제 세부목표

- 돼지설사병 예방 경구백신 형질전환 벼 개발
- 어류 노다바이러스 어류경구백신 형질전환 담배 개발
- 산업용 효소 생산용 형질전환 벼 개발
- 식물세포배양을 이용한 항체 대량 생산 및 기능 분석
- 경구백신 효율 증진 기술 및 효능 검정 기술 개발
- 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발
- 면역성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 개발
- 식물체에서의 고효율 단백질 발현 시스템 확립

### 2. 세부 연구 목표와 평가 착안점

#### 가. 돼지유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발 (제 1핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

구분 (년도)	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차년도 (2009)	○ 항원유전자와 CTB의 융합유전자를 가진 식물발현벡터의 제작	40 %	-식물발현 벡터의 제작(CTB-COE)
	○ 항원유전자와 LTB의 융합유전자를 가진 식물발현벡터의 제작	40 %	-식물발현 벡터의 제작(LTB-COE)
	○ 식물벡터를 이용한 벼의 형질전환	20 %	-형질전환체 선발 및 유지
2차년도 (2010)	○ 식물발현벡터를 이용한 벼(신동진)의 형질전환체 선발	20 %	-형질전환체 선발
	○ 형질전환체의 재분화	20 %	-재분화된 형질전환체 확보
	○ 형질전환체 및 재분화 벼의 도입된 유전자의 발현을 확인	30 %	-형질전환체에서 유전자의 발현 확인 여부
	○ 재분화 벼의 homoline 선발	30 %	-재분화 벼의 homoline 선발 여부
3차년도	○ 항원단백질 발현 형질전환 식물체	20 %	-형질전환 식물체 확보 여부

(2011)	선발 및 확보			
	○ 약배양을 이용한 homoline인 계통을 확보하고 고발현 식물체 선발	20	%	-약배양에 의한 homoline 계통 확보 여부
	○ 아그로박테리움을 이용한 벼의 형질전환	20	%	-형질전환 식물체 확보 및 분자생물학적 분석
4차년도 (2012)	○ 형질전환 callus를 이용한 실험동물에서 면역반응 유도	40	%	-실험동물에서 면역반응 유도 여부
	○ 동물실험에서 효율적인 면역반응 유도의 증진에 대한 조건 확립	40	%	-동물실험 실험 조건 확립 여부
	○ 약배양을 이용하여 확보된 homozygous 계통과 형질전환 식물체를 분석하여 event line 후보 작물 선발	40	%	-Event line 후보 작물 선발 여부
5차년도 (2013)	○ 항원단백질 발현 종자를 이용한 동물실험	20	%	-실험동물에서 면역반응 유도 여부
	○ 항원단백질을 발현하는 형질전환체를 이용한 목적동물실험	40	%	- 목적동물에서 면역반응 유도 여부
	○ SID 항원단백질을 발현하는 형질전환체를 이용한 실험동물 실험	30	%	-실험동물에서 면역반응 유도 여부
	○ 선발된 항원단백질을 발현하는 event line의 농업형질 검사	30	%	-불임성 없이 정상적으로 등숙한 개체 확보 여부

나. 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 신품종 개발 (제 1핵심 2 세부과제: (주)젠닥스)

구분 (연도)	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	
1차년도 (2009)	○ 국내 노다바이러스 coat protein 유전자 분리 및 재조합단백질 생산	10	%	-재조합단백질 확보 여부
	○ 노다바이러스 coat protein 항체생산	20	%	-항체 확보 여부
	○ 노다바이러스 항원단백질 유전자의 식물체 발현 최적화를 위한 코돈 최적화 및 색소체 형질전환 벡터내로 도입	10	%	-벡터제작 여부
	○ 노다바이러스 항원단백질 유전자의 담배 색소체내로 도입	30	%	-색소체형질전환체 확보 여부
2차년도 (2010)	○ 항체가 상승을 위한 키토산 formulae 개발	25	%	-최적 formulae 확보 여부
	○ 어류 사료내의 담배 식물재료 최적 formulae 개발	25	%	-사료의 최적 formulae 확보 여부
	○ T1 형질전환 식물체에서 생산된 재조합단백질의 항원성 검증	50	%	-T1 식물체 확보 및 항원성 검증 여부
3차년도 (2011)	○ 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증	30	%	-T1세대의 항원유전자 유지 여부
	○ 핵형질전환 식물체의 항원단백질 발현검증	30	%	-항원단백질 발현 여부
	○ 공격접종을 위한 순수 노다바이러스 배양	20	%	-배양액 확보 여부



	○ 치어 면역을 통한 항체가 형성 확인	20	%	-항체가 형성 확인 여부
	○ 니코틴프리 담배에서 엽록체 형질전환 방법 확립			-형질전환 방법 확립 여부 (사업단기반기술)
	○ 담배에서 transient expression system을 이용한 목적 단백질의 대량생산법			-transient expression system 확립 여부 (사업단기반기술)
4차년도 (2012)	○ mini/midi-scale 공격접종 실시 및 평가	40	%	공격접종 실시 여부
	○ 항원유전자의 형질전환 식물체의 세대간 형질 고정 확인	40	%	형질고정 확인 여부
	○ 시제품 생산을 위한 백신 반감기 및 안정성 테스트	20	%	테스트 여부
5차년도 (2013)	○ 니코틴프리 담배 ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609)색소체 형질전환 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증	40	%	- 니코틴프리 T <sub>1</sub> 형질전환체의 유전자 및 단백질 발현 여부 검증
	○ 담배 transient expression system을 이용한 목적단백질 대량생산법 확립	40	%	- 일시적 발현을 통한 재조합 단백질 발현 검증
	○ 형질전환 담배의 품종 보호 출원 및 등록	20	%	- 특허 출원 및 품종 보호 여부

다. 재조합 산업용 효소 신제품 개발 (제 1핵심- 3 세부과제: (주)엔비엠)

구분 (연도)	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	
1차년도 (2009)	○ TEV endopeptidase 유전자 합성	25	%	- 유전자의 합성 여부
	○ 식물발현벡터의 제작 및 형질전환	25	%	- 식물발현벡터의 제작 및 형질전환 여부
	○ 고생산 세포주의 확립	25	%	- 고생산 세포주의 확립 여부
	○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화	25	%	- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화 여부
2차년도 (2010)	○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화	20	%	- TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화 여부 - 3 종류 이상의 elite line 확보 여부 - 정상적인 종자의 확보 여부
	○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사	10	%	- TEV endopeptidase 고생산 식물체의 농업형질 조사 여부
	○ 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인	50	%	- TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 생산된 TEV의 활성 측정 방법 확립여부 - TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 생산된 TEV가 활성을 보이는지 여부
	○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 현탁세포 확립	20	%	- TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 바이오리액터 운용을 위한 현탁세포 확립 여부

				<ul style="list-style-type: none"> <li>- air-bubble type bioreactor (10 L) 운용을 위한 기술 확립 여부</li> <li>- air-bubble type bioreactor를 이용하여 TEV endopeptidase 고생산 현탁세포의 대량배양 시작 여부</li> </ul>
3차년도 (2011)	○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사(2차년도 이후 계속)	10	%	-TEV endopeptidase 고생산 T1, T2 세대의 종자를 이용하여 <i>in vitro</i> 내에서의 특성 확인여부
	○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주의 cell bank 구축	20	%	-TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주의 cell bank 구축여부
	○ 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 에 대한 생화학적 특성 분석	30	%	-식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 에 대한 생화학적 특성 분석여부
	○ 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 대량생산 및 분리정제 체계 확립	40	%	-식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 대량생산 및 분리정제 체계 확립 여부(순도 80% 이상)
4차년도 (2012)	○ 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 대량생산 공정 확립(20L/회 이상 생산 능력 확보)	20	%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 운용기술 확립 여부</li> <li>- 20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 10대 이상 동시 운용시설 구축 여부</li> </ul>
	○ 90% 이상의 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 분리정제 체계 확립	30	%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20L/회 용량의 배양액 농축기술 확립 여부</li> <li>- 20L/회 용량의 배양액으로부터 고순도(90% 이상)의 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 분리정제 여부</li> </ul>
	○ 고순도(90% 이상) TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 생화학적 특성 규명	30	%	- 식물유래 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 생화학적 특성 규명(온도, pH) 여부
	○ 분리 정제한 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 저장 및 포장기술 확립	20	%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물유래 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 최적 buffer 개발 여부</li> <li>- 최적 제형개발(동결건조 또는 액상) 여부</li> <li>- 고순도 효소별 specific activity확인 및 1 unit 결정</li> <li>- 효소활성 확인을 통한 최적 저장조건 확립(저장온도, 저장기간 등) 여부</li> </ul>
5차년도 (2013)	○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주에 대한 식물특허출원	30	%	- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주에 대한 식물특허출원 여부
	○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 제조공정의 scale-up(200L급 이상 바이오 리액터 운용)	35	%	- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 제조공정의 scale-up(200L급 이상 바이오 리액터 운용) 달성 여부

	○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 고순도(95% 이상) 분리·정제방법 확립	35	%	- TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 고순도(95% 이상) 분리·정제방법 확립 여부
--	---	----	---	--

라. 식물세포배양을 이용한 항체 대량생산 및 기능 분석 (제 1핵심-4 세부과제: 전북대학교)

구분 (연도)	세부연구목표	가중치		평가의 착안점 및 기준
1차년도 (2011)	○ Amylase와 CysP siRNA 식물발현벡터 제작	20	%	-식물발현 벡터 제작 여부
	○ Amylase와 CysP siRNA 식물발현벡터 형질전환	30	%	-식물형질전환 여부
	○ 현탁배양에서 항체 고발현 조건 확립	20	%	-현탁배양에서 항체 고발현 조건 확립 여부
	○ 현탁배양에서 분리된 항체에 대한 분리 및 기능 분석	30	%	-식물 유래 항체에 대한 기능 확인 여부
2차년도 (2012)	○ 식물발현벡터를 이용한 비의 형질전환체 선발 및 분자생물학적 분석	30	%	-형질전환체 선발 및 분자생물학적 분석 여부
	○ 형질전환체에서 도입된 유전자의 기능 확인 및 항체 생산량 증가 확인	20	%	-항체 생산량 증가 여부
	○ 치주균의 세포부착 및 침투에 대한 식물유래항체의 억제 효능	25	%	-식물유래항체의 세포부착 및 침투에 대한 억제 효능 확인 여부
	○ 치주균에 대한 식물유래항체의 opsonizations의 관찰	25	%	-식물유래항체의 opsonization 기능 확인 여부
3차년도 (2013)	○ 항체단백질 고발현 형질전환 세포주 선발	40	%	-고발현 세포주 확보 여부
	○ 항체단백질 세포주 특허	40	%	-세포주에 특허 출원 여부
	○ 항체단백질 발현 형질전환체 선발	20	%	-형질전환 선발 여부

마. 경구백신 효율 증진 방안 및 백신 효능 검정 연구 (제 2핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

구분 (연도)	세부연구목표	가중치		평가의 착안점 및 기준
1차년도 (2009)	○ 소장 점막면역계의 항 펩타이드 처리에 의한 면역반응 특성 분석	50	%	-소장 점막면역 조직에서 lymphocyte 분리 -면역세포에 항 펩타이드 처리 후 나타나는 cytokine 발현 양상 분석
	○ M cell model 발현 단백질 분석	20	%	- <i>In vitro</i> M cell model을 이용한 M cell 분화 -분화된 M cell에서의 단백질 발현 분석
	○ 표지 항원 및 항 펩타이드 융합 항원단백질 확보	30	%	-항 펩타이드를 포함하는 표지항원 발현 벡터 제조 -항 펩타이드를 포함하는 표지항원 재조합 단백질 발현
2차년도	○ 항 펩타이드의 작용 기작 분석을 통	30	%	- 소장의 점막면역 유도조직과 실험

(2010)	한 점막면역 조절 기작 이해			조직에서 lymphocyte 분리 - Marker를 이용한 세포 분리 및 분리된 세포 그룹에서 항 펩타이드에 의해 발현이 유도되는 cytokine profile 분석
	○ M cell 분화 후 발현되는 단백질 특성 분석을 통한 점막 면역계의 항원유입 이해	40	%	- <i>In vitro</i> human M-like cell model을 이용한 M cell 분화 - 분화된 M cell 및 mouse M cell에서 발현 단백질 규명
	○ 항 펩타이드의 항원전달 능력 분석을 통한 점막 보조제 개발	30	%	- 펩타이드와 항원을 이용한 <i>ex vivo</i> 연구를 통한 항원 전달 능력 분석
3차년도 (2011)	○ <i>In vivo</i> mouse 모델에서 항 펩타이드 LL-37의 점막 면역 조절 작용 분석	35	%	- 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질에 의해 점막 면역세포들의 면역 조절 작용 검증 - 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 의한 점막 면역 조절 작용 분석
	○ 항 펩타이드의 점막 보조제로서 기능 및 특성 분석	50	%	- 항 펩타이드를 포함하는 병원성 항원을 이용한 경구 백신 모델에서 효율적인 면역반응 유도 검증
	○ M cell target receptor 검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석	15	%	- 새로운 M cell target receptor 검증 - M cell target receptor, C5aR 와 병원균 유입에 따른 신호전달 체계 분석
4차년도 (2012)	○ 항 펩타이드의 점막면역 조절 기작에 대한 분석	25	%	- <i>In vitro</i> human M-like cell model을 이용한 M cell 분화 및 항 펩타이드의 발현 검증 - <i>In vitro</i> human M-like cell model을 이용한 항 펩타이드에 의한 면역 세포의 특성 분석
	○ 항 펩타이드의 점막 면역보조제로서 기능 및 특성 분석	50	%	-항 펩타이드를 포함하는 모델항원 및 병원성 항원을 이용한 경구백신 모델을 통한 효율적인 면역반응 유도 검증경구백신 모델에서 항 펩타이드에 의해 유도되는 면역반응의 특성 분석
	○ M cell의 target receptor C5aR를 통한 점막 보조제 개발	25	%	- C5aR 의 ligand로 기대되는 OmpH를 이용한 점막 면역반응의 효율성 및 특성 분석.
5차년도 (2013)	○ 항 펩타이드의 경구백신 보조제로서의 기능 검증	40	%	- 항 펩타이드 적용 항원의 경구면역에 의한 면역반응 유도특성 분석 여부
	○ M cell target receptor 검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석을 통해 경구 백신 보조제에 적용	40	%	- 항원의 M cell 전달에 따른 신호전달 특성 분석 여부
	○ M cell target receptor C5aR와 TLR 사이의 상호 신호전달에 의한 병원균 유입기작에 대한 이해 증진	20	%	- 병원균 유입에 따른 C5aR과 TLR 간의 상호작용 분석 여부

바. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발 (제 2 핵심 제 2세부과제: 고려대학교)

구분 (연도)	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차년도 (2009)	○ 식물 형질전환용 벡터 시스템 구축 및 형질전환	100 %	-특이 프로모터와 염기서열을 이용한MBP 유전자 발현을 위한 적정 발현시스템 구축 여부 -벼와 당근에 형질전환 여부
2차년도 (2010)	○ 당근 형질전환체에서 hMBP 단백질 과발현 확인 및 총 단백질 분리	25 %	- 당근 형질전환체에서 단백질 과발현 여부 - 형질전환 식물체에서 총 단백질 분리 여부
	○ 형질전환 벼에서 MBP 발현 측정	25 %	- 벼 종자에서 MBP 단백질의 발현정도 규명
	○ 고효율 발현 식물 형질전환용 벡터 시스템 구축 및 형질전환	25 %	- 단백질의 고생산 벡터 시스템 구축 및 형질전환 여부
	○ Chemical inducible promoter (CIP) 개발	25 %	- CIP 이용한 유전자 발현 시스템 구축
3차년도 (2011)	○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	100 %	-종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발 -외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축
4차년도 (2012)	○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	100 %	- 콩과 옥수수 종자에서 종자 특이적 발현 프로모터의 발현 분석 - 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색 및 선별 - 종자 특이적 프로모터의 고등식물 형질전환용 벡터 시스템 개발 및 형질전환 - 형질전환체에서 발현 분석
5차년도 (2013)	○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	100 %	- 종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발 - 외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축

사. 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 신품종 개발 (제 2핵심-3 세부과제: 경상대학교)

구분 (연도)	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차년도 (2009)	○ <i>gntI (cg)</i> mutant나 $\beta$ 1,2-xylosyltransferase와 $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase의 knockout 또는 knock-down을 기법을 이용한 immunogenic $\beta$ 1,2-xylose와 $\alpha$ 1,3-fucose가 없는 당단백질 생산 호스트 개발	50 %	- $\beta$ 1,2-xylose와 $\alpha$ 1,3-fucose가 없는 당단백질 생산 식물 개발 여부
	○ Con A-, HRP-, $\alpha$ 1,3-fucose-,	50 %	- $\beta$ 1,2-xylose와 $\alpha$ 1,3-fucose가 없는

	$\beta$ 1,2-xylose- 항체를 이용한 호스트의 N-glycan 분석			당단백질 생산 식물의 N-glycan 분석 여부
2차년도 (2010)	○ 조직 특이적으로 단백질 발현을 유도하는 강력한 promoter, 단백질 glycosylation에 필수적인 signal sequence를 이용한 유용 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축	50	%	-고 발현용 이원벡터 시스템 구축 여부
	○ 목표(target) 단백질 발현용 재조합 벡터 구축, Agrobacterium을 이용한 식물체 형질전환 및 고 발현 계통확립	50	%	-glucocerebrosidase 발현 재조합 벡터 구축, Agrobacterium을 이용한 형질전환 및 고 발현 계통확립 여부
3차년도 (2011)	○ xylose와 fucose가 없는 N-glycan 생산 벼 homo line 및 <i>gnt1</i> cell line 확립	50	%	- $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase I, N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout homo lines ( <i>fuct1</i> , <i>gnt1</i> ) 및 <i>gnt1</i> cell line 확립 여부
	○ 당 단백질의 발현량 증가 및 단백질 quality control 기술 개발	50	%	-단백질 폴딩 조절 인자 확보 및 특성 규명 여부
4차년도 (2012)	○ 식물세포 발현 단백질 분리용 affinity tag (vector) 개발	50	%	-고효율 tandem affinity purification (TAP) tag 개발 여부
	○ 호스트 단백질 분리 및 con A-, HRP-, $\alpha$ 1,3-fucose-, $\beta$ 1,2-xylose-항체 및 MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석	50	%	-호스트 단백질의 N-glycan 분석 여부
5차년도 (2013)	○ 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 호스트 개발	50	%	-식물 특이적인 엔-당화 효소가 제거된 돌연변이 교배집단 구축 여부
	○ 당 단백질의 고 발현용 binary vector 시스템 구축 및 target 당 단백질 발현 형질전환체 구축	50	%	-개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트를 이용한 target 단백질 (glucocerebrosidase, PNGaseA) 발현 여부

아. 식물세포에서의 단백질 고축적 기법 개발 (제 2핵심-4 세부과제: 포항공과대학교)

구분 (년도)	세부연구목표	가중치		평가의 착안점 및 기준
1차년도 (2009)	○ 고효율 translational enhancer의 개발과 기작 규명	30	%	-Enhancer sequence의 기능 개량
	○ Translational initiation factor의 확보와 overexpression에 대한 효능 검증	30	%	-Overexpression effect의 효능 검증
	○ 엽록체 targeting 기작 규명을 통한 고효율 단백질 엽록체 targeting 기작 개발	20	%	-단백질의 엽록체 targeting 기작 규명



	○ Mitochondrial targeting 기작 규명과 이를 이용한 단백질 고출적 기술 개발	20	%	-Mitochondrial targeting 기작 규명
2차년도 (2010)	○ 5' UTR의 분석과 이를 이용한 high translational vector 구축	25	%	-new translational enhancer 확보
	○ PRA 및 YIP의 trafficking regulation 기작 규명과 이를 이용한 단백질 trafficking 기작 규명	25	%	-PRA 및 YIP 관련 기작 규명을 통한 논문 발표
	○ Chloroplast targeting 기작 규명과 이를 이용한 단백질 고발현 시스템 구축	25	%	-엽록체 protein targeting 기작 규명을 통한 논문 발표
	○ Mitochondrial protein import 기작 규명과 이를 이용한 단백질 생산 시스템 구축	25	%	-mitochondrial protein import 기작 규명과 논문 발표
3차년도 (2011)	○ 5' UTR의 특성 규명과 이를 이용한 발현 형질 전환체 구축	30	%	-새로운 고효율 UTR 확보
	○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발	30	%	-translational initiator mutant 확보
	○ PRA 및 PRA interacting protein YIP를 이용한 단백질 trafficking 기작의 규명과 이를 이용한 선택적 단백질 분비 시스템 구축	20	%	-PRA trafficking 기작 규명과 관련 논문 발표
	○ Chloroplast targeting 기작 규명	10	%	-AKR2의 엽록체 binding 기작 규명
4차년도 (2012)	○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발	20	%	-translation factor의 기능 분석
	○ Chloroplast targeting 기작 규명	30	%	-chloroplast targeting 기작의 규명 정도 및 논문 발표
	○ Mitochondrial targeting 기작 검증	30	%	-mitochondrial targeting signal의 정보 분석 및 논문 발표 여부
	○ Protein trafficking 기작의 규명	20	%	-Trafficking 관련 단백질의 동정 및 이들 단백질의 기능 규명 및 관련 논문 발표 여부
5차년도 (2013)	○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발	20	%	- eIF1A의 mutant의 단백질 translational efficiency 확인 및 5' -UTR의 조절 여부 확인
	○ Chloroplast targeting 기작 규명	20	%	- 엽록체로의 단백질 이동에 관한 transit peptide의 기능 분석과 논문 발표 여부
	○ Mitochondrial targeting 기작 검증	20	%	- 미토콘드리아로의 단백질 이동 signal인 presequence의 분석과 논문 발표 여부
	○ Protein trafficking 기작의 규명	20	%	- protein trafficking 관련 factor들의 동정과 이들의 역할 규명 및 논문 발표 여부
	○ 실용화 연구	20	%	- high level expression vector를 이용하여 단백질 발현을 시도함. Total soluble protein의 1%까지 확보할 수 있다는 가능성을 확인함.

### 3. 연구개발목표의 달성도

#### 가. 돼지질병방어를 위한 벼 신품종 개발 (제 1핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<1차년도> ○ 식물발현벡터의 제작	-항원유전자와 Cholera toxin B subunit의 융합유전자를 가진 식물발현벡터의 제작	100
○ 식물발현벡터의 제작	-항원유전자와 E. coli heat-labile toxin B subunit의 융합 유전자를 가진 식물발현벡터의 제작	100
○ 벼의 형질전환	-식물발현벡터를 이용한 벼의 형질전환	120
<2차년도> ○ 식물발현벡터를 이용한 벼 (신동진)의 형질전환체 선발	- CTB-COE와 LTB-COE로 형질전환된 형질전환체를 선발함.	100
○ 형질전환체의 재분화	- 선발된 형질전환체로부터 벼를 재분화시킴	100
○ 형질전환체의 도입된 유전자의 발현을 확인	- 선발된 형질전환체에서 항원유전자의 도입을 확인함 - 선발된 형질전환체에서 항원단백질의 발현을 확인함 - 발현된 항원단백질의 Gm1에 대한 결합능을 확인함	100
○ 재분화 벼의 homoline 선발	- 선발된 형질전환체에서 벼를 재분화 시킴 - 재분화된 벼로부터 약배양을 이용한 homoline 선발	100
<3차년도> ○ 항원단백질 발현 형질전환 식물체 선발 및 확보	-CTB-COE, LTB-COE, COE-Co1로 형질전환된 형질전환체를 선발함.	100
○ 약배양을 이용한 homoline인 계통을 확보하고 고발현 식물체 선발	-T0 형질전환 식물체에서 얻은 종자 발아 및 재배 -약배양을 수행하여 homoline 계통을 식물 선발 및 확보	100
○ 아그로박테리움을 이용한 벼의 형질전환	-식물발현 벡터 제작 및 형질전환 -선발된 형질전환체에서 분자생물학적 분석	100
○ 형질전환 callus를 이용한 실험동물에서 면역반응 유도	-형질전환 callus 배양 및 동물실험 시료 확보 -경구적인 방법을 이용한 동물 실험 -실험동물에서 IgG, IgA, ELISPOT 분석	100
○ M-cell binding peptide Co1과 융합항원단백질 발현 형질전환	-식물발현 벡터 제작 및 형질전환 -선발된 형질전환체에서 분자생물학적 분석	추가
<4차년도> ○ 실험동물에서 효율적인 면역반응 유도의 증진에 대한 조건 확립	-LTB-COE, CTB-COE, COE-Co1 항원단백질을 경구적으로 feeding하는 동물실험을 수행하여 면역반응 유도 재확인 -항원단백질의 투여량을 늘려 면역반응 유도 증진 확인	100
○ 항원단백질 발현 종자를 이용한 동물실험	-LTB-COE 항원단백질을 생산 벼 종자를 경구적인 방법으로 feeding한 동물실험에서 항원단백질 LTB에 대한 면역반응 유도 확인	100
○ 약배양을 이용하여 확보된 homozygous lines과 agrobacterium 방법으로 형질전환한 lines을 분석하여 event line 후보 작물 선발	-약배양을 이용하여 확보된 homozygous와 agrobacterium-mediated 형질전환 방법으로 얻은 형질전환 식물체에서 도입된 유전자의 copy number 분석을 위한 Real Time PCR, Southern blot analysis, flanking T-DNA sequencing 분석을 수행하여 event lines 확보	100
○ 다른 epitope(S1D) 항원유전자에 대한 식물발현벡터 제작 및 식물 형질전환	-S1D, S1D-Co1, CTB-S1D, S1D-LL37, S1CD, S1CD-Co1 항원유전자 발현을 위한 식물발현 벡터 제작. -벼의 형질전환과 N. benthamiana에서 agroinfiltration 방법에 의해서 항원단백질의 발현을 확인함.	추가
○ 식물에서 발현된 S1D 항원단백질을 이용한	-벼에서 발현된 S1D, S1D-Co1와 S1D-LL37 항원단백질을 이용한 동물실험을 수행함	추가

동물실험	-경구적인 방법을 이용한 동물 실험에서 4주째 먹인 실험동물에서 항원단백질에 대한 IgG 항체 유도 확인함.	
<5차년도> ○ 항원단백질을 발현하는 형질전환체를 이용한 목적동물실험	-항원단백질을 발현하는 형질전환 식물체를 냉동 건조한 분말을 목적동물인 모돈에게 경구적으로 투여함 -모돈에서 LTB에 대한 항체는 혈액과 초유에서 확인하였으나 COE에 대한 항체는 확인하지 못하였음 -자돈에 PEDV로 공격접종한 결과 낮은 수준의 폐사율과 분변으로 낮은 수준의 바이러스 배출을 확인함	100
○ S1CD 항원단백질을 발현하는 형질전환체를 이용한 실험동물 실험	- S1CD, S1CD-Co1 항원단백질을 transient 발현시킨 식물체 잎을 냉동건조하여 실험 동물에 경구적으로 투여함. - S1CD와 S1CD-Co1를 먹인 그룹에서 약한 IgA 항체 반응을 보였음	100
○ 선발된 항원단백질을 발현하는 event line의 농업형질 검사	-Event line으로 선발된 형질전환 식물체를 농업형질 검사하여 불임이 아니고 정상적인 등숙한 개체를 확보함	100

나. 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 신품종 개발 (제 1핵심 2 세부과제: (주)젠닥스)

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<1-2차년도> ○ 담배에서 노다바이러스 항원단백질 생산 및 항원성 검증	• 노다바이러스 항원단백질 유전자 분리 및 재조합단백질 생산	100
	• 노다바이러스 항원단백질 항체생산	100
	• 항체가 상승을 위한 키토산 formulae 개발에 resin 합성가능여부 확인	100
	• 어류 사료내의 담배 식물재료 최적 formulae 개발하기 위해 어류사료 최대 함유율 측정	100
	• 노다바이러스 항원단백질 유전자의 담배 색소체 발현 최적화를 위한 코돈 최적화 및 색소체 형질전환 벡터제작	100
	• 노다바이러스 항원단백질 발현 색소체 형질전환 담배 개발 - Bombarding 10회 이상 실시하여 형질전환담배 확보함	100
	• T <sub>0</sub> 세대 담배 색소체 게놈내에 도입된 항원유전자 확인 - Genomic DNA PCR로 야생형(1.6kb)과 형질전환체 (4.5kb)를 구분하여 총 16개라인의 형질전환체를 선발함 - RT-PCR로 노다바이러스 발현양을 분석한 결과 actin 유전자에 비해 2-3배 이상 발현양이 높은 세 라인을 선발함.	100
	• 노다바이러스 항원단백질 유전자의 담배 핵 발현 을 위한 코돈 최적화 및 핵 형질전환 벡터제작	추가진행
	• 노다바이러스 항원단백질발현 핵 형질전환 담배 개발 - Agrobacterium 형질전환 후 항생제 배지에서 12개 라인을 선발함	추가진행
	• T <sub>0</sub> 세대 담배 핵으로 도입된 항원유전자 확인 - Genomic DNA를 추출하여 벡터 특이적 프라이머와 Agrobacterium 특이적 프라이머로 PCR 수행하여 Agrobacterium 오염을 구분한 후 최종 7개 라인을 선발함.	추가진행

	- RT-PCR로 노다바이러스가 발현되는 세 라인을 선발함.	
	• 노다바이러스 항원 단백질의 바실러스에서의 발현 - 노다바이러스 발현용 벡터를 제작하여 바실러스에 형질전환 한 후 노다바이러스 단백질 발현을 확인 중에 있음.	추가진행
	• <i>Nicotiana benthamiana</i> 잎에서 Viral expression을 이용한 노다바이러스 항원단백질 생산 - 노다바이러스의 viral expression 벡터를 제작하고 Agrobacterium에 형질전환 한 후 <i>N. benthamiana</i> 잎에 접종하여 바이러스 유전자 및 단백질 발현을 확인 중에 있음.	추가진행
<3차년도> ○ 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증	-T0, T1세대 형질전환체의 DNA, RNA, protein수준에서 항원단백질 도입 및 발현을 확인함 -급이실험을 위한 식물체내 항원단백질 농도 측정하여 실험동물 구강투여량 결정함 -total soluble protein의 19.1% - 50.7%에 달하는 항원단백질 발현수준 확인함 -VLP 형성 확인 중 .	100
○ 핵형질전환 식물체의 항원단백질 발현검증	-T0세대 형질전환체 확보한 후 DNA, RNA수준에서 항원유전자 도입 및 발현 확인함	100
○ 공격접종을 위한 순수 노다바이러스 배양	-노다바이러스 감염 능성어로부터 바이러스를 분리한 후 RT-PCR로 감염바이러스 최종 확인함 -세포 lysate를 fish SSN-1 cell line에 접종하여 CPE 생성을 최종확인하고 cell line을 보관	100
○ 치어 면역을 통한 항체가 형성 확인	-담배유래 항원단백질로 현재 마우스에 1주 간격으로 4회 구강투여 중이며 투여 완료후 IgG, IgA 농도를 측정하여 항체유도 확인예정 -능성어 치어는 봄계절에만 확보 가능하므로 치어 항체유도실험을 봄에 실시할 계획임	50
○ 니코틴프리담배에서 엽록체 형질전환 방법 확립(사업단기반기술)	-니코틴프리 색소체 형질전환체 T0 세대 생산하여 항원유전자 및 단백질 발현됨을 확인함 -4차년도에는 T1세대를 확보하고 세대간 항원유전자 및 항원단백질 발현유지를 검증할 계획임	100
○ 담배에서 transient expression system을 이용한 목적 단백질의 대량생산법 확립(사업단기반기술)	-노다바이러스의 viral expression 벡터를 제작하고 <i>N. benthamiana</i> 잎에 Agrobacterium infiltration 접종하여 항원유전자 및 단백질 발현 확인함	100
○ 노다바이러스 coat protein monoclonal antibody제작	-양성대조군 확보 및 감염실험 시 감염개체 양성을 조사에 필요한 3개의 단클론항체 B13, B26, E54에 대한 역가 및 반응능 테스트 완료함	추가진행
<4차년도> ○ 담배에서 노다바이러스 항원단백질 생산 및 항원성 검증	-담배 ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun) 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증 - T2, T3, T4세대 항원단백질 유전자의 유지 검증	100
	-능성어 치어에 담배발현 항원단백질 구강투여 후 항원특이적 면역 반응 분석	100
	-담배발현 항원단백질 구강투여 후 어체 조직의 병리조직학적 검사를 하여 백신의 독성여부 확인	100
	-노다바이러스에 노출시킨 후 상대생존율 조사	100
	-니코틴프리 담배 ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609)색소체 형질전환 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증 - T1세대에서의 항원단백질 유전자 유지 검증	추가진행
	-Agrobacterim vectors pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP,	추가진행

	pTRAKc-ERH를 이용한 transient expression system 확립 - Chloroplast target vector에서 단백질 수준에서 발현 확인	
	-pCAMBIA1302 vector의 GFP 유전자 앞부분에 CPMV RNA-2 5' leader (R2L) sequence 도입 후 타겟 단백질 발현 level 확인 - 타겟 단백질의 발현 level 증가 확인	추가진행
<5차년도> ○ 니코틴프리 담배 ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609) 색소체 형질전환 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증	- T <sub>1</sub> 형질전환체의 유전자 도입 및 재조합 단백질 발현 검증 결과 Noda 유전자 발현 및 항원단백질 발현 확인. 유전자가 안정적으로 후대에 유전됨이 확인됨	100
○ 담배 transient expression system을 이용한 목적단백질 대량생산법 확립	- infiltration 및 vacuum inoculation 발현 검증 완료 - 일시적 방법을 통한 노다 항원단백질 발현 최적 조건 확립 - 담배 이외의 작물에서의 Noda 항원단백질 발현 확인	100
○ 형질전환 담배의 품종 보호 출원 및 등록	- Noda 항원단백질 발현 삼선 품종 생명자원 센터 기탁 - 삼선 및 니코틴 프리 담배 품종에서의 Noda 항원단백질 발현관련 특허 2건 출원	100

다. 재조합 산업용 효소 신제품 개발 (제 1핵심- 3 세부과제: (주)엔비엠)

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
<1차년도> ○ TEV endopeptidase 유전자 합성	- TEV endopeptidase 유전자 염기 사용빈도 분석 - 벼에서 효율적으로 발현 할 수 있도록 염기서열을 설계 - 80mer primer set 제작 (12종류) - Overlap PCR을 이용하여 유전자 합성완료	100
○ 식물발현벡터의 제작 및 형질전환	- 3Dsp의 signal peptide sequence를 N-말단에 부착시킨 TEV endopeptidase 유전자 합성 - 상기 유전자를 벼 현탁세포 특이적 고발현 RAmy3D promoter를 이용한 식물발현벡터 제작	100
○ 고생산 세포주의 확립	- 유전자 총을 이용하여 TEV endopeptidase 유전자를 벼에 도입 - 항생제를 포함한 배지에서 14 line의 calli 선발 - PCR을 이용하여 14 line의 유전자 도입을 확인 - 유전자 도입이 확인된 callus 세포주는 현재 mRNA와 단백질 발현 여부를 확인하기 위한 Northern blot 과 Western blot analysis 수행 중에 있으며 본 과제 1차년도 종료까지 완료 가능하다고 판단 됨 - 형질전환 callus에 대한 현탁세포 유도 완료	100
○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화	- 형질전환 14 line에 대한 식물체 재분화 완료	100
○ TEV endopeptidase 활성 측정을 위한 substrate 단백질 생산	- 식물 유래 TEV endopeptidase의 활성을 측정하기 위한 substrate 단백질 확보를 위하여 EGFP와 TNF- $\alpha$ 사이에 인식부위를 갖는 유전자 합성 - 대장균 발현벡터 및 생산 균주 제작 - 융합단백질 생산 및 분리정제	추가 진행

○ 박테리아 발현 system을 이용한 TEV endopeptidase 단백질 발현	- 향후 연구진행에 positive control으로서 필수적으로 사용 될 고가의 TEV endopeptidase 확보를 위하여 대장균 발현벡터 및 생산 균주 제작 - TEV endopeptidase 단백질 생산 및 분리정제 - 상기에서 확보한 substrate 융합단백질을 이용하여 proteolytic activity 확인	추가 진행
○ 벼 현탁세포 대량 배양 시스템 구축	- 참여기업인 (주)엔비엠에 10L 규모의 air-bubble type bioreactor 30대 동시 운용 시설 구축 - 형질전환된 벼 현탁세포의 대량 배양을 위하여 현재 air-bubble type bioreactor (10 L) 운용기술 확립	추가 진행
○ 벼 현탁세포 유래 단백질 당패턴 규명	- 벼 유래 당단백질에 대한 당 패턴확인 완료	추가 진행
<2차년도> ○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화	- TEV endopeptidase 고생산 식물세포주로부터 N6 식물 재분화 배지를 이용하여 식물체를 재분화 (5 종류의 elite line 확보) - 재분화 된 식물체는 순화하여 포토에 정식하고 유전자변형식물체 전용의 유리온실에서 재배 중 - 형질전환 식물체로부터 종자를 확보하였음	100
○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사	- Northern blot analysis, Western blot analysis, 효소활성 등의 분자생물학적인 분석결과를 기초로하여 TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발하였음 - TEV endopeptidase 고생산 라인 중에서 homo line의 선발 중에 있으며 T0 세대에 대한 농업형질을 조사하였음	100
○ 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인	- TEV endopeptidase 기질 단백질을 이용하여 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 효소 활성을 확인하였음	100
○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 현탁세포 확립	- TEV endopeptidase 고생산 식물세포주로부터 현탁세포를 확립하였음 - 참여기업인 (주)엔비엠에 10L 규모의 air-bubble type bioreactor 30대 동시 운용 기술을 확립하였음 - 형질전환된 벼 현탁세포로부터 TEV endopeptidase를 대량생산하기 위하여 air-bubble type bioreactor (10 L)를 이용하여 대량배양을 시작하였음	100
○ TEV endopeptidase 항체개발	- Western blot analysis와 TEV endopeptidase에 대한 ELISA를 이용한 정량 등에 필수적 필요하다고 판단되어 TEV endopeptidase에 대한 항체를 개발하였음	추가 진행
○ 벼 현탁세포 유래 단백질 당패턴 규명	- 벼 현탁세포 유래 단백질의 사업화를 위하여서는 당패턴의 인간화기술 확립이 절실하여 당패턴의 인간화 기술개발을 추가로 실시하였음	추가 진행
<3차년도> ○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사(2차년도 이후 계속)	-TEV endopeptidase 고생산 T1, T2 세대의 종자로부터 callus를 정상적으로 유도하고 이를 이용하여 현탁세포 배양을 실시하였음 -상기의 현탁세포로부터 정상적으로 TEV endopeptidase가 생산됨을 확인하였음	100
○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주의 cell bank 구축	-TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주를 대상으로 세포 동결보존 체계를 확립하였음 -TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 공정구축을 위하여 Master Cell Bank와 Working Cell Bank를	100



	구축하였음	
○ 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 에 대한 생화학적 특성 분석	-식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 생화학적 특성(온도, pH, 활성 Unit 등)을 확인하였음	100
○ 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 대량생산 및 분리정제 체계 확립	-TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주의 대량 배양 최적 조건 확립하였음 -식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 분리정제 체계 확립 (순도 80% 이상)	100
○ 벼 현탁세포 유래 당단백질의 인간화	-벼 현탁세포 유래 단백질의 사업화를 위하여서는 당패턴의 인간화기술 확립이 절실하여 당패턴의 인간화 기술개발을 추가로 실시하였음	추가 진행
<4차년도> ○ 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 대량생산 공정 확립(20L/회 이상 생산 능력 확보)	- 20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 운용기술을 확립하였음 - 20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 10대 이상 동시 운용시설을 구축하였음 - 당초 목표인 200L/회 보다 10배 배양규모가 큰 air-bubble type bioreactor를 제작하였으며 현재 시운전 중에 있음(초과 달성)	150
○ 90% 이상의 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 분리정제 체계 확립	- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주의 대량 배양 후 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 분리정제 체계를 확립하여 순도 90% 이상의 단백질을 분리정제 하였음	100
○ 고순도(90% 이상) TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 생화학적 특성 규명	- 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 의 생화학적 특성(온도, pH, 활성 Unit 등)을 확인 한다	100
○ 분리 정제한 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 저장 및 포장기술 확립	- 식물유래 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 최적 buffer 개발 - 최적 제형개발(동결건조 또는 액상) - 고순도 효소별 specific activity확인 및 1 unit 결정 - 효소활성 확인을 통한 최적 저장조건 확립(저장온도, 저장기간 등)	100
○ 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 상표출원	- 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 상표등록을 위한 상표출원을 완료하였음	초과 달성
○ 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 산업화 달성	- 국제 박람회와 관련 학회에 제품 홍보을 위한 부스를 설치하고 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 제품홍보를 하였으며, 본 연구를 통해 생산된 제품의 판매를 시작하였음	초과 달성
<5차년도> ○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주에 대한 식물특허출원	·TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주 선발 완료 ·TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 에 대한 식물특허출원	100
○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 제조공정의 scale-up(200L급 이상 바이오 리액터 운용)	·TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 연속배양방법 확립 ·200L 규모의 바이옱액터 운용기술 확립 ·200L급 대용량 바이옱액터를 활용한 단백질 생산의 SOP 확립 ·생산된 재조합 단백질의 품질관리(QC) 체계 확립	100
○ TEV endopeptidase 및	·200L/회 용량의 배양액 농축기술 확립	100

Enterokinase에 대한 고순도(95% 이상) 분리·정제방법 확립	·200L/회 용량의 배양액으로부터 고순도(95% 이상)의 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 분리정제 ·고순도(95%) 효소별 specific activity 확인 및 1 unit 결정 ·고순도(95%) 효소에 대한 저장성 확인(저장온도, 저장기간 등)	
---	---	--

라. 식물세포배양을 이용한 항체 대량생산 및 기능 분석 (제 1핵심-4 세부과제: 전북대학교)

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<1차년도> ○Amylase와 protease의 발현억제를 이용한 항체 단백질의 발현 증진	-Amylase와 protease에 대한 siRNA를 제작 및 식물발현 벡터 제작 -FimA 항체 생산 식물체에 형질전환	100
○현탁배양에서 생산된 항체에 대한 분리 및 기능 확인	-현탁배양에서 항체 고발현 조건 확립 -현탁배양에서 생산된 항체의 phagocytosis 및 실험동물에서 기능 확인	100
<2차년도> ○식물발현벡터를 이용한 벼의 형질전환체 선발 및 분자생물학적 분석	-Amylase와 cysteine proteinase의 ihpRNA 발현 형질전환체를 선발하여 genomic DNA PCR, SDS-PAGE, western blot 분석을 수행하여 항원유전자의 도입, amylase와 cysteine proteinase 분비 및 활성의 감소를 확인함.	100
○형질전환체에 도입된 유전자의 기능 확인 및 항체 생산량 증가 확인	-Amylase와 cysteine proteinase 감소된 형질전환체에서 #265 항체단백질에 대해서 2.2배의 발현 증진을 확인함	100
○치주균의 세포부착 및 침투에 대한 식물유래항체의 억제 효능	-식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 치주균에 대한 세포부착 및 세포내 침투능력에 대한 억제 효능을 확인함	100
○치주균에 대한 식물유래항체의 opsonizations의 분석	-식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 opsonization에 의한 neutrophill의 치주균의 사멸능의 증가를 확인함	100
○Transient expression을 이용한 항체단백질의 발현 증진	-Transient expression을 위한 agroinfiltration 방법을 이용하여 항체단백질을 ER에 targeting한 방법에 의해서 TSP의 0.13% 발현수준을 확인함.	추가
<3차년도> ○항체 단백질 고발현 형질전환 세포주 선발 및 대량생산을 위한 조건 확립	-형질전환 세포주에서 항원단백질 고생산 식물 세포주를 선발하기 위하여 식물세포 현탁 배양 확립함 -식물세포 현탁배양에서 항체단백질, amylase, proteinase activity, Cl-T1 발현등을 확인함 -항체단백질 발현을 하는 세포주 특허를 위한 출원 준비함	100
○항체 단백질 발현 형질전환 식물체 선발	-Rice amylase 1A promoter 조절하에 항체유전자 발현을 위한 식물형질전환을 위한 식물발현벡터 제작 - Agrobacterium-mediated 형질전환 방법을 이용한 벼의 형질전환을 수행함 - 형질전환된 종자에서 항체단백질의 낮은 발현율을 확인함. - 벼의 종자에서 항체단백질 고발현을 위한 강력한 promoter를 찾기 위한 실험을 진행중.	100

마. 경구백신 효율 증진 방안 및 백신 효능 검정 연구 (제 2핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
<p>&lt;1차년도&gt;                      ○ 소장 점막면역계에서 항 펩타이드에 의한 면역반응 특성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드에 의한 점막면역 반응 특성을 분석하기 위해 장 점막 면역세포 확보</li> <li>- 장 점막 면역세포들에 항 펩타이드 처리 시 Th17 분화와 관련된 cytokine 발현 특성의 규명</li> <li>- 장 점막 면역세포들에 항 펩타이드 처리 시 IL-17의 발현 및 발현세포의 증가 특성 규명</li> <li>- 장 점막 면역세포들에 항 펩타이드 처리 시 IL-23R mRNA의 발현 증가 특성 규명</li> <li>- 장 점막 면역세포들에 항 펩타이드 처리 시 항 펩타이드의 receptor인 P2X7R mRNA의 발현 증가 특성 규명</li> <li>- 장점막 면역세포들에 항 펩타이드 처리 시 IL-17을 발현하는 세포들의 증가를 FACS를 통하여 검증</li> </ul>	100
<p>○ M cell model 단백질 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vitro</i> M cell model에서 human 및 mouse M cell marker인 GP2 protein의 발현을 확인하여 M cell의 분화 검증</li> <li>- <i>In vitro</i> M cell model에서 새로운 M cell 분화 예상 단백질인 CD88의 발현 특성 규명</li> </ul>	100
<p>○ 표지 항원 및 항 펩타이드 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 표지 항원인 EGFP의 C-terminal에 항 펩타이드 유전자 삽입을 통해 재조합 항원단백질 발현 벡터 확보</li> <li>- 표지 항원인 EGFP의 C-terminal에 항 펩타이드 유전자 삽입을 통해 제조한 재조합 벡터로부터 재조합 항원단백질 확보</li> </ul>	100
<p>&lt;2차년도&gt;                      ○ 항 펩타이드의 작용 기작 분석을 통한 점막면역 조절 기작에 대한 이해</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 소장 점막 면역 유도조직으로부터 면역 세포 분리</li> <li>- 유도 조직으로부터 분리된 면역세포들이 항 펩타이드에 의해 Th17 세포 분화와 연관되어 있는 CX3CR1 및 CD70을 발현하는 세포의 수 증가 규명</li> <li>- <i>In vitro</i>에서 LL-37에 의해 분화된 CX3CR1<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> dendritic cell(DC)에 의해 Th17 세포의 분화를 규명</li> </ul>	100
<p>○ M cell 분화 후 발현되는 단백질의 특성 분석을 통한 점막의 항원유입 기작에 대한 이해</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vitro</i> human M-like cell 및 mouse M cell에서 C5aR의 발현을 규명</li> <li>- M cell로 mucosal pathogen인 <i>Y. enterocolitica</i>의 침투 시 C5aR의 발현 및 C5aR의 phosphorylation을 확인하여 항원 유입 시 C5aR의 기능이 작용함을 확인</li> </ul>	100
<p>○ M cell에서 발현되는 C5aR의 경구백신 target receptor로서의 사용 가능성 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- C5aR의 ligand 중 하나인 OmpH를 이용하여 항원의 M cell targeting 가능성 검증</li> <li>- OmpH ligand를 경구백신 mouse 모델인 EGFP system에 적용하여 oral priming의 높은 효과를 검증하여 C5aR의 M cell target receptor로서의 기능을 확인</li> </ul>	추가 연구진행
<p>○ 항 펩타이드의 항원 전달 능력 분석을 통한 효과적인 점막 보조제 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M cell에서 항 펩타이드의 receptor인 p2X7 receptor의 mRNA 증가를 규명</li> <li>- 항펩타이드 LL-37을 이용한 M cell로의 효과적인 항원 전달능력을 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> system에서 모두 검증</li> </ul>	100

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드의 면역 증강 효과를 통한 효과적인 면역 보조제 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드 LL-37을 경구 백신 mouse 모델인 EGFP system에 적용하여 높은 oral priming 효과를 검증</li> <li>- 따라서, C5aR의 M cell target receptor로의 기능 검증 및 경구백신 보조제로의 가능성을 제시</li> </ul>	<p>추가 연구진행</p>
<p>&lt;3차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드의 점막 면역 조절 기작에 대한 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>In vitro</i> M like cell과 소장의 유도조직(PP)에서 분리된 lymphocyte를 이용한 <i>in vitro</i> FAE model 확립</li> <li>-<i>In vitro</i> FAE model에서 modulation된 PPL의 surface marker 분석 결과 CD70과 CX3CR1 molecule을 발현하는 세포가 증가하는 것을 FACS를 통해 검증</li> <li>-<i>In vitro</i> FAE model에서 modulation 된 PPL의 특성을 분석한 결과 transcription factor인 STAT-3의 phosphorylation이 증가한 것을 FACS를 통하여 확인</li> <li>-<i>In vitro</i> FAE model에서 modulation 된 PPL의 특성을 분석한 결과 IL-17 and IFN-g를 분비하는 세포의 수가 증가한 것을 ELISPOT으로 확인</li> <li>-<i>In vitro</i> M-like cell에서부터 항 펩타이드 LL-37의 발현을 mRNA 와 protein 수준에서 qRT-PCR 과 Western blot을 통하여 규명</li> </ul>	<p>100</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vivo</i> mouse model에서 항 펩타이드 발현 조절에 따른 소장 점막 면역세포들의 특성 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-항생제 투여에 따른 <i>in vivo</i> mouse model 확립</li> <li>-<i>In vivo</i> mouse model에서 commensal bacteria의 대사산물인 butyrate의 경구 투여를 통해 유도되는 M cell 주변의 CX3CR1+ cell을 CLSM을 통해 확인</li> <li>-<i>In vivo</i> mouse model에서 commensal bacteria의 대사산물인 butyrate의 경구 투여를 통해 유도되는 면역세포들의 특성분석을 통해 butyrate에 의해 IL-17 secretory cell들이 증가하는 것을 FACS 및 ELISPOT을 통해 확인</li> </ul>	<p>추가 연구진행</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드의 점막 보조제로써 기능 및 특성 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주 동안의 serum과 fecal extract의 sample로부터 EGFP 특이적인 IgG와 IgA의 level 증가를 ELISA를 통해 확인</li> <li>-항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area와 mucosal compartment의 lymphocytes를 분리하여 EGFP 특이적인 IgG 혹은 IgA를 분비하는 세포의 수의 증가를 ELISPOT을 통해 확인</li> <li>-항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area와 mucosal compartment의 lymphocyte를 분리한 후 항원에 대해 반응하는 cytokine을 ELISPOT으로 분석한 결과 항 펩타이드는 Th1/Th17 면역반응을 보다 높게 유도하는 것을 확인</li> <li>-항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area의 lymphocyte를 분리하여 항원에 대해 반응하는 세포들의 proliferation을 tritium uptake를 통해 검증한 결과 항 펩타이드는 T cell에 의하여 유도되는 면역반응에 의하여 이루어지는 것을 확인</li> <li>-Oral tolerance를 유도하지 않고 oral priming을 유도함을 확인하기 위하여 systemic challenge 후 이전과 동일한 실험을 진행 한 결과 항 펩타이드에 의해 유도되는 면역반응은 경구내성을 유도하지 않으며 높은 oral priming effect를 유도함을 검증</li> </ul>	<p>100</p>

<p>○ 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로써 병원성 백신 모델에 적용</p>	<p>-항 펩타이드와 Dengue virus 항원 EDIII를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주 동안 serum과 fecal extract의 sample로부터 EDIII 특이적인 IgG 와 IgA의 level의 증가를 ELISA를 통해 확인</p> <p>-EDIII-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area와 mucosal compartment의 lymphocyte를 분리하여 EDIII 특이적인 IgG 혹은 IgA를 분비하는 세포의 수 증가를 ELISPOT을 통해 확인</p> <p>-항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area와 mucosal compartment 의 lymphocyte를 분리 후 항원에 대해 반응하는 cytokine을 ELISPOT으로 분석 한 결과 항 펩타이드는 Th1/Th17 면역반응을 보다 높게 유도하는 것으로 확인</p> <p>-항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-LL-37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area의 lymphocyte를 분리하여 항원에 대해 반응하는 세포들의 proliferation을 tritium uptake를 통해 검증한 결과 항 펩타이드는 T cell에 의한 면역반응을 유도함을 확인</p> <p>-Oral priming effect 확인을 위해 systmeic challenge 후 이전 과 동일한 실험을 진행 한 결과 항 펩타이드에 의해 유도되는 면역반응은 경구내성을 유도하지 않으며 높은 oral priming effect를 유도함을 검증</p> <p>-따라서 model 항원과 병원체 항원 모두에서 LL-37 항 펩타이드가 매우 효과적인 점막면역 보조제로 사용 가능함을 검증</p>	<p>추가 연구진행</p>
<p>○ M cell target receptor C5aR를 통한 점막 보조제 개발</p>	<p>-C5aR의 M cell target receptor로써의 기능을 경구 백신 모델에서 검증하기 위해 C5aR knock-out mouse에서 EGFP-OmpH를 이용하여 확인한 결과 OmpH의 점막 보조제 효과는 C5aR를 통한 것임을 검증</p> <p>-OmpH ligand를 병원성 항원에 대한 경구 백신모델에 적용하기 위하여 Dengue virus(DENV)의 EDIII protein의 c-terminal에 OmpH를 갖는 재조합 단백질을 확보</p> <p>-EDIII-OmpH를 이용한 경구 백신모델에서 2주간 2번 경구 투여 후 4주간 serum과 fecal extract의 sample을 확보하여 EDIII 특이적 항체의 양을 ELISA를 통해 분석한 결과 OmpH에 의한 항원 특이적 면역반응의 증진을 검증</p> <p>-EDIII-OmpH를 이용한 경구 백신모델에서 2주간 2번 경구 투여 후 4주에 systemic and mucosal are에서 lymphocyte를 분리하여 항원 특이적 항체 생성 세포의 증가 및 IL-6 cytokine secretory cell의 증가를 검증</p> <p>-Oral priming 효과를 확인을 위해 systemic challenge 후 항원에 대한 면역반응의 특성을 위와 동일하게 확인한 결과 OmpH ligand는 경구내성을 유도하지 않을 뿐 아니라 oral priming 효과도 잘 유도 하는 것을 확인</p> <p>-따라서, LL-37 항 펩타이드와 함께 OmpH의 점막면역보조제로서의 이용 가능성을 확인하였으며, OmpH의 경우 receptor인 C5aR를 통하여 M cell로 항원을 targeting 시킬 수 있음이 확인되었기 때문에 현재 잘 이해하지 못하고 있는 점막면역계 항원 uptake의 기작을 이해할 수 있는 매우 좋은 system을 확보하였음을 의미함</p>	<p>100</p>
<p>&lt;4차년도&gt; ○ 항 펩타이드의 점막 면역 조절 체계 분석을</p>	<p>- 점막면역 세포들은 항 펩타이드 LL-37에 의해 germinal center 형성 및 Ig isotype switching에 중요한 chemokine의 발현을 증진시키는 것을 mRNA 수준에서</p>	<p>100</p>

<p>통한 백신 보조제로서의 특성에 대한 이해 증진</p>	<p>확인을 통해 innate immune response의 활성화를 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여는 점막 면역 유도 조직에서 germinal center의 형성 및 IgA isotype switching을 돕는 것을 확인</li> <li>- Germinal center 형성에서 중요한 역할을 수행하는 follicular dendritic cell(FDC)에서 LL-37의 receptor 중 하나인 FPR-2의 발현을 처음으로 확인</li> <li>- 점막 면역 세포들은 항 펩타이드 LL-37에 의해 IL-6, IL-17A 및 TNF와 같은 inflammatory cytokine들의 분비 촉진을 mRNA 및 단백질 수준에서 발현 검증을 통해 경구 내성이 우세한 환경으로부터 면역 반응 유도 증진 환경으로의 전환을 확인</li> <li>- 특히, 점막 면역 세포들은 항 펩타이드 LL-37에 의해 Th17 세포의 증진을 돕는 것을 확인</li> <li>- 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여는 점막 유도조직의 CD11c<sup>+</sup> 세포에서 IL-6의 분비를 촉진하며 cell modulation을 통한 CD70의 발현 유도 확인을 통해 항 펩타이드 LL-37에 의해 항원 특이적 adaptive immune response의 활성화를 검증</li> </ul>	
<p>○ 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로써 병원성 백신 모델에 적용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-LL37을 2주간 2번 경구투여 후 4주 동안의 serum과 fecal extract의 sample로부터 EGFP specific IgG와 IgA의 level의 증가를 ELISA를 통해 확인</li> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-LL37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area와 mucosal compartment의 lymphocyte를 분리하여 EDIII 특이적 IgG 혹은 IgA를 분비하는 세포의 수의 증가를 ELISPOT을 통해 확인</li> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-LL37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area와 mucosal compartment의 lymphocytes를 분리 후 항원에 대해 반응하는 cytokine을 ELISPOT으로 분석한 결과 항 펩타이드는 Th1/Th17 면역반응을 보다 높게 유도하는 것으로 확인</li> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EDIII-LL37을 2주간 2번 경구투여 후 4주에 systemic area의 lymphocytes를 분리하여 항원에 대해 반응하는 세포들의 proliferation을 tritium uptake를 통해 검증한 결과 항 펩타이드는 T cell mediate 면역반응을 유도함을 확인</li> <li>- Oral priming effect 확인을 위해 systemic challenge 후 이전 과 동일한 실험을 진행 한 결과 항 펩타이드에 의해 유도되는 면역반응은 경구내성을 유도하지 않으며 높은 oral priming effect를 유도함을 검증</li> <li>- 항 펩타이드 LL-37에 의해 증진된 항체는 Dengue 바이러스에 대해 중화 기능을 갖는 항체임을 C6/36 세포에서 microneutralization plaque assay를 통해 검증</li> </ul>	100
<p>○ M cell target receptor검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석을 통해 경구 백신 보조제에 적용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M cell에서 항 펩타이드 LL-37의 receptor 중 하나인 FPR-2의 특이적 발현을 확인하였으며 이 receptor를 통한 신호 체계가 점막의 DC들의 유도와 밀접하게 관련되어 있음을 확인</li> <li>- 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질이 M cell의 FPR-2를 통해 효과적으로 항원을 전달하는 것을 확인하여 항 펩타이드의 점막 보조제의 기능 중 항원 전달기능을</li> </ul>	100



	<p>검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- M cell target receptor중 하나인 C5aR는 병원균 <i>Y. enterocolitica</i>의 감염동안 TLR와 함께 M cell에서 발현되는 것을 확인</li> <li>- 병원균 <i>Y. enterocolitica</i>의 감염은 C5aR 신호 체계에 의해 조절되며 이때 관여하는 cAMP 관련 유전자들에 대한 특성 분석을 진행을 통해 항원 유입과 C5aR의 신호 체계의 연관성을 검증</li> </ul>	
<p>&lt;5차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로써의 기능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증을 위해 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 점막 면역유도조직에서 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal center B cell의 증진을 검증함.</li> <li>- 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증을 위해 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 점막 과 전신 면역계를 연결하는 mesenteric lymph node에서 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal center B cell의 증진을 검증함.</li> <li>- 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증을 위해 peyer's patch에서 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 CD40<sup>+</sup> cell의 증가를 확인함.</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ M cell target receptor검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석을 통해 경구 백신 보조제에 적용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M cell에서 항 펩타이드 LL-37의 receptor중 하나인 FPR-2의 특이적 발현을 확인하였으며 이 receptor를 통한 신호 체계가 점막의 DC들의 유도와 밀접하게 관련되어있음을 확인</li> <li>- 항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 단백질이 M cell의 FPR-2를 통해 효과적으로 항원을 전달하는 것을 확인하여 항 펩타이드의 점막 보조제의 기능 중 항원 전달기능을 검증</li> <li>- M cell target receptor중 하나인 C5aR는 병원균 <i>Y. enterocolitica</i>의 감염동안 TLR와 함께 M cell에서 발현되는 것을 확인</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ M cell target receptor C5aR와 TLR 사이의 상호 신호전달에 의한 병원균 유입기작에 대한 이해 증진</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 병원균 <i>Yersinia enterocolitica</i>가 감염되는 동안 human M-like cell에서 C5aR와 TLR1/2의 clustering을 확인함.</li> <li>- 병원균 <i>Yersinia enterocolitica</i>가 감염되는 동안 human M-like cell에서 C5aR와 TLR4의 clustering을 확인함.</li> </ul>	100

바. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발 (제 2 핵심 제 2세부과제: 고려대학교)

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식물 형질전환용 벡터 시스템 구축 및 형질전환</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 적합한 프로모터와 transit peptide를 이용하여 식물 형질전환용 벡터 제작</li> <li>- 애기장대 형질전환 및 선별</li> <li>- 당근 형질전환 및 선별</li> <li>- 예비실험으로 MBP를 담배에서 발현</li> <li>- MBP 발현 양상을 대장균에서 관찰</li> <li>- MBP 단백질 정제 후 항체 제작 예정</li> <li>- MBP 유전자 벼에 형질전환하여 현재 재분화 중</li> </ul>	100
<p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당근 형질전환체에서 hMBP 단백질 과발현</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 당근 형질전환체에서 단백질 과발현 여부 조사</li> <li>- 당근 형질전환 식물체의 대량 생산</li> <li>- 형질전환 식물체에서 총 단백질 분리</li> </ul>	100

확인 및 총 단백질 분리		
○ 고효율 발현 식물 형질전환용 벡터 시스템 구축 및 형질전환	- 당근의 translational machinery에 맞도록 코돈 최적화 - 단백질의 고생산 벡터 시스템 구축 및 형질전환	100
○ MBP 발현 형질전환 벡터 육성	- 종자특이 promoter인 Prolamin 조절하에 pIPKb-MBP, pIPKb-TS <sub>1</sub> -MBP, pIPKb-TS <sub>2</sub> -MBP, pIPKb-Trx:MBP 발현 형질전환 벡터 육성 및 T1종자 획득 - 형질전환 벡터에서 MBP 발현을 단백질 및 핵산 수준에서 분석	100
○ Chemical inducible promoter (CIP) 개발	- MeOH 등 유기용매에 의해 발현되는 TDC promoter 발현 형질전환 벡터 육성 및 발현 특성 분석	100
<3차년도> ○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	-종자 특이적 cis-element인 RY-repeat과 G-box가 함께 존재하는 promoter를 갖는 유전자 10개 선발 -RT-PCR을 통해 10개의 유전자 중 2개의 유전자, <i>At1g22600</i> , <i>At1g29680</i> 가 종자에서 특이적으로 발현됨을 확인 - <i>At1g29680</i> promoter deletion series를 GUS가 삽입된 pBI101 벡터에 클로닝 -콩 종자에서 <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 일시 발현 시스템 구축 -선발한 10개 유전자의 조직별 발현양상이 TAIR/ATTED DB 분석과 거의 일치함을 확인 -TAIR/ATTED DB의 microarray data결과를 통한 37개의 종자 특이적 발현이 예상되는 novel 유전자 선발	100
<4차년도> ○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	-콩과 옥수수 종자에서 종자 특이적 발현 프로모터의 발현 분석 -새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색 및 선별 -종자 특이적 프로모터의 고등식물 형질전환용 벡터 시스템 개발 및 형질전환 -형질전환체에서 발현 분석	100
<5차년도> ○ 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발	- 종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발 - 외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축	100

사. 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벡터 신제품 개발 (제 2핵심-3 세부과제: 경상대학교)

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
<1차년도> ○ 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 호스트 (세포 및 식물체) 개발 [벼, 애기장대]	- <i>gnt1</i> ( <i>cg</i> ) mutant나 $\beta$ 1,2-xylosyltransferase와 $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase의 knockout 또는 knock-down을 기법을 이용한 immunogenic $\beta$ 1,2-xylose와 $\alpha$ 1,3-fucose가 없는 당단백질 생산 호스트 개발 - Con A-, HRP-, $\alpha$ 1,3-fucose-, $\beta$ 1,2-xylose- 항체를 이용한 호스트의 N-glycan 분석	100
<2차년도> ○ 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축 및 목표 단백질 발현 형질전환체 구축 [벼, 애기장대]	- 2-D와 MALDI-TOF/MS 등을 통해 조직 특이적으로 강하게 발현되는 단백질 유전자를 선별하고 수도 배아, 호분층 및 배아로부터 유래된 배양세포에서 표적 단백질을 고발현시킬 수 있는 <i>ICys-Prx</i> promoter와 terminator를 분리하고 벡터 형질전환체에서 전사조절 특성을 파악하여 특허출원하고 이를 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축에 이용	100

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 애기장대 씨앗에서 높은 전사유도 활성을 가지고 있는 cruciferin 1과 cruciferin 3 유전자의 promoter, signal sequence, terminator를 분리하여 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축에 이용</li> <li>- 당단백질의 glycosylation, 폴딩, 활성화에 필수적인 ER, 골지를 거친 후 단백질 저장 액포(protein storage vacuole, PSV) 등으로 targeting 되거나 세포 밖으로 분비될 수 있는 signal sequence(rice HRP, cruciferin 1, cruciferin 3 signal sequence)를 분리하고 이를 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축에 이용</li> <li>- cellulose binding domains, calcium binding domains, immunoglobulin G (IgG)의 constant (Fc) domain, Myc, HA, FLAG 등의 다양한 affinity tag을 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템에 도입하여 이들의 활용가능성을 확인</li> <li>- 분리된 promoter, terminator, signal sequence, affinity tag 등을 이용하여 당 단백질 고 발현용 이원벡터(binary vector) 시스템 구축</li> <li>- Target 단백질(glucocerebrosidase, EPO, IL-24, protein N-glycosidase A (PNGase A), humanized monoclonal antibody for colon cancer) 유전자 발현 재조합 벡터 구축, 재조합 glucocerebrosidase 발현 벡터를 이용한 Agrobacterium 매개 식물형질전환 및 고 발현 계통확립</li> </ul>	
<p>&lt;3차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ xylose와 fucose가 없는 N-glycan 생산 베타 homo line 및 <i>gnt1</i> cell line 확립</li> <li>○ 당 단백질의 발현량 증가 및 단백질 quality control 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\alpha</math> 1,3-fucosyltransferase I, N-acetylglucosaminyltransferase I (<i>gnt1</i>) 활성이 없는 베타 homo line 분리 및 <i>gnt1</i> homo cell line 확립, <math>\beta</math> 1,2-xylosyltransferase RNAi construct 구축</li> <li>-식물 ER-stress signaling, unfolded protein response (UPR) regulator screening 및 생화학적 분자생물학적 특성규명</li> <li>-이들을 이용한 target 당 단백질 quality control 및 분해 조절 기술 개발</li> </ul>	100
<p>&lt;4차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식물세포 발현 단백질 분리용 affinity tag (vector) 개발 및 단백질 고효율 순수 분리 기술 개발</li> <li>○ Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체와 MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-식물세포 발현 단백질의 고효율 분리를 위한 tandem affinity purification (TAP) tag 의 design, 유전자합성 및 binary vector에 cloning 이를 이용한 식물 생산 단백질의 고효율 순수 분리 기술 개발</li> <li>-개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트의 Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체와 MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석</li> </ul>	100
<p>&lt;5차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 호스트 개발</li> <li>○ 당 단백질의 고 발현용 binary vector 시스템 구축 및 target 당 단백질 발현 형질전환체 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-식물 특이적인 엔-당화 효소가 제거된 돌연변이 교배집단 구축</li> <li>-개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트를 이용한 target 당 단백질 (glucocerebrosidase) 발현</li> <li>-당단백질 발현 및 분리 시스템을 이용한 peptide N-glycosidase A (PNGaseA) 발현</li> </ul>	100

아. 식물세포에서의 단백질 고축적 기법 개발 (제 2핵심-4 세부과제: 포항공과대학교)

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<p>&lt;1-2차년도&gt;</p> <p>○ Translational enhancer의 mutagenesis를 통한 high level translational enhancer 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전체 Arabidopsis genome의 5' UTR의 분석을 통한 grouping과 이들 중에 대표적인 5' UTR에 대한 translational efficiency를 규명함</li> <li>- 5' UTR 35에 대한 triple T substitution mutagenesis를 통하여 UTR의 3' downstream sequence가 critical 하며, 또한 5' UTR의 중간 부위에는 TTT로 substitution한 것이 두 배 정도로 translation 효율이 높아지는 것을 확인함.</li> </ul>	100
<p>○ 고효율 번역인자의 개발을 위한 translational factor들의 기능 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Translational initiation factor들 중에서 eIF4B의 cDNA를 확보함</li> <li>- Overexpression을 통한 translational efficiency를 검증한 결과 eIF4B는 translational efficiency를 500 % 증진시키는 효과를 나타냄</li> <li>- Translational initiation gene eIF1A, eIF2A, eIF3에 T-DNA가 insertion된 homoline을 확보하고 phenotype을 관찰하는 연구를 시작함.</li> </ul>	100
<p>○ 엽록체 targeting의 기작 규명을 통한 엽록체 단백질 고축적 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 엽록체의 외막 단백질의 targeting 기작을 규명하기 위하여 transmembrane domain의 원리를 규명함</li> <li>- AKR2 의 ribosome binding 기작을 규명함</li> <li>- 엽록체의 내부로 이동되는 transit peptide의 기능을 분석하여 Toc159-dependent 와 Toc159-independent pathway를 결정하는 sequence motif를 확인함</li> </ul>	100
<p>○ Mitochondrial targeting의 기작 규명과 이를 이용한 mitochondria 단백질 고축적 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 두 개의 Mitochondrial protein의 presequence를 분석하여 critical sequence motif를 확보함</li> <li>- 두 mitochondrial presequence의 critical sequence motif가 확연히 다름을 확인함</li> <li>- Presequence에 존재하는 arginine residue가 중요하지만 이들이 amphiphathic helix를 만드는 것이 중요하지 않음을 확인함.</li> </ul>	100
<p>&lt;3차년도&gt;</p> <p>○ Translational enhancer의 mutagenesis를 통한 high level translational enhancer 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5' UTR 850에 대한 triple AAA substitution mutagenesis를 통하여 UTR의 3' 위치에 AAA가 들어가는 경우에 poor UTR을 good UTR로 translational efficiency가 증가하는 것을 확인함</li> <li>- 이들 중에서 -3 to -5 position에 AAA로 취환된 mutant가 가장 효율이 좋으며 심지어 35번 UTR보다도 더 높은 효율을 보인다는 것을 확인함.</li> <li>- UTR에 의한 translational efficiency 조절을 규명하기 위해서 good UTR과 poor UTR을 yeast 유전자에 도입하여 이들의 기능이 conserve되어 있음을 확인함</li> </ul>	100
<p>○ 고효율 번역인자의 개발을 위한 translational factor들의 기능 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Translational initiation gene eIF1A에 대한 두 개의 independent mutant line을 확보함</li> <li>- 이들 mutant들의 phenotype을 확인하고 eIF1A가 ABA 및 heat stress more sensitive 하다는 것을 확인함</li> <li>- eIF1A 유전자가 knock-out 되었을 때 단백질이 잘 만들어지지 않은 유전자를 확보하기 위해서 proteomics를 진행하고 있으며 candidate 유전자로 ABA 및 stress 관련 유전자를 일차적으로 동정함</li> </ul>	100
<p>○ 엽록체 targeting의 기작 규명을 통한 엽록체 단백질 고축적 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 엽록체의 외막 단백질의 targeting 기작을 규명하기 위하여 transmembrane domain이 targeting specificity에 관여하는 원리를 규명함. 특히 mitochondrial targeting과 엽록체의</li> </ul>	100

	targeting에 대한 특이성을 부여하는 기작을 규명함	
○ Mitochondrial targeting의 기작 규명과 이를 이용한 mitochondria 단백질 고충적 기술 개발	-F1-ATPase gamma subunit의 presequence에 대한 많은 alanine substitution mutant를 만들고 이들을 이용하여 in vivo targeting을 실시함. -이를 통해서 presequence에 많은 종류의 critical sequence motif가 존재함을 확인하였음. -이들 critical sequence의 역할을 규명하기 위해서 import 과정을 자세히 분석함. -Critical sequence motif가 mitochondrial targeting, outer membrane crossing, inner membrane crossing 등 다양한 step에 관여하고 있는 것들을 classify할 수 있었음.	100
○ PRA 및 PRA interacting protein YIP를 이용한 단백질 trafficking 기작의 규명과 이를 이용한 선택적 단백질 분비 시스템 구축	-PRA1이 trafficking에 미치는 영향을 확인하기 위해서 protoplast에 PRA1의 overexpression한 상태에서 다양한 cargo protein들의 trafficking을 Western으로 확인함 -PRA1 knock-out mutant에서 protoplast를 확보하여 다양한 cargo protein들의 trafficking efficiency를 확인함 -Fructosidase의 trafficking pathway를 규명하기 위해서 protoplast에 GFP fusion 형태로 발현하여 localization을 확인함 -Fructosidase의 다양한 N-terminal region mutant를 만들고 이들의 trafficking efficiency를 확인함	100
<4차년도> ○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발	-다양한 transient expression 시스템에서 Translational enhancer의 활용가능성 확인 - Eukaryotic translation initiation factor 1a(eIF1A)의 기작연구	100
○ Chloroplast targeting 기작 규명	- 애기 장대와 인간 내에 존재하는 엽록체 및 미토콘드리아 SA 단백질의 이동신호서열 비교 - 미토콘드리아 수송 시 3가지 특이 요소들의 역할 검증 - 효모 및 인간 미토콘드리아 SA 단백질을 통한 3가지 특이 요소들의 역할 검증	100
○ Mitochondrial targeting 기작 검증	- 애기장대 미토콘드리아로의 단백질 이동에 필요한 presequence 내 기능적 모티프 규명과 상호 관계 분석	100
○ Protein trafficking 기작의 규명	- AtPRA1.B6의 세포내 단백질 수송의 조절과 pathogen에 대한 저항성- 애기장대 식물의 endocytic adaptor의 발견과 그 기능에 대한 연구 - Glo3p-type ArfGAP들로 매개로한 골지체로의 Arf1-GDP 이동에 관한 연구	100
<5차년도> ○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한	- 고효율 5' -UTR의 정확한 기작은 whole ribosome의 형성에 대한 efficiency가 증가 되는 것이 고효율 발현의 기작임을 밝힘.	100
○ Chloroplast targeting 기작 규명	- transit peptide에 존재하는 여러 개의 proline residue가 protein을 엽록체로 이동할 때 ratchet movement에 필수적인 residue라는 것을 최초로 규명함. - 엽록체와 mitochondria로 targeting되는 specificity를 결정하는 것이 N-terminal 부분에 존재하는 multiple arginine residue라는 것을 확인함	100
○ Mitochondrial targeting 기작 검증	- 막 단백질의 targeting 신호를 분석하여 N-terminal에 존재하는 positive charge와 TMD에 존재하는 tyrosine 이나 tryptophan과 같은 aromatic amino acid가 chloroplast eviding motif로 작용한다는 것을 밝힘	100
○ Trafficking 관련 유전자의 기능 연구	- PRA11이 dehydration stress에 필요한 다양한 단백질의 이동에 핵심적인 역할을 하며 이는 Golgi에 존재하면서 이러한 역할을 한다는 것을 규명함	100

4. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

가. 돼지유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발 (제 1핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

평가의 착안점	자 체 평 가
<1차년도> ○ 식물형질전환을 위한 발현벡터의 제작	-벼의 형질전환을 위한 발현벡터를 CTB-COE와 LTB-COE 융합유전자를 가지고 각각 다른 프로모터를 가지고 있는 발현벡터를 제작하였음
○ 벼의 형질전환	-식물형질전환 벡터를 가지고 형질전환 하기 위하여 bombardment를 이용하여 벼의 캘러스에 형질전환 하였음. 선발된 캘러스로부터 genomic PCR를 수행하여 항원단백질 유전자의 도입을 확인하여 연구 계획보다 진행이 빠름.
<2차년도> ○ 형질전환체 선발	-CTB-COE와 LTB-COE 융합항원유전자를 가지고 벼를 형질전환하여 형질전환체를 선발하였음.
○ 재분화된 형질전환 식물체 확보	-선발된 형질전환체에서 재분화를 유도하여 형질전환 식물체를 확보하였음.
○ 형질전환체에서 유전자의 발현 확인 여부	-선발된 형질전환체에서 genomic DNA PCR과 Northern blot 분석과 western blot 분석을 이용하여 항원유전자의 도입과 발현을 확인하였음.
○ 재분화 벼의 homoline 선발 여부	-재분화된 벼의 homoline을 선발하기 위하여 농진청의 강경호박사팀에서 약배양을 이용하여 선발하고 있음.
<3차년도> ○ 항원단백질 발현 형질전환 식물체 선발 및 확보	-CTB-COE, LTB-COE, COE-Co1 융합항원단백질을 발현하는 형질전환 벼의 종자 확보하였음.
○ 약배양을 이용한 homoline인 계통을 확보하고 고발현 식물체 선발	-약배양을 수행하여 배수체로 보이는 식물체를 확보하고 종자 수확을 하려고 함.
○ 아그로박테리움을 이용한 벼의 형질전환	-아그로박테리움을 이용하여 형질전환을 수행하였고 항원 유전자의 도입, 발현을 확인하였음
○ 형질전환 callus를 이용한 실험동물에서 면역반응 유도	-식물 유래 항원단백질을 이용하여 동물실험을 수행하였고 항원단백질에 대하여 면역반응을 확인하였음.
○ M-cell binding peptide Col과 융합항원단백질 발현 형질전환	-식물발현 벡터 제작 및 형질전환 -선발된 형질전환체에서 항원유전자의 도입과 발현을 확인하였음.
<4차년도> ○ 실험동물에서 효율적인 면역반응 유도의 증진에 대한 조건 확립	-LTB-COE, CTB-COE, COE-Co1 항원단백질 이용하여 동물실험에서 면역반응유도를 재확인하였음 - 항원단백질의 투여량을 늘려 면역반응 유도 증진 확인하였음
○ 약배양을 이용하여 확보된 homozygous 계통과 agrobacterium 방법으로 형질전환한 식물체를 분석하여 event line 후보 작물 선발	-약배양을 이용하여 확보된 homozygous line과 agrobacterium-mediated 형질전환 방법으로 얻은 형질전환 식물체에서 Real Time PCR, Southern blot analysis, flanking T-DNA sequencing 분석하여 event lines을 선발하였음
○ 다른 epitope(S1D) 항원유전자 식물발현벡터 제작 및 식물 형질전환	-S1D, S1D-Col, CTB-S1D, S1D-LL37, S1CD, S1CD-Co1 항원유전자에 대한 식물발현 벡터 제작 및 형질전환을 수행하여 선발된 형질전환체에서 분자생물학적 분석을 이용하여 항원단백질의 발현을 확인하였음.
○ 식물에서 발현된 S1D 항원단백질을 이용한 동물실험	-벼에서 발현된 S1D, S1D-Co1와 S1D-LL37 항원단백질을 경구적인 방법으로 feeding한 동물실험에서 4주째 먹인 결과 항원단백질에 대한 IgG, IgA 항체 유도를 확인하였음.
<5차년도>	- 항원단백질의 발현하는 형질전환 식물체를 목적동물에



○ 항원단백질을 생산하는 형질전환 식물체를 이용한 목적동물에서 면역반응 유도능력 확인.	경구적인 투여로 LTB에 대한 면역반응 유도능력 확인을 함 - 자돈에 대한 passive 면역반응 분석을 위한 공격접종에 대한 방어능력에 대한 가능성을 확인
○ S1CD 항원단백질에 대한 면역반응 유도 능력의 확인을 위한 동물실험	-형질전환 식물체에서 발현된 SID 항원단백질에 대한 면역반응 유도 능력 확인을 하기 위하여 실험동물인 쥐에 경구적인 방법으로 투여 -실험동물에서 항원단백질에 대한 IgG와 IgA 항체 반응을 확인하지 못 하였음.
○ 선발된 항원단백질을 발현하는 event line의 농업형질검사 및 환경 위해성 검사를 수행함.	- Event line인 형질전환 식물체의 종자를 확보하고 농업형질을 확인하기 위하여 경북대학교 부속실험실습장 내의 농촌진흥청 지정 “GMO 벼 특성 평가 포장” 에서 2013년 하계에 수행함. - 성숙기에 최종적으로 불임성이 없이 정상적으로 등숙한 개체를 수확함.

나. 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 신품종 개발 (제 1핵심 2 세부과제: (주)젠닥스)

평가의 착안점	자 체 평 가
<1-2차년도> ○ 재조합단백질 및 항체 확보 유무	대장균에서 50 kDa 크기의 재조합 항원단백질을 발현하고 Ni <sup>2+</sup> -charged resin을 이용하여 단백질을 순수분리하였고 이를 이용하여 높은 (P<0.001) 항체가 갖는 노다바이러스 coat protein Ab를 확보하였음
○ 최적의 chitosan formulation 결정 여부	다양한 용매조건으로 결정화시도하였음
○ 사료첨가되는 식물유래 급이의 함유량 결정	사료에 최대 30%까지 식물사료가 급이 가능함을 확인
○ 벡터제작 유무	경구백신용을 염두에 두어 reporter gene이 제거되고, 색소체내에 도입된 후 이차재조합을 방지할 수 있는 발현벡터제작을 완료함
○ 담배 색소체 형질전환체 개발 여부	Genomic DNA PCR로 T <sub>0</sub> 세대 담배 색소체 노다바이러스 유전자의 도입이 확인되어 형질전환체 개발을 완료함.
○ 우수 색소체 형질전환 라인 확보 여부	형질전환 식물체에서 RT-PCR로 노다바이러스 transcript가 많은 라인을 선발하고 western blot을 통하여 노다바이러스 단백질 발현양이 높은 개체를 지속적으로 선발하고 있음.
○ 담배 핵 형질전환체 개발 여부	노다바이러스 특이적 프라이머와 Agrobacterium 특이적 프라이머를 이용한 genomic DNA PCR 분석으로 Agrobacterium 오염안된 T <sub>0</sub> 세대 담배 핵 형질전환체 개발을 완료함
○ 우수 핵 형질전환 라인 확보 여부	기본 목표인 노다바이러스 색소체 형질전환체 개발 이외에 추가로 핵 형질전환체 개발도 성공하여 당초 목표를 추가달성하였음.
○ 담배 유래 항원단백질의 항원성 검증	노다바이러스 형질전환 담배에서 지속적인 western blot 및 ELISA 분석을 통하여 노다바이러스 항원단백질 고발현 라인을 선발하고 있음.
<3차년도> ○ 담배( <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun) 색소체 형질전환 식물체 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증 여부	-담배 색소체 형질전환체 T1세대의 Genomic DNA PCR, RT-PCR, Western 분석을 하여 세대간 항원유전자가 유지됨을 검증하였으며 매우 높은 항원단백질 발현수준까지 획득함
○ 담배( <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun) 핵형질전환 식물체의 항원단백질 발현	-확보된 담배 핵형질전환체 T <sub>0</sub> 세대를 확보하고, Genomic DNA PCR, RT-PCR, Western 분석을 완료함.

검증 여부	
○ 공격접종을 위한 순수 노다바이러스 배양액 확보 여부	-노다바이러스 배양액을 확보하였음
○ 치어면역 후 항체가 형성확인 여부	-담배유래 항원단백질로 마우스 경구투여 중이며 혈액 내 IgG 농도 및 소장부위의 IgA 농도 측정할 예정임. 치어면역은 봄에 계획함.
○ 니코틴프리 담배( <i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609) 색소체 형질전환 기술 확립(사업단 기반기술) 여부	-니코틴프리 담배 색소체 형질전환을 시도하여 총 13개의 T0 독립라인을 확보함으로써 니코틴프리 담배 색소체 형질전환 기술을 확립하였다고 판단됨.
○ 담배 transient expression system을 이용한 목적단백질 대량생산법 확립(사업단 기반기술)여부	-노다바이러스 항원단백질을 viral expression vector를 이용하여 transient expression 방법으로 발현시키고자 하였으나 vector가 작동하지 않음. Agrobacterim vectors pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP, pTRAc-ERH를 이용하여 transient expression를 하고자 함
<4차년도> ○ 담배 ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun) 유래 항원단백질의 세대간 항원성 유지 검증	-노다바이러스 형질전환 T2, T3, T4, 담배에서 지속적으로 RT-PCR 및 western blot 분석을 통하여 세대간 항원성 유지 확인함
○ 능성어 치어의 면역 반응 여부	-능성어 치어에 담배발현 항원단백질 구강투여 후 항원특이적 면역 반응 분석 완료함
○ 백신의 독성여부 확인	-담배발현 항원단백질 구강투여 후 어체 조직의 병리조직학적 검사를 하여 백신의 독성여부 확인함
○ 상대생존을 조사	-노다바이러스에 노출시킨 후 상대생존을 조사함
○ 담배 색소체 형질전환체 개발 여부	-Genomic DNA PCR로 T <sub>0</sub> 세대 담배 색소체 노다바이러스 유전자의 도입이 확인되어 형질전환체 개발을 완료함.
○ 니코틴프리 담배 ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609) 유래 항원단백질의 세대간 항원성 유지 검증(사업단 기반기술)	-노다바이러스 형질전환 T1세대 담배에서 RT-PCR 및 western blot 분석을 통하여 항원성 유지 확인함
○ Transient expression system 확립 (사업단 기반기술)	-Agrobacterium vector pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP, pTRAc-ERH를 이용하여 노다바이러스 유전자를 삽입하여 최종벡터를 만들어 <i>Nicotiana benthamiana</i> 에 infiltration을 통해 chloroplast target vector인 pTRAc-rbcs1-cTP vector에서 노다바이러스 항원단백질 발현 확인함
○ 단백질 고발현 벡터 시스템 개발(추가 실험)	-pCAMBIA1302 vector의 GFP 유전자 앞부분에 CPMV RNA-2 5' leader (R2L) sequence 도입 후 Western blot을 통해 항원단백질의 발현 level이 증가하는지 여부를 확인 결과 발현이 증가되지 않음을 확인. 보유하고 있는 다른 벡터 (Noda, GFP 유전자가 도입된 벡터) 들에 적용하여 실험 중.
<5차년도> ○ 니코틴프리 담배 ( <i>Nicotiana tabacum</i> cv.MD609)색소체 형질전환 세대간 항원단백질 유전자의 유지 검증	-니코틴프리 담배의 T <sub>1</sub> 종자를 확보하여 유전자 도입, 발현 및 노다바이러스 항원단백질 발현 검증 완료. T <sub>2</sub> 종자 확보를 위해 식물체 생육 중
○ 담배 transient expression system을 이용한 목적단백질 대량생산법 확립	-pTRAc-rbcs1-cTP::Noda vector와 p19을 동시에 적용하여 단백질 발현 발현 증가 검증. 타겟 단백질을 단기간에 최대한 확보하기위한 방법 모색. Vacuum inoculation을 통한 단백질 발현 최적 조건 확립 -pCAMBIA1302 vector에 Noda, signal-Noda gene을 적용하여 단백질 발현을 확인하였으나 발현 되지 않음
○ 형질전환 담배의 품종 보호 출원 및 등록	-한국생명공학연구원 생명자원센터에 종자 기탁 (기탁번호 : KCTC12358BP)

다. 재조합 산업용 효소 신제품 개발 (제 1핵심- 3 세부과제: (주)엔비엠)

평가의 착안점	자 체 평 가
<1차년도> ○ 유전자의 합성 여부	- 당초의 계획에 의거하여 유전자를 합성하여 연구목표를 달성하였음
○ 식물발현백터의 제작 및 형질전환 여부	- 당초의 계획에 의거하여 식물발현백터의 제작 및 형질전환 연구목표를 달성하였음
○ 고생산 세포주의 확립 여부	- 당초의 계획에 의거하여 고생산 세포주의 확립 연구목표를 달성하였음
○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화 여부	- 당초의 계획에 의거하여 TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화 연구목표를 달성하였음
○ TEV endopeptidase 활성 측정을 위한 substrate 단백질 생산	- 식물 유래 TEV endopeptidase의 활성을 측정하기 위한 substrate 단백질을 확보를 위하여 EGFP와 TNF- $\alpha$ 사이에 인식부위를 갖는 유전자 합성 - 대장균 발현백터 및 생산 균주 제작 - 융합단백질 생산 및 분리정제
○ 박테리아 발현 system을 이용한 TEV endopeptidase 단백질 발현	- 향후 연구진행에 positive control으로서 필수적으로 사용 될 고가의 TEV endopeptidase 확보를 위하여 대장균 발현백터 및 생산 균주 제작 - TEV endopeptidase 단백질 생산 및 분리정제 - 상기에서 확보한 substrate 융합단백질을 이용하여 proteolytic activity 확인
○ 벼 현탁세포 대량 배양 시스템 구축	- 참여기업인 (주)엔비엠에 10L 규모의 air-bubble type bioreactor 30대 동시 운용 시설 구축 - 형질전환된 벼 현탁세포의 대량 배양을 위하여 현재 air-bubble type bioreactor (10 L) 운용기술 확립
○ 벼 현탁세포 유래 단백질 당패턴 규명	- 벼 유래 당단백질에 대한 당 패턴확인 완료
<2차년도> ○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체 재분화	- 당초의 목표대로 TEV endopeptidase 고생산 세포주의 식물체의 재분화에 성공하였음 - 총 5 종류의 elite line을 확보하여 당초 목표인 3 종류 elite line확보 연구목표를 달성하였음
○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사	- 당초의 계획에 의거하여 T0 세대에 대한 TEV endopeptidase 고생산 식물체의 농업형질을 조사 하여 연구목표를 달성하였음
○ 식물로부터 생산한 TEV endopeptidase의 활성 확인	- 당초의 계획에 의거하여 TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 생산된 TEV의 활성을 확인하여 연구목표를 달성하였음
○ TEV endopeptidase 고생산 세포주의 현탁세포 확립	- 당초의 계획에 의거하여 TEV endopeptidase 고생산 세포주로부터 현탁세포를 확립하여 연구목표를 달성하였음 - air-bubble type bioreactor (10 L) 운용을 위한 기술을 확립하여 연구목표를 달성하였음

<p>○ TEV endopeptidase 항체개발</p>	<p>- 당초 연구목표는 아니었으나 향후 3차년도 부터는 TEV endopeptidase에 대한 ELISA를 이용한 정량 등에 필수적 필요하다고 판단되어 TEV endopeptidase에 대한 항체 개발을 추가로 실시하여 목표를 달성하였음</p>
<p>○ 벼 현탁세포 유래 단백질 당패턴의 인간화 기술개발</p>	<p>- 당초 연구목표는 아니었으나 1차년도에 벼 현탁세포 유래 단백질에 대한 당패턴을 규명한 결과 식물특이적 당 구조를 보이고 있어 벼 현탁세포 유래 단백질의 사업화를 위하여서는 당패턴의 인간화기술 확립이 절실하여 당패턴의 인간화 기술개발을 추가로 실시하여 목표를 달성하였음</p>
<p>&lt;3차년도&gt; ○ TEV endopeptidase 고생산 벼의 elite line 선발 및 농업형질 조사(2차년도 이후 계속)</p>	<p>-당초의 계획에 의거하여 T1, T2 세대에 대한 TEV endopeptidase 고생산 식물체의 in vitro 특성(callus 형성 및 현탁세포배양, TEV endopeptidase 생산 능력을 확인 하여 목표를 달성하였음</p>
<p>○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주의 cell bank 구축</p>	<p>-TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주를 대상으로 세포 동결보존 체계를 확립하여 당초 연구목표를 달성 하였음 -상기의 세포 동결보존 기술을 활용하여 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 공정구축을 위한 MCB(Master Cell Bank)와 WCB(Working Cell Bank)를 구축 하였음</p>
<p>○ 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 생화학적 특성 분석</p>	<p>-식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 온도, pH에 대한 생화학적 특성을 확인하여 연구목표를 달성하였음</p>
<p>○ 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 대량생산 및 분리정제 체계 확립</p>	<p>-TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주의 대량 배양(10L 규모의 air-bubble type bioreactor)을 위한 최적 조건을 확립하였음 -식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 분리정제 체계를 확립하여 연구목표를 달성하였음(순도 80% 이상) -정제된 식물유래 산업용 효소의 산업화를 이루었음(TEV endopeptidase 약 780만원, Enterokinase 약 680만원 판매) <b>-이는 분자농업 기술을 이용하여 생산한 고부가가치 단백질에 대한 국내 최초의 산업화 사례임</b></p>
<p>○ 벼 현탁세포 유래 당단백질의 인간화</p>	<p>-협약당시의 연구목표는 아니었으나 1단계에 벼 현탁세포 유래 단백질에 대한 당패턴을 규명한 결과 식물특이적 당 구조를 보이고 있어 벼 현탁세포 유래 단백질의 사업화를 위하여서는 당패턴의 인간화기술 확립이 절실하여 당해연도에는 당패턴의 인간화 기술개발을 추가로 실시하여 목표를 달성하였음</p>
<p>&lt;4차년도&gt; ○ 식물유래 TEV endopeptidase 및</p>	<p>- 20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 운용기술을 확립하였음</p>

<p>Enterokinase의 대량생산 공정 확립(20L/회 이상 생산 능력 확보)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20L/회 용량 이상의 air-bubble type bioreactor 10대 이상 동시 운용시설을 구축하였음</li> <li>- 당초 목표인 200L/회 보다 10배 배양규모가 큰 air-bubble type bioreactor를 제작하였으며 현재 시운전 중에 있어 대량생산의 기반을 구축 하였다고 판단 됨(재조합단백질의 생산을 위한 200L/회 air-bubble type bioreactor는 국내 최대 규모로 파악하고 있음)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 90% 이상의 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산을 위한 분리정제 체계 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주의 대량 배양 후 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 분리정제 체계를 확립하여 성공적으로 순도 90% 이상의 단백질을 분리정제 하였음</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고순도(90% 이상) TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 생화학적 특성 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물세포유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 생화학적 특성(온도, pH, 활성 Unit 등)을 성공적으로 확인하여 특화하였음</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분리 정제한 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 저장 및 포장기술 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물유래 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 최적 buffer 개발, 최적 제형개발(동결건조 또는 액상), 고순도 효소별 specific activity확인 및 1 unit을 결정하였으며, 효소활성 확인을 통한 최적 저장조건(저장온도, 저장기간 등)도 확립하였음</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 상표출원</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 상표등록을 위한 상표출원을 완료하였음</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 산업화 달성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국제 박람회와 관련 학회에 제품 홍보을 위한 부스를 설치하고 벼 세포배양 유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 제품홍보를 하였으며, 본 연구를 통해 생산된 제품의 판매를 시작하였음</li> <li>- <b>이는 분자농업 기술을 이용하여 생산한 고부가가치 단백질에 대한 국내 최초의 산업화 사례임</b></li> </ul>
<p>&lt;5차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 벼의 세포주에 대한 식물특허출원</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TEV endopeptidase 고생산 벼의 세포주에 대한 식물특허출원을 완료하였음</li> <li>- Enterokinase 고생산 벼의 세포주에 대한 PCT출원을 완료하였음</li> <li>- 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 상표출원을 완료하였음</li> <li>- Enterokinase 고생산 벼의 세포주에 대한 식물특허출원</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주 제조공정의 scale-up(200L급 이상 바이오 리액터 운용)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 고생산 세포주의 200L/reactor 용량의 air-bubble type bioreactor 운용기술을 확립하였음</li> <li>- 200L급 air-bubble type bioreactor 50대 이상 동시</li> </ul>

	운용시설을 구축하였음
○ TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 고순도(95% 이상) 분리·정제방법 확립	- TEV endopeptidase 및 Enterokinase 생산 세포주의 대량 배양 후 식물유래 TEV endopeptidase 및 Enterokinase의 분리정제 체계를 확립하여 성공적으로 순도 95% 이상의 단백질을 분리정제 하였음 - 식물세포유래 고순도 TEV endopeptidase 및 Enterokinase에 대한 생화학적 특성(온도, pH, 활성 Unit 등)을 성공적으로 확인하여 특화하였음

라. 식물세포배양을 이용한 항체 대량생산 및 기능 분석 (제 1핵심-4 세부과제: 전북대학교)

평가의 착안점	자 체 평 가
<1차년도> ○ Amylase와 protease에 대한 siRNA를 제작 및 식물발현 벡터 제작 여부	-Amylase와 protease의 siRNA에 대한 식물발현벡터 제작 하였음.
○ 항체 생산하는 벼의 callus에 형질전환	-식물발현벡터를 이용하여 식물형질전환 하였고 형질전환 체 선발 중에 있음.
○ 현탁배양에서 항체 고발현 조건 확립	-대체 탄소원과 삼투압 제제를 이용하여 #123의 경우 대체 탄소원에 의한 발현의 증가를 확인함
○ 현탁배양에서 생산된 항체의 phagocytosis 및 실험동물에서 기능 확인	-ProteinG column을 이용하여 식물에서 생산한 항체를 분리하였고 P. gingivalis 균주의 부착 저해 기능을 확인하였음
<2차년도> ○ 식물발현벡터를 이용한 벼의 형질전환체 선발 및 분자생물학적 분석	-Amylase와 cysteine proteinase의 ihpRNA 발현하는 형질전환체를 선발하여 분자생물학적 방법으로 분석하여 amylase와 cysteine proteinase의 감소를 확인하였음.
○ 형질전환체에 도입된 유전자의 기능 확인 및 항체 생산량 증가 확인	-Amylase와 cysteine proteinase 감소된 형질전환체에서 #265 항체단백질에 대해서 2.2 배의 발현 증진을 확인하였음.
○ 치주균의 세포부착 및 침투에 대한 식물유래항체의 억제 효능	-식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 치주균의 세포부착 및 세포내 침투에 대한 억제 효능 invasion assay와 phagocytosis를 이용하여 확인하였음
○ 치주균에 대한 식물유래항체의 opsonizations의 관찰	-식물현탁배양에서 순수분리한 항체단백질의 opsonization에 의한 neutrophil의 치주균의 사멸능의 증가를 bacterial killing assay를 이용하여 확인하였음.
○ Transient expression을 이용한 항체단백질의 발현 증진	-Transient expression을 위한 agroinfiltration 방법을 이용하여 항체단백질을 ER에 targeting한 방법에 의해서 TSP의 0.13% 발현수준을 확인함.
<3 차년도> ○ 항체단백질 고발현 형질전환 세포주 선발 및 대량생산을 위한 조건 확립	-형질전환 세포주에서 항원단백질 고생산 식물 세포주를 선발하기 위하여 식물세포 현탁 배양 확립함 -식물세포 현탁배양에서 amylase, proteinase activity의 감소를 확인함 -항체단백질 발현을 하는 세포주 특허를 위한 출원 준비함 - 항체 단백질의 발현 증진을 확인함
○ 항체단백질 발현 형질전환 식물체 선발	-Rice amylase 1A promoter 조절하에 항체유전자 발현을 위한 식물형질전환을 위한 식물발현벡터 제작 -Agrobacterium-mediated 형질전환 방법을 이용한 벼의 형질전환을 수행함 - 형질전환 종자에서 항체단백질에 대한 낮은 발현율을 확인함 - 벼의 종자에서 강력한 promoter 분석 중



마. 경구백신 효율 증진 방안 및 백신 효능 검정 연구 (제 2핵심- 1 세부과제: 전북대학교)

평가의 착안점	자 체 평 가
<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소장 점막면역계에서 항 펩타이드 처리에 의한 면역반응 특성 분석</li> <li>- 소장 점막면역 조직에서 lymphocyte 분리</li> <li>- 면역세포에 항 펩타이드 처리 후 나타나는 cytokine 발현 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·소장 점막면역계의 immuneinductive site인 Peyer's patch와 immune effector site인 lamina propria에서 lymphocyte를 분리하는 system을 성공적으로 확립하였음</li> <li>·항 펩타이드인 LL-37의 처리 후 점막면역계 세포들이 Th17 특성을 가지는 세포로 분화됨을 qRT-PCR, ELISA, ELISPOT 및 FACS를 통한 cytokine 발현 pattern 분석을 통하여 확인 완료하였음</li> <li>·따라서 당초 계획에서 설정한 목표를 완벽하게 달성하였음</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ M cell model에서 발현하는 단백질 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> M cell model을 이용한 M cell 분화</li> <li>- 분화된 M cell에서의 단백질 발현 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·<i>In vitro</i> M cell model에서 M cell의 분화 marker로 최근에 보고된 GP2의 발현을 확인하여 M cell culture model의 특성을 확인하였음</li> <li>·<i>In vitro</i> M cell model에서 M cell ligand Col1의 receptor로 생각되는 CD88의 발현을 확인 하였으므로 목표를 달성함</li> <li>·또한, proteomics 기법 적용을 통한 M cell 분화 특이적인 단백질 확인을 위한 2-DE 분석을 시행 중이므로 추가적인 target 분자의 확보를 기대하고 있음</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 표지 항원 및 항 펩타이드 확보</li> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 표지항원 발현 벡터 제조</li> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 표지항원 제조합 단백질 발현</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·LL-37을 C-terminal에 가지는 표지단백질 EGFP 융합단백질 합성을 위한 제조합 벡터의 제조를 완료</li> <li>·제조합 벡터를 <i>E. coli</i> 발현 system에 적용하여 제조합 항원단백질을 생산 확인하고, 정제를 완료하였으므로 목표를 완벽하게 달성하였으며, 이 제조합 항원단백질은 면역반응 증진 연구에 사용할 수 있음</li> </ul>
<p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드 LL-37의 처리에 의한 점막 면역 세포의 특성 분석 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·점막 면역 유도 조직으로부터 분리된 면역세포들 중 항 펩타이드 LL-37에 의해 Th17 cell 분화에 깊게 관여하는 CX3CR1과 CD70 발현 세포들의 증가를 확인하였으며, 따라서 항 펩타이드 처리에 의한 면역세포의 반응 특성 분석에 대한 목표를 달성하였음</li> <li>·LL-37에 의해 분화된 세포들은 <i>in vitro</i>에서 Th17 cell의 분화를 유도할 수 있음을 확인하여 항 펩타이드에 의한 면역 세포의 특성 분석 및 기능의 확인을 완료하였으며, 이는 당초 설정된 연구계획보다 빠른 연구의 진행이 이루어졌음을 의미함</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ M cell 특이적인 발현 단백질 기능 분석 여부(계속)</li> <li>- Human M-like cell 및 mouse M</li> </ul>	

<p>cell에서의 C5aR 발현 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i> 항원 유입 과정에서 C5aR의 활성화 확인</li> <li>- C5aR의 M cell target receptor로써 효과적인 면역반응 유도(3차년도 계획)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·<i>In vitro</i>에서 분화 유도된 human M-like cell 및 mouse의 PP의 M cell에서 C5aR의 발현 확인을 통해 연구 목표를 달성</li> <li>·<i>Y. enterocolitica</i>의 M cell 특이적 uptake 동안 C5aR의 발현 및 phosphorylation의 확인을 통해 M cell의 항원 유입 기작에 대한 새로운 내용을 확인하여 연구 계획의 목표를 확실하게 달성</li> <li>·C5aR의 ligand중 하나인 <i>Y. enterocolitica</i>의 OmpH를 이용한 항원의 M cell targeting이 가능함을 확인</li> <li>·Model 항원인 EGFP를 이용한 경구 백신 모델에 이를 적용하였을 때 증진된 oral priming 효과를 확인함으로써 연구 계획보다 빠른 연구의 진행을 보였음</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재조합 항 펩타이드 LL-37의 점막면역 보조 능력 연구</li> <li>- 재조합 항 펩타이드 LL-37의 M cell을 통한 항원 전달 능력 여부</li> <li>- 항 펩타이드를 이용한 면역 증강 효과 유도 여부(3차년도 계획)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·<i>In vitro</i> M-like cell에서 항 펩타이드 LL-37의 receptor P2X7R의 발현 확인을 통해 M cell targeting의 가능성을 제안</li> <li>·항 펩타이드 LL-37을 포함하는 재조합 EGFP 단백질이 <i>in vitro</i>에서 mouse PP의 M cell에 특이적 binding 및 <i>in vivo</i>에서 높은 항원전달 능력을 확인함으로써 예정된 연구 목표를 완벽하게 달성함</li> <li>·재조합 단백질 EGFP를 이용한 경구 백신 모델에서 항 펩타이드 LL-37을 적용 하였을 때 높은 oral priming 효과를 확인함으로써 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로의 가능성을 확인함으로써 연구 계획보다 진행이 빠른 연구의 진행을 보였음</li> </ul>
<p>&lt;3차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드의 점막 면역조절 기작에 대한 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> M-like cell을 이용한 FAE model에서 PPL modulation 특성 분석</li> <li>- <i>In vitro</i> M-like cell에서 항 펩타이드의 발현 검증</li> <li>- 펩타이드 발현 <i>in vivo</i> mouse model을 통한 PP에서의 면역 조절 기작 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·소장의 유도 조직인 PP에서의 M cell이 유도하는 특이적 환경에 대한 면역세포들의 modulation을 연구하기 위해 <i>in vitro</i> FAE model 확립 완료</li> <li>·<i>In vitro</i> FAE model에서 M-like cell로부터 발현되는 항 펩타이드 LL-37을 mRNA 및 protein level에서 검증함으로써 M-like cell로부터 분비되는 물질 검증에 대한 목표를 달성함</li> <li>·<i>In vitro</i> FAE model로부터 modulation된 PPL의 surface marker 및 발현 cytokine 분석을 통해 CD70+CX3CR1+ cell population의 증가 및 IL-17 secretory cell 수의 증가를 확인을 통해 예정된 연구목표를 달성함</li> <li>·항생제를 이용한 장내 세균의 감소를 통한 <i>in vivo</i> mouse model에서 항 펩타이드의 발현을 증가시키기 위한 장내세균의 대사산물이 sodium butyrate의 경구 투여를 통해 M cell 주변의 CX3CR1+ cell의 변화 및 IL-17a secretory cell수의 증가를 확인함으로써 <i>in vivo</i> model을 이용한 항 펩타이드의 점막 면역계 조절에 대한 이해를 위한 4차년도 연구 진행 목표의 일부를 추가로 달성함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항 펩타이드의 점막 보조제로써 기능 및 특성 분석</li> <li>- 모델 항원 EGFP를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 항</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37의 경구 투여 후 확보된 serum 및 splenocyte로부터 EGFP</li> </ul>

<p>펩타이드에 의한 항원 특이적 면역반응 유도 유무</p> <p>- 모델 항원 EGFP를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 항 펩타이드에 의해 유도되는 면역반응의 특성 분석</p> <p>- 병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역반응 유도 유무</p> <p>- 병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 항 펩타이드에 의해 유도되는 면역반응의 특성분석</p>	<p>특이적 IgG level 및 secretory cell 수가 EGFP에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 항원 특이적 전신면역반응이 효율적으로 유도된 것을 확인함</p> <p>·항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 EGFP-LL-37의 경구 투여 후 확보된 fecal extract 및 PPL과 LPL로부터 EGFP 특이적 IgA level 및 secretory cell 수가 EGFP에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 항원 특이적 점막면역이 효율적으로 유도됨을 확인함</p> <p>·특히, total IgA level이 항 펩타이드 LL-37에 의해 높게 증가되는 특성 분석을 통해 면역보조제의 기능인 면역증강효과가 점막 면역계에서 높게 작용하는 것을 확인으로써 항 펩타이드에 의한 전신 및 점막 면역계에서 점막 보조제로써의 기능 검증의 목표를 달성함</p> <p>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 항원성 단백질 EDIII-LL-37의 경구 투여 후 확보된 serum 및 splenocyte로부터 EDIII 특이적 IgG level 및 secretory cell 수가 EDIII에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 항원 특이적 전신면역이 효율적으로 유도된 것을 확인함</p> <p>·항 펩타이드를 포함하는 재조합 항원성 단백질 EDIII-LL-37의 경구 투여 후 확보된 fecal extract 및 PPL과 LPL로부터 EDIII 특이적 IgA level 및 secretory cell수가 EDIII에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 항원 특이적 점막면역이 효율적으로 유도된 것을 확인함</p> <p>·Total IgA level이 항 펩타이드 LL-37에 의해 높게 증가되는 특성 분석을 통해 항 펩타이드의 면역보조제의 기능인 면역증강효과가 항원성 단백질을 이용한 경구백신 모델에서도 점막 면역계에서 효과적인 경구백신 보조제 기능의 검증을 통해 목표를 추가 달성함</p> <p>·항 펩타이드를 통해 유도되는 면역반응에서 항원에 대한 T cell proliferation 및 Th1/Th17 cell들의 수 증가 확인을 통해 항 펩타이드에 의한 면역반응의 특성분석을 확인하는 목표를 달성함</p>
<p>○ M cell target receptor, C5aR를 이용한 점막 면역반응 특성 분석</p> <p>- C5aR knock-out mouse를 이용한 C5aR의 target receptor로써의 기능 검증</p> <p>- 병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 C5aR ligand OmpH에 의한 항원 특이적 면역반응 증진 분석</p> <p>-병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 C5aR ligand OmpH에 의한 면역반응의 특성 분석</p>	<p>·C5aR knock-out mice에 모델 항원 EGFP-OmpH를 이용한 경구 백신 실험 결과 peptide OmpH에 의한 면역반응 증진이 유도되지 않음을 검증함으로써 C5aR의 target receptor로써의 기능을 확인하는 목표를 달성함.</p> <p>·재조합 항원성 단백질 EDIII-OmpH의 경구 투여 후 확보된 serum 및 splenocyte로부터 EDIII 특이적 IgG level 및 secretory cell수가 EDIII에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 항원 특이적 전신면역이 효율적으로 유도된 것을 확인함</p> <p>·재조합 항원성 단백질 EDIII-OmpH의 경구 투여 후 확보된 fecal extract 및 PPL과 LPL로부터 EDIII 특이적 IgA level 및 secretory cell수가 EDIII에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 항원 특이적 점막면역이 효율적으로 유도된 것을 확인함으로써 C5aR의 target receptor로써 병원성 항원단백질을 이용한</p>

<p>&lt;4차년도&gt;  ○ 항 펩타이드의 점막 면역 조절 체계 분석을 통한 백신 보조제로서의 특성에 대한 이해 증진</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질에 의한 점막 면역계에서 선천성 면역 증진 유도 체계 분석 여부</li> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질에 의한 점막 면역계에서 후천성 면역 증진 유도 체계 분석 여부</li> <li>- 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 <i>in vivo</i> 선천성 및 후천성 면역증진 체계 분석 여부</li> </ul>	<p>모델에서 검증을 통해 목표를 달성함</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 점막 유도 조직 면역세포에서 항 펩타이드 LL-37를 포함하는 재조합 단백질에 반응하여 germinal center 형성 및 isotype switching에 관여하는 유전자들의 발현 확인 및 선천성 면역의 활성화에 따라 후천성 면역 유도 활성화에 중요한 역할을 하는 FDC에서의 LL-37의 receptor 중 하나인 FPR-2의 발현 확인을 통해 선천성 면역 증진에 대한 체계분석의 목표를 달성 및 FDC 연구에 대한 새로운 방향을 제시</li> <li>· 점막 유도 조직 면역세포에서 항 펩타이드 LL-37를 포함하는 재조합 단백질에 반응하여, Th17 polarizing cytokines (IL-6, TGF-β)의 mRNA 발현 증진 및 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17 세포의 분화 유도 검증을 통해 후천성 면역 증진 유도 체계 분석의 목표를 달성</li> <li>· 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 germinal center 수의 증가를 확인하였으며, 많은 IgA secretory cell들의 증가를 ELISPOT으로 검증을 통해 <i>in vivo</i> 항 펩타이드에 의한 선천성 면역 증진 체계 분석의 목표를 충분하게 달성</li> <li>· 항 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질 경구 투여에 따른 IL-6 분비가 촉진된 mature 형태의 CD11c<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> DC의 modulation 및 항원의 자극에 따라 증식하는 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17 세포를 확인하여 <i>in vivo</i>에서 항 펩타이드에 의한 후천면역 증진 분석을 목표 이상으로 달성</li> </ul>
<p>○ 항 펩타이드의 경구 백신 보조제로써 병원성 백신 모델에 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역반응 유도 여부</li> <li>- 병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 항 펩타이드에 의한 경구 내성 극복에 대한 검증 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 항 펩타이드를 포함하는 재조합 항원성 단백질 EDIII-LL37의 경구 투여 후 확보된 serum 및 splenocyte로부터 EDIII 특이적 IgG level 및 secretory cell수가 EDIII에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 효율적인 항원 특이적 전신면역 유도 목표를 달성</li> <li>· 항 펩타이드를 포함하는 재조합 항원성 단백질 EDIII-LL37의 경구 투여 후 확보된 fecal extract 및 점막 면역 유도조직 및 실행조직의 면역세포들로부터 EDIII 특이적 IgA level 및 secretory cell수가 EDIII에 의해 유도된 개체에 비해 증가된 것을 확인함으로써 항원 특이적 점막면역이 효율적인 유도 검증의 목표를 달성함</li> <li>· Total IgA level이 항 펩타이드 LL-37에 의해 높게 증가되는 특성 분석을 통해 항 펩타이드의 면역보조제의 기능인 면역증강효과가 항원성 단백질을 이용한 경구백신 모델에서도 점막 면역계에서 효과적인</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>- 병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 전신 및 점막 면역계에서 항 펩타이드에 의해 유도되는 면역반응의 특성분석</li> <li>- 병원성 항원 DENV-EDIII를 이용한 경구 백신 모델에서 항 펩타이드에 의해 증진된 항체가 바이러스에 대한 중화 기능 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 경구백신 보조제 기능의 검증을 통해 목표를 추가 달성</li> <li>· 항 펩타이드를 포함하는 재조합 항원성 단백질 EDIII-LL37의 경구 투여 후 5 주에 재조합 항원을 복강 주사 후 얻은 serum 및 splenocyte에서 항원 특이적 IgG를 분비하는 세포의 수가 증가 하였으며 항원의 자극에 따라 면역세포들이 증식했기 때문에 항 펩타이드의 경구 투여에 따른 경구 내성 극복의 목표를 달성</li> <li>· 항 펩타이드를 통해 유도되는 면역반응에서 항원에 대한 Th1/Th17 cell들의 수 증가 확인을 통해 항 펩타이드에 의한 면역반응의 특성분석을 확인하는 목표를 달성</li> <li>· 항 펩타이드를 통해 증진된 serum의 항체가 Denggi 바이러스 type-2의 C6/36로의 감염을 감소시키는 것을 micro-neutralization을 이용해 확인 하여 효율적인 중화기능을 갖는 항체 형성을 검증함으로써 목표를 효과적으로 달성</li> </ul>
<p>○ M cell target receptor검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석을 통해 경구 백신 보조제에 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드 LL-37에 의한 receptor가 M cell apical에서 발현 확인 및 면역 유도 세포들과의 연관성 검증</li> <li>- M cell target receptor C5aR 와 병원균 <i>Y. enterocolitica</i>의 감염이 C5aR 신호전달에 의해 조절 여부를 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 항 펩타이드 LL-37의 receptor 중 하나인 FPR-2가 M cell 특이적으로 발현함을 CLSM을 통해 확인했으며 FPR-2의 발현은 CD11c<sup>+</sup> 혹은 CX3CR1<sup>+</sup> DC와 긴밀하게 연결되어 있음을 확인을 통해 면역 유도 기작과의 연관성을 검증하여 목표를 달성</li> <li>· <i>In vitro</i> M cell targeting을 통해 LL-37을 포함하는 재조합 단백질이 M cell의 FPR-2와 결합하는 것을 확인하였으며, <i>in vivo</i> M cell targeting을 통해 LL-37을 포함하는 재조합 단백질이 효과적으로 전달되는 것을 검증하여 FPR-2의 M cell targeting 기능 또한 확인 되어 목표 이상을 달성</li> <li>· <i>Y. enterocolitica</i>의 감염동안 M cell에서 C5aR와 TLR의 발현을 확인하였을 뿐 아니라, C5a, LPS, <i>Y. enterocolitica</i>에 의해 조절되는 cAMP 유전자들에 대한 profile 확보를 통해 C5aR와 TLR 신호 전달 체계가 <i>Y. enterocolitica</i> 감염 기작과 밀접하게 연결되어 있음을 확인하여 목표를 달성</li> <li>· C5aR antagonist를 통해 <i>Y. enterocolitica</i>의 감염후 생존률의 감소를 확인함에 따라 C5aR 신호 전달의 중요성을 검증하여 목표 이상을 달성</li> </ul>
<p>&lt;5차년도&gt;</p> <p>○ 항 펩타이드의 점막 면역 조절 체계 분석을 통한 백신 보조제로서의 특성에 대한 이해 증진</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항 펩타이드의 점막 면역세포들에서 작용 기작에 대해 검증하여 점막 면역 보조로써의 기능을 검증함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증</li> </ul>

	<p>을 위해 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따른 점막 면역 유도조직 및 mesenteric lymph node에서 B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> germinal center B cell의 증진 검증을 통해 항 펩타이드에 면역 반응 증진 기작을 검증하여 목표를 달성함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>항 펩타이드에 의한 항원 특이적 면역 반응 증진 검증을 위해 항 펩타이드를 포함한 재조합 단백질의 경구 투여에 따라 CD11c<sup>+</sup>선천성 면역 세포들의 maturation 결과를 CD40와 CD70의 발현 증가 확인을 통해 검증하여 목표를 달성함.</li> </ul>
<p>○ M cell target receptor 검증 및 항원 유입에 대한 신호전달 체계 분석을 통해 경구 백신 보조제에 적용</p> <p>-M cell에서 항 펩타이드의 작용 receptor 발현 및 기능 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>M cell에서 항 펩타이드 LL-37의 receptor formyl peptide receptor-2의 특이적 발현 및 항원 전달의 기능을 돕는 것의 확인을 검증하여 목표를 달성함</li> <li>M cell에서 항 펩타이드 LL-37에 의한 receptor formyl peptide receptor-2의 활성화는 점막 면역 유도 조직의 선천성 면역계를 자극하여 APC들의 recruitment 및 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있는 환경을 구성함을 확인하여 목표 이상을 달성함.</li> </ul>
<p>○ M cell target receptor C5aR와 TLR 사이의 상호 신호전달에 의한 병원균 유입 기작에 대한 이해 증진</p> <p>- 병원균 <i>Yersinia enterocolitica</i>의 M cell로의 감염 기작에서 C5aR와 TLR의 역할에 대한 이해로 점막 내 항원 및 병원균 유입기작에 대한 이해 증진.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>병원균 <i>Yersinia enterocolitica</i>가 human M-like cell에 감염되는 동안 M cell에서 C5aR 및 TLR의 clustering을 확인하였으며, 이들 신호 기작에 따른 cAMP의 증가 관련 단백질들의 조절의 관찰을 통해 목표를 달성함.</li> </ul>

바. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발 (제 2 핵심 제 2세부과제: 고려대학교)

평가의 착안점	자 체 평 가
<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>특이 프로모터와 염기서열을 이용한 MBP 유전자 발현을 위한 적정 발현시스템 구축 여부</li> <li>벼와 당근에 형질전환 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>hMBP 단백질의 사용 목적에 적합한 벡터를 제작하였음.</li> <li>식물체 형질전환과 선별 과정이 순조롭게 진행 중임.</li> </ul>
<p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>당근 형질전환체에서 hMBP 단백질 과발현 확인 및 총 단백질 분리 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>MBP 단백질의 발현 유무를 분석하였으며, 선별된 당근 형질전환체는 기내배양을 통하여 대량생산하고 온실에서 순화하여 종자를 확보하였다.</li> <li>당근 형질전환체로부터 최적의 단백질 추출 조건을 탐색하였다.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>MBP 유전자 고발현을 위한 적정 발현시스템 구축 및 형질전환 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>당근의 translational machinery에 맞도록 코돈을 최적화한 MBP 유전자를 이용하여 단백질 고생산 벡터 시스템을 구축하였으며 당근에 형질전환 과정이 순조롭게 진행 중이다.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>MBP 유전자를 도입한 형질전환 벼의 육성 및 종자에서 MBP 발현의 분석 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>다양한 구조의 targeting를 이용한 MBP 발현 형질전환 벼를 육성하였고, 이들로부터 T1 종자를 확보하였고, MBP 발현 유무를 분석하였다.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>유기용매에 의해 유도되는 유전자인 TDC 유전자의 promoter 확보와 이들의 형질전환 벼의 육성 및 발현 특성 분석 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>chemical inducible promoter를 획득하기 위한 TDC promoter 발현 형질전환 벼도 육성하여 분석 중이다.</li> </ul>



<p>&lt;3차년도&gt; ○종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발</p>	<p>-종자 특이적 cis-element 탐색을 통해 2개 유전자의 promoter 확보 -TAIR/ATTED DB를 활용하여 37개의 종자특이 발현이 예상되는 유전자 선발 및 promoter 분석</p>
<p>○외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축</p>	<p>-콩 종자에서 <i>Agrobacterium</i>을 이용한 일시 발현 시스템 구축</p>
<p>&lt;4차년도&gt; ○ 콩과 옥수수 종자에서 종자 특이적 발현 프로모터의 발현 분석</p>	<p>- 콩과 옥수수 종자를 이용해 seed-specific cis-element를 포함한 promoter의 transient expression 분석이 잘 진행되었음</p>
<p>○ 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색 및 선별</p>	<p>- Microarray data와 RT-PCR 분석을 통한 새로운 종자 및 뿌리 특이적 프로모터의 대량 탐색을 완료하였음 - 탐색된 프로모터 중 기존에 알려지지 않은 종자 특이적 프로모터를 선별이 가능하였음</p>
<p>○ 종자 특이적 프로모터의 고등식물 형질전환용 벡터 시스템 개발 및 형질전환</p>	<p>- 13개의 프로모터를 우선 선발하여 GUS 유전자를 포함하는 binary 벡터에 클로닝하였음 - <i>Agrobacterium</i> GV3101에 벡터를 형질전환 하였음</p>
<p>○ 형질전환체에서 발현 분석</p>	<p>- 꽃 침지 방법을 이용하여 애기장대에 형질전환 후 항생제 배지에서 선발하였음 - 형질전환체에서 조직별, 특히 종자 내 발현 양상 분석 수행으로 프로모터 개발이 가능하였음</p>
<p>&lt;5차년도&gt; ○ 종자 및 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발</p>	<p>- 종자 특이 프로모터를 4차년도에 3건, 5차년도에 3건의 특허출원을 완료하였음. - 이 중에서 2건의 특허를 등록하였음. - Microarray data와 RT-PCR분석을 통한 새로운 뿌리 특이 프로모터의 대량 탐색을 완료하였음.</p>
<p>○ 외래 유전자의 고효율 발현 벡터 시스템 구축</p>	<p>- 탐색된 프로모터 중 기존에 알려지지 않은 뿌리 특이적 프로모터를 선별이 가능하였음 - 3개의 뿌리 특이적 프로모터를 우선 선발하여 GUS 유전자를 포함하는 binary 벡터에 클로닝하였음 - <i>Agrobacterium</i> GV3101에 벡터를 형질전환 하였음 - 꽃 침지 방법을 이용하여 애기장대에 형질전환 후 항생제 배지에서 선발하였음 - 형질전환체에서 식물체 발현 양상 분석 수행으로 프로모터 개발이 가능하였음</p>

사. 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 신품종 개발 (제 2핵심-3 세부과제: 경상대학교)

평가의 착안점	자 체 평 가
<p>&lt;1차년도&gt; ○ 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물 확보 및 개발 [벼, 애기장대] ○ 식물 특이적 면역원성이 제거된 당 단백질 생산 식물체의 N-glycan 분석</p>	<p>- 벼에서 5개 애기장대에서 18개의 N-glycosylation 관련 돌연변이체를 분리하였고 이들 돌연변이체를 교배하여 맞춤형 당쇄생산 식물을 개발 중이므로 목표를 초과 달성한 것으로 사료됨 - 벼와 애기장대 <i>gnt1 (cgl)</i> mutant에서 <math>\beta</math>1,2-xylose와 <math>\alpha</math>1,3-fucose가 붙지 않는 것을 항원항체 반응과 MALDI-TOF/MS 등을 통해 확인하였고, 다른 돌연변이체들도 Con A-, HRP-, <math>\alpha</math>1,3-fucose-, <math>\beta</math>1,2-xylose-항체를 이용한 항원항체 반응과 MALDI-TOF/MS로 이들의 N-glycan pattern을 분석하였으므로 목표를 초과 달성한 것으로 사료됨</p>
<p>&lt;2차년도&gt; ○ 당 단백질의 고 발현용 binary vector 시</p>	<p>- 다양한 promoter, terminator, signal sequence, affinity tag 등을 이용하여 당 단백질 고 발현용 이원벡터</p>

<p>스텝 구축</p> <p>○ target 당 단백질 (glucocerebrosidase, EPO, IL-24) 발현 형질전환체 구축 [벼, 애기장대]</p>	<p>(binary vector) 시스템 구축하고 이들을 목표 단백질 발현용 vector로 활용하고 있으므로 계획한 목표를 달성한 것으로 사료됨</p> <p>- 계획했던 목표 단백질(glucocerebrosidase, EPO, IL-24) 외에 protein N-glycosidase A(PNGase A), humanized monoclonal antibody for colon cancer 유전자 발현 재조합 벡터를 구축하였고 이들 중 glucocerebrosidase 발현 벡터를 포함한 일부는 Agrobacterium을 매개로 하여 식물형질전환을 완료하였으며 고 발현 계통을 확립하였으므로 목표를 초과 달성한 것으로 사료됨</p>
<p>&lt;3차년도&gt;</p> <p>○ <math>\alpha</math> 1,3-fucosyltransferase I, N-acetylglucosaminyltransferase I 유전자 knockout 돌연변이체 homo lines (<i>fuct1</i>, <i>gnt1</i>) 및 <i>gnt1</i> cell line 확립 여부</p>	<p>- <math>\alpha</math> 1,3-fucosyltransferase I, N-acetylglucosaminyltransferase I (<i>gnt1</i>) 활성이 없는 벼 homo lines (<i>fuct1</i>, <i>gnt1</i>)을 분리하였고 <i>gnt1</i> homo cell line 확립하였으며 현재로서는 돌연변이 집단에서 knockout 돌연변이체를 구할 수 없는 <math>\beta</math> 1,2-xylosyltransferase의 RNAi construct를 구축하여 특허출원을 준비 중에 있으므로 목표를 달성한 것으로 사료됨</p>
<p>○ 단백질 폴딩 조절 인자 확보 및 특성 규명 여부</p>	<p>- 식물체에 존재하는 주요 당단백질 폴딩 조절 인자를 코딩하는 유전자(<i>Irel</i>, <i>c-Jun-like</i>, <i>ALG3</i>, <i>OS9</i>, <i>bZIP17</i>, <i>bZIP28</i>, <i>p58<sup>IPK</sup></i>, <i>SIP</i>, <i>S2P</i>, <i>GCN2</i>, <i>Wee1</i>, <i>eIF2<math>\alpha</math></i>)와 그 돌연변이체를 분리하였고 과발현 형질전환체를 제작하여 이들의 생화학적 분자생물학적 특성을 규명(5개 이상)하였으므로 목표를 달성한 것으로 사료됨</p> <p>- 당 단백질 분해 표현형을 나타내는 돌연변이체(1개 이상: <i>alg3</i>, <i>os9</i>)를 <i>bril-5</i>, <i>bril-9</i>와 교배하여 이들이 당단백질 분해를 촉진시키거나 억제하는 것을 밝힘으로써 이들을 이용하여 당단백질 분해를 조절하는 기술을 개발할 수 있는 가능성을 제시하였으므로 목표를 달성한 것으로 사료됨</p>
<p>&lt;4차년도&gt;</p> <p>○ 효율적인 tandem affinity purification (TAP) tag 개발여부 (1건)</p>	<p>- 본 연구팀은 지난 4년간 각종 affinity tag을 사용한 여러 차례의 시행착오를 거쳐 최종적으로 식물체에서 발현된 단백질을 효율적으로 분리할 수 있는 tandem affinity purification (TAP) tag을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 TAP-tag는 약 20 kDa으로 2개의 protein A minimal domain, TEV protease cleavage site, streptavidin-binding peptide (SBP) 그리고 enterokinase cleavage site를 가지도록 디자인 되었고 IgG 및 anti-SBP-tag 항체와 강하게 결합하는 것을 immunoblot 분석을 통하여 확인하였다. 개발된 TAP-tag의 특성에 관한 추가적인 분석이 요구되나 장기간의 시행착오를 통해 효율적인 단백질 분리용 TAP-tag이 개발되었고 계획한 목표를 달성한 것으로 사료됨</p>
<p>○ 개발된 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트의 Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체와 MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석 여부 (2건)</p>	<p>- 본 세부과제에서는 지난 4년간 식물 특이적 <math>\alpha</math> 1,3-fucose, <math>\beta</math> 1,2-xylose, <math>\beta</math> 1,3-galactose, <math>\alpha</math> 1,4-fucose 당이 없는 N-glycan을 생산하는 애기장대 quintuple mutant (<i>fuct1/fuct2/xyll/galt/fuct3</i>), 식물 특이적 <math>\alpha</math> 1,3-fucose 가 없는 N-glycan을 생산하는 벼 (<i><math>\alpha</math>1,3-fuct</i>), 그리고 항원성 알레르기 반응을 유도하지 않는 고-만노스형 N-glycan을 특이적으로 포함하는 당단백질을 생산할 수 있는 벼 (<i>gnt1</i>) (Plant</p>

	<p>J. 2012, 식물특허 출원) 등을 구축하였다. 특히 본 연구에서는 이들 인간화 N-glycan을 가진 당단백질 생산 식물 호스트에서 생산되는 단백질로부터 N-glycan을 분리하여 Con A-, HRP-, <math>\alpha</math> 1,3-fucose-, <math>\beta</math> 1,2-xylose- 항체와 MALDI-TOF/MS, HPLC 등을 이용한 N-glycan 분석을 완료함으로써 이들 식물 호스트가 유전학으로는 물론 생화학적으로도 식물 특이적인 당을 포함하지 않는 N-glycan을 가진 당단백질을 생산함을 증명하였으므로 계획한 목표를 달성한 것으로 사료됨</p>
<p>&lt;5 차년도&gt;          ◦식물 특이적인 엔-당화 효소가 제거된 돌연변이 교배집단 구축(20 건 이상)</p>	<p>-본 연구팀은 지난 5년간 식물 특이적인 엔-당화 효소인 Beta1,2-xylosyltransferase (XylT), Alpha1,3-fucosyltransferaseI (FucTa), Alpha1,3-fucosyltransferaseII (FucTb), Alpha1,4-fucosyltransferase (FucTc), Beta1,3-galactosyltransferase (GalT) 그리고 맞춤형 엔-당화를 위하여 그 활성이 제거되어야 할 효소인 Beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), Beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II (GnTII), N-acetylglucosaminidaseI (Hexo1), N-acetylglucosaminidaseIII (Hexo3)등의 돌연변이체를 분양받아서 이들 돌연변이 유전자의 동형접합체를 분리하고 다시 이들을 교배하여 식물 특이적인 엔-당화 효소가 제거된 돌연변이 교배집단 (20 건 이상)을 구축하였다. 현재까지 보고된 최상의 돌연변이체는 오스트리아 Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie (IAGZ)의 Richard Strasser 박사팀이 개발한 3개의 식물 특이적 유전자가 제거된 3중 돌연변이체 (<i>fucta fuctb xylt</i>)이다. 이에 비해 본 연구에서는 지금까지 6중 돌연변이체 (<i>fucta fuctb xylt fuctc galt hexo1</i>)를 완성하였고 현재 식물 특이적 유전자가 완전히 제거된 7중 돌연변이체(<i>fucta fuctb xylt fuctc galt hexo1 hexo3</i>)의 완성을 1세대 만 남겨두고 있는 상태이다. 본 연구에서 개발된 식물체는 앞으로 바이오의약품을 생산하는 원천 재료는 매우 유용하게 사용될 것으로 전망된다. 이러한 결과는 인간화 호스트를 개발하는 본 연구팀의 기술이 세계 최고 수준에 이르렀다는 것을 증명하여 준다.</p>

아. 식물세포에서의 단백질 고축적 기법 개발 (제 2핵심-4 세부과제: 포항공과대학교)

평가의 착안점	자 체 평 가
<p>&lt;1-2차년도&gt;          ◦Enhancer sequence의 기능 개량</p>	<p>5' UTR의 기능과 sequence motif의 확인 및 mutagenesis를 통한 higher efficiency sequence를 확인함으로써 우수한 연구 결과를 도출하였음</p>
<p>◦Translational initiator cDNA의 overexpression effect의 효능 검증</p>	<p>Translational iniation factor 중에서 overexpression하였을 때 translational efficiency를 높일 수 있다는 가능성을 확보하였으므로 우수한 연구 결과를 도출하였다 할 것임</p>
<p>◦엽록체 targeting 기작 규명</p>	<p>엽록체 단백질 중에서 membrane protein의 targeting sequence 원리를 밝혔으므로 대단히 우수한 연구 결과를 획득하였다 할 수 있음</p>

○ Mitochondrial targeting 기작 규명	식물체에서 최초로 presequence의 critical sequence motif를 확보하였으며 이들이 presequence의 종류에 따라서 다르다는 것을 확인한 중요한 연구결과를 확보함
<3차년도> ○ Enhancer sequence의 기능 개량	-Poor 5' UTR을 excellent한 5' UTR로 바꿀 수 있는 기술을 확보함. 따라서 translational efficiency를 쉽게 높일 수 있는 기술을 확보하였으므로 우수한 연구 결과를 도출하였음
○ Translational initiator cDNA의 overexpression effect의 효능 검증	-Translational initiation에 중요한 eIF1A의 기능을 mutant들 통해서 확인할 수 있는 기틀을 마련하였고 이를 overexpression하여 특정 유전자의 번역효율을 높일 수 있는 단초를 마련하였음
○ 엽록체 targeting 기작 규명	-엽록체의 외막 단백질의 targeting 기작과 mitochondrial targeting의 specificity를 조절할 수 있는 기작을 규명할 수 있는 기반을 확보하였다.
○ Mitochondrial targeting 기작 규명	-식물체에서 최초로 presequence의 critical sequence motif를 확보하였으며 이들이 presequence의 종류에 따라서 다르다는 것을 확인한 중요한 연구결과를 확보함
○ PRA 및 YIP를 이용한 단백질 trafficking 기작의 규명과 이를 이용한 선택적 단백질 분비 시스템 구축	-PRA1이 ER에서의 trafficking regulator임을 확인하였으며 또한 Fructosidase의 N-terminal region에 다양한 vacuolar trafficking을 위한 sequence motif가 존재함을 확인함
<4차년도> ○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발	- 5' UTR들의 중에서 good UTR의 기능이 다양한 식물에서 conserve 되어 있다는 것을 담배에 infiltration 실험과 애기 장대의 in vitro translation extract에서의 실험을 통해서 검증 하였다. 이에 대해서 논문을 준비 중이며 특허를 출원 중에 있다. 따라서 우수한 연구 결과를 얻었다 할 수 있을 것이다.
○ Chloroplast targeting 기작 규명	-이번 연구에서는 엽록체와 mitochondria 사이의 targeting sequence information을 규명하고자 하였다. 현재까지는 엽록체와 mitochondria targeting sequence를 구별짓는 방법이 존재하지 않았지만 본 연구에서 mitochondrial targeting을 위해서는 N-terminal positively charged amino acid, transmembrane domain에의 aromatic amino acid residue, 그리고 C-terminal flanking region에서의 positively charged multiple amino acid residue 가 필요하며, 엽록체로의 이동에는 C-terminal flanking region에의 multiple positive charged residue 만 필요하다는 것을 증명하였다.
○ Mitochondrial targeting 기작 검증	-F1-ATPase의 gamma subunit의 분석을 통해서 얻어진 sequence motif에 대한 일반화를 위해서 다양한 다른 presequence의 서열을 computation approach를 통해서 분석한 결과 다수의 단백질에서 gamma presequence에 존재하는 것과 동일하거나 비슷한 sequence motif가 존재함을 확인하였다. 이를 통해서 전체적으로 conserve 되어 있지는 않지만 일부 유사한 sequence motif를 갖는 presequence가 존재함을 확인하였다. 이를 통해서 우수한 논문을 발표하였다. 따라서 우수한 연구 업적을 내었다고 할 수 있겠다.
○ Protein trafficking 기작의 규명	-AtPRA1, AtECA1, Glo3p-type의 ArfGAP 등 다양한 trafficking 관련 유전자의 기능을 규명하고 논문을 발표하였다. 따라서 우수한 연구 업적을 내었다고

	<p>사료됨.</p> <p>-Good 5'-UTR과 poor 5'-UTR의 기작을 규명하기 위해서 in vitro에서 ribosome의 assembly 과정을 규명하였다. 특히 small ribosomal subunit이 recruit된 후 60S large subunit이 recruit되어 whole complex가 형성되어야 하는데 이 과정에서 good 5'-UTR이 poor 5'-UTR에 비해서 아주 효율적으로 whole complex의 형성을 유도한다는 것을 확립하였음. 아주 novel한 연구 결과라 사료됨.</p> <p>- eIF1A의 기능을 연구하여 이 단백질이 stress, 특히 ABA-mediated response에 민감하다는 것을 확인함.</p> <p>-5' UTR의 translational efficiency가 AUG codon의 바로 앞 서열에 의해서 크게 결정된다는 것을 NAR에 발표함.</p>
<p>&lt;5차년도&gt;</p> <p>○ Translation factor의 단백질 고발현을 위한 적용 기술 개발</p>	
<p>○ Chloroplast targeting 기작 규명</p>	<p>- 엽록체로 targeting 하는데 필수적인 transit peptide의 역할에 대해서 많이 알려져 있지만 이것이 어떻게 실제로 channel을 통과하게 해주는지는 아직 불명확했다. 본 연구에서는 transit peptide에 존재하는 proline residue가 ratchet activity에 필수적이라는 것을 밝혔으며. 현재 plant cell에 투고하여 revision 중임.</p>
<p>○ Mitochondrial targeting 기작 검증</p>	<p>-Mitochondrial targeting 기작을 규명하기 위해서 다양한 membrane protein들의 targeting 기작을 규명한 결과 이들은 엽록체와 비슷하게 CPR motif를 가짐과 동시에 N-terminal에 positive charged residue 하나를 필요로 하며, 또한 TMD 내에 적어도 하나의 aromatic residue를 필요로 하여 이들이 chloroplast evading 역할을 한다는 것을 확인함. 이러한 연구 결과는 지금까지 어떻게 엽록체와 미토콘드리아의 targeting specificity가 결정되는지에 대한 해답을 제시해 주는 아주 novel한 결과라 사료됨</p>
<p>○ Trafficking 관련 유전자의 기능 연구</p>	<p>-식물(애기장대)에는 19개의 PRA isoform이 존재하는데 이들의 각 단백질의 기능을 규명하기 위해서 pral1의 knock-out과 overexpression line을 구축하여 연구한 결과 PRA11은 golgi에 존재하면서 vacuolar trafficking에 아주 중요한 역할을 한다는 것을 규명함. 특히 vacuole로 이동하는 단백질들이 제대로 이동하지 못함으로 인해서 식물이 dehydration 및 KCl stress에 제대로 적용하지 못하는 표현형을 나타내었으며 vacuole의 pH를 유지하지 못하는 것을 통해서 이 단백질이 protein의 vacuole의 trafficking에 아주 중요한 factor임을 증명함.</p> <p>- ECA1의 기능을 규명하고자 하였음. ECA1이 cell plate의 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 규명하고 Plant Physiol에 논문 발표함.</p>

## 제 2 절 관련 분야에의 기여도

### 1. 돼지 유행성 설사병 예방을 위한 벼 신품종 개발

돼지 유행성 설사병에 대한 항원단백질을 발현하는 식물체를 도출하고 항원단백질의 발현을 확인하였고 항원단백질을 발현하는 식물체를 이용하여 실험동물에서 항원단백질에 대한 면역반응 유도를 확인하였고 목적동물인 돼지에서 새끼에 대한 PEDV 공격접종을 수행하여 passive immunization에 대한 가능성을 확인하였다. 이러한 결과는 앞으로 이루어질 식물경구백신 개발에 대한 다양한 기초 자료를 제공할 수 있을 것이다. 항원단백질을 발현하는 형질 전환 식물체를 이용하여 야외에서 재배한 결과 형질전환 식물체에 대해서 불임성이 없고 정상적으로 등숙한 개체를 얻음으로서 농업형질에 이상이 없음을 확인하여 형질전환 식물체를 이용하는 벼 품종 개발에 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

### 2. 능성어류 노다바이러스 예방 백신용 담배 신품종 개발

노다바이러스 rCoat protein의 항체는 재조합 항원 투여 후 혈청으로부터 생산하였으며, 단일클론항체 생산 또한 성공하였다. 이렇게 생산된 항체는 발현된 재조합 단백질의 분석 및 향후 급이실험을 통해 생산된 항체를 분석하는데 사용하게 된다. 항체생산 기술은 백신개발에 있어서 반드시 필요한 기술이며, 질병 진단 및 다양한 생명공학 사업에 적용 할 수 있는 기술이다. 어류 경구용 백신의 효능을 증대시키기 위해 점막면역효과가 기대되는 키토산의 formulation을 시도하였다. 그 결과 키토산을 adjuvant로 사용한 경우 실험동물 (쥐)에서의 IgG, IgA가 증가되는 것을 확인하였다. 이는 키토산과 재조합 단백질을 동시에 급이하었을 경우 백신의 효능을 증대 시킬 수 있다는 것이다. 이와같은 결과는 키토산을 첨가한 EP, MP 사료의 개발이 가능하며, 백신효능을 가진 사료의 개발이 가능하다는 것을 의미한다. 형질전환 담배로부터 생산된 노다바이러스 항원단백질을 공격접종을 통해 바이러스에 감염된 능성어에 급이하여 항체 형성 여부를 확인하였다. 그 결과 능성어에서 항체가 형성되는 것을 확인하였으며, 식물유래의 재조합 항원의 백신 효능이 입증되었다. 이와같은 결과는 식물유래의 재조합 단백질이 백신으로서의 가능성이 있다는 것을 의미한다. 본 연구를 통해 검증된 식물유래의 어류 바이러스 백신의 효능 입증은 다양한 바이러스성 백신 개발 및 식물유래의 고부가가치 물질 생산을 위한 기초 자료로 이용 될 수 있다.

### 3. 재조합 산업용 효소 신품종 벼 개발

(주)엔비엠이 보유하고 있는 벼세포배양을 이용한 외래단백질 대량생산 기술은 다양한 단백질의 생산에 적용이 가능하다. 식물에서 생산한 단백질은 대장균과 동물세포에서 생산한 단백질과 비교하여 안전성이 우수하여 줄기세포배양 등에 탁월한 효과가 있어 줄기세포 관련 산업의 발전에 기여할 것으로 판단한다. 식물세포유래 성장인자 등은 최근 기능성 화장품의 원료로 각광을 받고 있는바 식물유래 단백질의 우수성으로 기존의 대장균과 동물세포에서 생산한 성장인자를 대체할 수 있을 것으로 판단 된다. 벼 현탁세포 유래 재조합 Enterokinase의 수요가 증가하는 시점과 전 세계적으로 식물유래 재조합 Enterokinase 생산기업이 당사 1곳 뿐 인 제반 여건 등을 고려 할 때 벼 현탁세포 유래 재조합 Enterokinase의 고순도 분리정제를 통한 생산기술 확립을 통하여 제품의 고품질화가 이루어져 직접적으로 매출증가로 이어질 것으로 기대한다. 벼 현탁세포 유래 재조합 Enterokinase의 대용량 분리정제를 통하여 품질관



리가 가능 하다. 경쟁제품 순도( > 90%) 대비 고순도( > 95%)의 Enterokinase 분리정제를 통하여 제품 경쟁력 강화가 기대된다.

#### 4. 식물세포배양을 이용한 항체 대량생산 및 기능 분석

식물세포 배양을 이용한 유용 단백질 생산을 위하여 고발현 시스템의 개발은 필수적이라 할 수 있다. 항체 단백질을 발현하는 식물세포 현탁배양에서 amylase와 protease에 대한 siRNA 기법을 이용하여 배지에 축적되는 amylase와 protease 활성의 감소를 확인하여 다른 유용단백질 발현에 기초 정보로 이용될 수 있다. 식물세포 현탁배양에 순수분리된 항체단백질을 이용하여 *P. gingivalis*에 대한 방어 기능을 확인함으로써 식물세포를 이용한 항체 단백질 생산 분야에 기초 정보를 제공할 수 있을 것이다.

#### 5. 경구백신 효율 증진 방안 및 백신 효능 검정 연구

현재까지 점막면역계는 면역반응 유도보다는 면역관용이 주로 일어나는 곳으로 알려져 있어 백신 전달의 주된 경로로 사용되지 못하였다. 하지만, 본 연구를 통하여 항원의 targeting을 통한 면역반응의 유도 방법이 개발되면서 경구 점막면역계를 항원전달의 target으로 사용할 수 있는 길을 열게 되었다. 이는 그 동안 가장 이상적인 백신 전달 경로임을 인지하면서도 면역계의 특성 때문에 쉽게 사용할 수 없었던 경구면역계를 통한 백신 투여의 가능성을 확인하게 하여 경구백신 개발과 사용의 활성화에 크게 기여하는 연구가 진행되었다고 할 수 있다.

#### 6. 고효율 발현 종자 및 뿌리 특이적 프로모터와 벡터 시스템 개발

개발된 프로모터들은 모두 특허출원하였고, 특정 부분들만 조합적으로 재조합하여서 종자 특이적 유전자 발현 기술에 활용할 계획으로 고효율 단백질 발현시스템 개발에 효과가 있을 것으로 기대된다.

#### 7. 면역원성이 제거된 인간화 당단백질 생산용 벼 신품종 개발

맞춤형 당질 부가 glycoengineering 기술은 새로운 바이오의약품 생산시스템 개발을 위한 원천기술이며 맞춤형 바이오의약품 개발을 위한 원천기술로써 고세병 치료제인 glucocerebrosidase를 포함한 희귀 난치병의 치료제 생산에 이용될 수 있고 관련 산업 발전에 크게 기여할 것으로 사료된다.

#### 8. 식물세포에서의 단백질 고축적 기법 개발

식물에서의 단백질 고발현은 모든 식물을 이용한 biotechnology에 있어서 필수적이다. 본 연구에서 얻어진 다양한 단백질 고발현을 위한 cellular tool들은 고부가가치의 단백질 생산에 활용될 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 얻어진 단백질 이동이나 targeting 과정에 대한 정보는 다양한 소기관에 단백질을 targeting하여 축적하고자 할 때 아주 중요한 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1절 연구 개발 성과

#### 1. 논문게재

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	어류 경구백신 현황과 전망	박은준	정화지	김미나외 2인	식물생명공학회지	37(3)	국내	비SCI
2009	Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress	김선영	이상열	장호희 외 12인	Plant science	177	국외	SCI
2009	Multiple Sequence Motifs in the Rubisco Small Subunit transit Peptide independently contribute to Toc159-Dependent Import of Proteins into Chloroplasts.	DW Lee	I Hwang	S Lee, YJ Oh	Plant Physiology	151(1)	국외	SCI
2009	Transport vesicle formation in plant cells.	I Hwang	DG Robinson		Current Opinion in Plant Biology	12(6)	국외	SCI
2010	Current trends in edible vaccine development using transgenic plants	TG Kim	MS Yang		Biotechnol. Bioprocess Eng	15	국내	SCIE
2010	High-level production of bioactive heterodimeric protein human interleukin-12 in rice	YJ Shin	TH Kwon	NJ Lee 외 3인	Enzyme and Microbial Technology	46	국외	SCI
2010	N-linked glycan analysis of glycoproteins secreted from rice cell suspension cultures under sugar starvation	YJ Shin	TH Kwon	YJ Chong, KB Han	Enzyme and Microbial Technology	47	국외	SCI
2010	Rac/ROS-related protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase signaling are involved in a negative regulating cascade in B cell activation by antibody-mediated cross-linking of MHC class II molecules	양희영	장용석	김주, 이경열	Molecular Immunology	47(4)	국외	SCI
2010	The M cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination	SH Kim	YS Jang	KW Seo, J Kim, KY Lee	Journal of Immunology	185 (10)	국외	SCI
2010	Homomeric Interaction of AtVSR1 is essential for its	H Kim	I Hwang	H Kang 외 4인	Plant Physiology	154(1)	국외	SCI

	function as a Vacuolar sorting receptor.							
2011	Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce ( <i>Lactuca sativa</i> L.)	NX Huy	MS Yang	TG Kim	Mol. Biotechnol.	48(3)	국외	SCIE
2011	Highly expressed cholera toxin B subunit in the fruit of transgenic tomato ( <i>Lycopersicon esculentum</i> L.)	NH Loc	TG Kim	Thinh LT, Yang MS	Biotechnol Bioprocess Eng	16	국내	SCIE
2011	Production of recombinant human granulocyte macrophage- colony stimulating factor in rice cell suspension culture with a human-like N-glycan structure	YJ Shin	TH Kwon	YJ Chong, MS Yang	Plant Biotechnology Journal	9(9)	국외	SCIE
2011	M cells expressing the complement C5a receptor are efficient targets for mucosal vaccine delivery	SH Kim	YS Jang	DI Jung 외 5인	European Journal of Immunology	41(11)	국외	SCI
2011	Nonsense-Mediated mRNA Decay Factors, UPF1 and UPF3, Contribute to Plant Defense	HJ Jeong	JS Shin	YJ Kim 외 4인	Plant and Cell Physiology	52(12)	국외	SCI
2011	Proteomic identification of an embryo-specific 1Cys-Prx promoter and analysis of its activity in transgenic rice	JH Kim, IJ Jung (공동)	KO Lee	DY Kim 외 11인	Biochem. Biophys. Res. Comm.	408(1)	국외	SCI
2011	Proteomic analysis of RNA interference induced knockdown plant	SL Lee	KO Lee		Methods in Molecular Biology	744	국외	비SCI
2011	Identification of sorting motifs of At $\beta$ Fruct4 for trafficking from the ER to the Vacuole through the Golgi and PVC.	C Jung	I Hwang	GJ Lee 외 5인	Traffic	12(12)	국외	SCI
2011	An Arabidopsis prenylated Rab acceptor 1 isoform, AtPRA1.B6, displays differential inhibitory effects on anterograde trafficking of proteins at the endoplasmic reticulum.	MH Lee	I Hwang	C Jung 외 3인	Plant Physiology	157(2)	국외	SCI
2011	Localization and Trafficking of an isoform of the AtPRA1 Family to the Golgi apparatus depend on both N- and C-terminal sequence motifs.	CJ Jung	I Hwnag	MH Lee, MK Min	Traffic	12(2)	국외	SCI
2012	Immunogenicity of a neutralizing epitope from porcine epidemic diarrhea virus-M cell targeting	NX Huy	TG Kim	SH Kim, YS Yang	Plant Cell Reports	31(10)	국외	SCI

	ligand fusion protein expressed in transgenic rice calli.							
2012	Development of transgenic maize using immature embryos of Hill genotype as a vaccine candidate	HA Kim	PS Choi	SY Kwon, HS Yoo, MS Yang	American Journal of Biochemistry and Biotechnology	8	국외	
2012	Expression of a consensus dengue virus envelope protein domain III in transgenic callus of rice	MY Kim	TG Kim	MS Yang	Plant Cell Tiss Organ Cult	109	국외	SCI
2012	Production of monoclonal antibodies against the FimA protein of Porphyromonas gingivalis in Nicotiana benthamiana	TG Kim	MS Yang	BG Kim 외 3명	Biotechnol Bioprocess Eng	17	국내	SCIE
2012	Mucosal immune system and M cell-targeting strategies for oral mucosal vaccination	SH Kim	YS Jang	KY Lee	Immune Network	12 (5)	국내	학진등재
2012	Induced tyramine overproduction in transgenic rice plants expressing a rice tyrosine decarboxylase under the control of methanol-inducible rice tryptophan decarboxylase promoter	S Park	K Back	K Lee 외 3인	Bioprocess and Biosystems Engineering	35 (1-2)	국외	SCIE
2012	Trafficking of Vacuolar Proteins: The Crucial Role of Arabidopsis Vacuolar Protein Sorting 29 in Recycling Vacuolar Sorting Receptor	H Kang	I Hwang	SY Kim 외 5명	Plant Cell	24(12)	국외	SCI
2013	Expression of a cholera toxin B subunit and consensus dengue virus envelope protein domain III fusion gene in transgenic rice callus.	MY Kim	TG Kim	ND Chung, MS Yang	Plant Cell Tiss Organ Cult	112	국외	SCI
2013	M Cell-Targeting Ligand and Consensus Dengue Virus Envelope Protein Domain III Fusion Protein Production in Transgenic Rice Calli	TG Kim	MS Yang	MY Kim, NX Huy, SH Kim	Mol Biotechnol	54 (3)	국외	SCI
2013	Codon-optimized expression of fish iridovirus capsid protein in yeast and its application as an oral vaccine candidate	Seo SY	Kim TJ	Chung HJ	J. of Fish Diseases	36 (9)	국외	SCI
2013	The trehalose gene is involved in flower development and plant	JY Park	HJ Chung	DS Lee	Plant Biosystems	147	국외	SCI

	growth in Arabidopsis							
2013	Nasal immunization with major epitope-containing ApxIIA toxin fragment induces protective immunity against challenge infection with <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> in a murine model	KW Seo, SH Kim	KY Lee, YS Jang	J Park, HS Yoo	Veterinary Immunology and Immunopathology	151 (1-2)	국외	SCI
2013	Application of M cell targeting ligand for oral vaccination to induce efficient systemic and mucosal immune responses against viral antigens	SH Kim	KY Lee, YS Jang	DI Jung 외 6인	International Immunology	25 (11)	국외	SCI
2013	C5aR receptor-targeting ligand-mediated delivery of dengue virus antigen to M cells evokes antigen-specific systemic and mucosal immune responses in oral immunization	SH Kim	KY Lee, YS Jang	IY Yang 외 5인	Microbes and Infection	15	국외	SCI
2013	Pro-IL-16 is associated with MHC ClassII-mediated negative regulation of mouse resting B cell activation through MAP Kinases, NF- $\kappa$ B and Skp-dependent p27 <sup>kip</sup> regulation.	HY Yang	YS Jang	J Kim, SH Kim, CH Choe	Scandinavian journal of immunology	77 (3)	국외	SCI
2013	A microneutralization assay for dengue viruses using mosquito C6/36 cells	SH Kim	YS Jang	SH Jang, J Kim, KY Lee	Acta virologica	57 (3)	국외	SCI
2013	Targeted delivery of VP1 antigen of Foot-and-mouth disease virus to M cells enhances the antigen-specific systemic and mucosal immune response	SH Kim	YS Jang	HY Lee	Immune network	13 (4)	국내	
2013	An Arabidopsis R2R3-MYB transcription factor, AtMYB20, negatively regulates type 2C serine/threonine protein phosphatases to enhance salt tolerance	MH Cui	JS Shin	KS Yoo 외 6인	FEBS Letters	587(12)	국외	SCI
2013	The unfolded protein response in plants: a fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses.	WI Duwi Fanata	KO Lee	SY Lee	Journal of Proteomics	93	국외	SCI
2013	An Arabidopsis Cell Growth Defect Factor-Related Protein, CRS, Promotes Plant Senescence by Increasing the Production of Hydrogen Peroxide	MH Cui	JS Shin	SH Ok 외 3인	Plant and Cell Physiology	54(1)	국외	SCI
2013	A Cystathionine- $\beta$ -synthase Domain-Containing Protein,	KW Jung	JS Shin	YY Kim 외 6명	Plant and Cell	54(2)	국외	SCI

	CBSX2, Regulates Endothelial Secondary Cell-Wall Thickening in Anther Development				Physiology			
2013	N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in <i>Oryza sativa</i>	WI Fanata	KO Lee	KH Lee 외 10 dls	Plant Journal	73	국외	SCI
2013	RNA-dependent RNA polymerase 6 is required for efficient hpRNA-induced gene silencing in plants	R Harmoko	KO Lee	WID Fanata 외 8명	Molecules and Cells	35 (3)	국내	SCI
2013	Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting.	DW Lee	I Hwang	C Jung	Biochimica et Biophysica Acta	1833(2)	국외	SCI
2013	An A/ENTH Domain-Containing Protein Functions as an Adaptor for Clathrin-Coated Vesicles on the Growing Cell Plate in <i>Arabidopsis</i> Root Cells.	K Song	I Hwang	M Jang 외 6인	Plant Physiology	159 (3)	국외	SCI
2013	Recruitment of Arf1-GDP to Golgi by Glo3p-type ArfGAPs is crucial for Golgi maintenance and plant growth	MK Min, M Jang	I Hwang	M Lee 외 4인	Plant Physiology	161(2)	국외	SCI
2013	<i>Arabidopsis</i> $\mu$ -adaptin subunit AP1M of adaptor protein complex 1 mediates late secretory and vacuolar traffic and is required for growth.	M Park, K Song	I Hwang, G Jurgens	I Reichardt 외 3인	Prod Natl Acad Sci	110(25)	국외	SCI
2013	Adaptor Protein Complex 2-mediated endocytosis is crucial for male reproductive organ development in <i>Arabidopsis</i> .	SY Kim, ZY Xu	I Hwang	K Song 외 6인	Plant Cell	25(8)	국외	SCI
2013	Generation of Transgenic <i>Arabidopsis</i> plants expressing mCherry-fused organelle marker proteins	DH Kim	I Hwang	ZY Xu	J. Plant Biol.	56(6)	국외	SCI
2013	The <i>Arabidopsis</i> NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses.	ZY Xu, SY Kim	I Hwang	DY Hyeon 외 9인	Plant Cell	25(11)	국외	SCI
2013	AtHSP17.8 overexpression in transgenic lettuce gives rise to dehydration and salt stress resistance phenotypes through modulation of ABA-mediated signaling	DH Kim	I Hwang	ZY Xu	Plant Cell Reports	32(12)	국외	SCI
2014	The immediate upstream	Y Kim	I Hwang	G Lee 외	Nucleic	42(1)	국외	SCI



region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in Arabidopsis thaliana.				6인	Acids Research			
--	--	--	--	----	----------------	--	--	--

2. 특허 출원 및 등록

특허 출원					특허 등록				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호
2009	아밀라아제유전자 침묵에 의한 재조합단백질 증산방법	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-00026974	2011	고구마 유래 익스팬신 유전자의 cDNA 및 이를 이용한 고 생산성 형질전환 식물체	고려대학교 산학협력단	일본	4696090
2009	번역효율 증진용 DNA 단편 및 이를 포함하는 재조합백터	헬릭스 주식회사	대한민국	10-2009-008143	2011	티오레독신 유사 단백질의 오리고머화를 통한 고온 저항성이 증진된 식물체	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-1073849
2009	형질전환 식물 유래의 고병원성 조류독감 바이러스 단백질 백신 및 제조방법	헬릭스 주식회사	대한민국	10-2009-0094627	2011	고구마 유래 식물저장뿌리 고효율 발현 MADS-box 프로모터	고려대학교 산학협력단	캐나다	2,544,798
2010	세포질 분열을 조절하는 유전자, 상기유전자로 형질전환된 식물	포항공과대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0019042	2013	식물을 이용한 재조합 돼지 유행성 설사병 바이러스 (PEDV) 백신의 제조 방법 및 그에 따른 PEDV 백신	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-1339703
2010	벼로부터 유래한 1 시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 {1 Cys-Prx promoter from Oryza sativa L.}	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0017022	2013	인간 엔테로키나아제 경사슬 단백질을 생산하는 식물체 및 이의 용도	(주)엔비엠	대한민국	10-1321890
2011	콜레라 독소 B 서브유닛과 돼지 유행성 설사 바이러스의 중화 항원결정기를	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0000459	2013	이노카인 (INNOkine)-제01류 (상표등록)	(주)엔비엠	대한민국	40-1009072

	포함하는 재조합유전자, 이를 발현하는 식물체 및 이의 용도								
2011	어류 바이러스성 신경 괴사증에 대한 경구 백신용 형질전환식물체의 제조방법 및 그에 다른 식물체	(주)젠다스	대한민국	10-2011-0042593	2013	이노카인 (INNOkine)-제05류 (상표등록)	(주)엔비엠	대한민국	40-1009073
2011	C5a 수용체의 리간드와 투여물질이 결합되어 형성된 점막 투여용 물질 전달체	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0015665	2013	이노자임 (INNOzyme)-제01류 (상표등록)	(주)엔비엠	대한민국	40-1009074
2011	보체 단백질 C5a 수용체 리간드를 포함하는 점막 면역 보조제 및 이를 이용한 면역 유도 방법	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0015673	2013	이노자임 (INNOzyme)-제05류 (상표등록)	(주)엔비엠	대한민국	40-1009075
2012	식물을 이용한 재조합 돼지 유행성 설사병 바이러스 (PEDV) 백신의 제조방법 및 그에 따른 PEDV 백신	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0079784	2013	이노맵-제01류	(주)엔비엠	대한민국	40-1009076
2012	형질전환 식물체를 이용한 어류 바이러스성 신경괴사증 예방 경구백신 제조방법과 그에 다른 식물체	(주)젠다스	대한민국	10-2012-0130018	2013	이노맵-제05류	(주)엔비엠	대한민국	40-1009077
2012	인간 엔테로키나아제 경사슬 단백질을 생산하는 식물체 및 이의 용도	(주)엔비엠	대한민국	10-2012-0036227	2013	보체 단백질 C5a 수용체 리간드를 포함하는 점막 면역 보조제 및 이를 이용한 면역 유도 방법	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-1309109
2012	Plant producing human Enterokinase light chain protein and uses thereof	(주)엔비엠	PCT	PCT/KR2012/005757	2013	배(embryo) 조직의 전형성증 및 유근 특이 프로모터	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-1356845
2012	인간 카텔리시딘 LL-37을	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0135114	2013	배(embryo) 조직과 종자 내피(seed	고려대학교	대한민국	10-1369526

	포함하는 경구 백신용 보조제.					inner integument) 특이 프로모터	산학협력단		
2012	벼로부터 유래한 1 시스템인 퍼록시레독신 프로모터 {1 Cys-Prx promoter from Oryza sativa L.}	경상대학교 산학협력단	대한민국 (PCT)	PCT/KR2012/001380	2013	벼로부터 유래한 1 시스템인 퍼록시레독신 프로모터	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-1329224
2012	고만노스형 엔-글라이칸을 생산하는 벼 및 이의 용도 {Rice Producing Highmannose Type N-glycans and Uses Thereof}	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0048511	2014	C5a 수용체의 리간드와 투여물질이 결합되어 형성된 점막 투여용 물질 전달체	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-1379442
2012	식물체에서 목적 단백질의 번역 효율을 증진시키기 위한 염기서열	포항공과대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0141256					
2013	콜레라 독소 B 서브유닛과 바이러스 항원 단백질의 융합 항원 단백질 백신, 이를 발현하는 식물체 및 이의 용도	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0002649					
2013	등근잎 유흥초 켈러스의 대량 생산 방법	(주)젠다스	대한민국	10-2013-0007909					
2013	이노카인(INNOkine)-제01류	(주)엔비엠	국내	40-2013-0000961					
2013	이노카인(INNOkine)-제05류	(주)엔비엠	국내	40-2013-0000962					
2013	이노자임(INNOzyme)-제01류	(주)엔비엠	국내	40-2013-0000963					
2013	이노자임(INNOzyme)-제05류	(주)엔비엠	국내	40-2013-0000964					
2013	모기 세포주 C6/36를 이용한 뎅기 바이러스 감염의 진단방법 및 마이크로 중화에세이를 사용한	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0081814					

	중화항체의 역가를 평가하는 방법								
2013	배(embryo) 조직 특이 프로모터	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013- 0000061					
2013	배(embryo) 조직의 전형성층 및 유근 특이 프로모터	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013- 0000063					
2013	배(embryo) 조직과 종자 내피(seed inner integument) 특이 프로모터	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013- 0006168					
2013	종자 배유 (endosperm) 조직 특이 프로모터 염기서열	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013- 0040120					
2013	완숙된 종자의 배 (embryo) 조직 특이 프로모터 염기서열	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013- 0040124					
2013	종자의 종피와 꼬투리 선호적 발현 프로모터	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013- 0044125					
2013	고만노스형 엔-글라이칸을 생산하는 벼 및 이의 용도 {Rice Producing Highmannose Type N-glycans and Uses Thereof}	경상대학교 산학협력단	대한민국 (PCT)	PCT/KR2 013/0040 43					
2013	고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체 및 이를 이용한 고-만노오스형 N-글라이칸의 생산방법	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-2013- 0052143					
2014	벼 세포 현탁 배양을 이용한 포르피로모나스 긴기발리스의 FimA 단백질에 대한 단클론 항체의 생산 방법	전북대학교 산학협력단	대한민국	10-2014- 0051714					

3. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				매출액 합계(원)
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태	
TEV endopeptidase	· 정제된 TEV endopeptidase 판매	(주)엔비엠	권태호	9	자체사업화	99,841,500
Enterokinase	· 정제된 Enterokinase 판매	(주)엔비엠	권태호	9	자체사업화	63,850,200
합 계						163,691,700

4. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
32	20	12			13	19	2		30

나. 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외
			1건 (3인)
			1. 일본 타마가와대학 기술습득(신윤지 외 2인, 2011. 2. 13-19)

다. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
					5 (주)젠닥스	5
					4 (주)엔비엠	4
						9

## 제 2 절 성과활용 계획

### 1. 실용화, 산업화 계획

#### 가. 능성어 노다바이러스 예방 경구백신

본 연구에 의해 생산된 제품은 항원단백질을 식물체에서 생산하고 면역증강효과가 있는 키토산 adjuvant formulae를 이용하여 직접 어류에 경구적인 방법으로 투여 하는 장점이 있다. 연구를 통해 개발된 기술은 어류의 다른 질병들에도 동일한 방식으로 접목이 가능하며 이로 인해 백신의 대상이 다양한 어종에 대해 다양한 질병으로 확산이 가능하다.

#### 나. 노다바이러스 예방 백신 생산 담배 종자

형질전환 작물 시장은 고도의 기술과 특허독점으로 고부가가치의 산업적 가치가 있다. 향후 국내 형질전환 작물의 품종화, 상업화가 가능할 것으로 추정됨으로 형질전환 작물 내에서의 유용 단백질 발현을 높일 수 있는 다양한 프로모터의 개발과 형질전환 식물체등에 대한 지적 재산권의 가치가 높아지고 있다. 본 연구팀은 과제를 통해 노다바이러스 재조합 단백질 고발현 벡터 제작에 성공하였을 뿐만 아니라 두 품종의 담배 형질전환 식물에 대해서 특허를 출원하였다.

다. 벼 현탁세포 유래 고순도 TEV endopeptidase와 Enterokinase를 제 1핵심- 3 세부과제 연구 기관인 (주)엔비엠이 자체적으로 사업화를 실시하였고 5-10 년 이내에 다른 의료용 단백질 및 산업용 효소 생산에 대한 연구가 진행될 것으로 기대한다.

라. 사업단 연구에서 얻은 고부가가치 단백질 생산 형질전환 작물은 3-5 년내에 농업형질검사 및 위해성 검사가 이루어질 것으로 예상하고 또한 신품종으로 등록하기 위해서는 앞으로 10 년 이상의 기간이 필요할 것으로 예상된다.

마. 본 연구에서 얻어진 고효율 단백질 발현 시스템은 식물을 단백질 생산 시스템으로 개발하고자 하는 데 중요한 원천 기술이 될 수 있을 것이다. 따라서 본 연구진에서 확보한 high level translational enhancer는 기술 이전되었으며 이를 이용하여 식물 세포에서 단백질의 대량 생산에 활용하고자 하고 있다. 특히 식물 세포에서 만들어지는 단백질들을 백신으로 사용하였을 때 탁월한 효과를 보이는 결과를 얻고 있다. 따라서 이러한 연구들은 산업화로 이어질 수 있을 것이라 사료된다. 또한 식물의 가장 중요한 장점은 edible로 개발할 수 있다는 것이다. 대량의 단백질이 만들어지는 식물을 edible 시스템으로 개발하여 oral vaccination에 활용할 수 있을 것이다. 최근의 조류 독감과 같은 경우에 virus free subunit vaccine을 식물에서 고발현하여 edible system으로 개발 할 수 있을 것이다. 이 때 엽록체나 mitochondria에 targeting된 단백질들이 gastrointestinal tract에서 더 잘 보호 받을 수 있을 것이며 따라서 intestinal cell에서 uptake에 더 효율적일 수 있다. 또한 chloroplast나 mitochondria의 외막에 protective protein을 targeting하여 gastrointestinal tract에서의 보호능력을 더 강화할 수 있을 것이다.



## 2. 기대성과

### 가. 기술적 측면

기능성 화장품의 신소재 개발과 더불어 원료 제형화 원천기술 확보와 식물 유래의 재조합 단백질 생산을 통해 고부가가치 물질 개발 및 생산이 가능하다. 또한 경구용 바이러스 백신의 개발을 통해 어류 및 다양한 동물의 바이러스성 질병 예방이 가능하다.

### 나. 경제적·산업적 측면

국외시장 분석결과 유전자 도입 작물들은 22개국에서 1억 ha 이상의 면적에서 생산되어 판매되고 있으며, 형질전환 작물 개발은 대두, 옥수수, 토마토, 면화, canola 등으로 주로 식용 및 사료작물을 위주로 이루어져 왔으며, 제초제 저항성과 내충성 형질을 가진 작물 개발이 대다수를 차지하고 있다. 국내시장에서는 현재 까지 국내 기술로 개발되어 생산 및 판매가 되고 있는 유전자 도입 식물은 없으나, 수년 내 벼와 잔디 등을 대상으로 제초제 저항성과 내충성 신품종이 개발되어 생산 및 판매가 이루어질 것으로 예상된다. 따라서 본 연구 과제에서는 가능성은 인정되나 현재까지 국내외 시장 분석 결과 연구가 필요하다고 판단되는 고부가가치 물질 생산을 위한 작물을 개발하는 연구를 추진하여 식물 세포내에 생산한 어류 질병예방 백신과 작물개발이 가능하다.

## 3. 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획 등

가. 본 사업화 결과는 우리나라 최초의 분자농업 사업화 결과로 파악하고 있으며, 국내 분자농업기술의 사업화 가능성을 보여주는 사례로서 적극 홍보하여 사업화 가능성이 높은 연구 결과를 보유한 관련 기관의 적극적인 사업화 추진의 사례가 될 수 있도록 관련 학회참가, 전시회참가 및 언론 홍보 등 적극적인 활동을 추진 할 예정이다.

나. 본 연구에서 얻어진 대부분의 기술들은 식물에서 단백질을 생산하고자 할 때 필요한 원천 기술들이므로 이들은 다른 부분에서의 연구에서나 단백질 산업화 연구에 필수적인 내용들이다. 따라서 이러한 연구 결과가 다른 부분에서 충분히 활용될 수 있을 것이다.

## 3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

가. 본 사업의 추진을 통하여 확보한 TEV endopeptidase와 Enterokinase의 생산기술 등의 연구결과는 기존에 논문발표 및 특허 등록을 통하여 지적재산권을 확보하였다.

나. 향후 벼 현탁세포 유래 고순도 TEV endopeptidase와 Enterokinase의 새로운 용도개발이 완성 될 경우에는 관련 학회에 논문을 투고함과 함께 특허를 출원하여 지적재산권을 확보할 계획이다.

다. 본 연구에서 얻어지는 내용들은 식물세포를 단백질 생산 시스템으로 개발하고자 할 때 필요한 원천 기술들이므로 특허를 통해서 지적 재산권을 확보할 것이다. 이미 일부의 연구 결과는 특허 출원되어 있다.

#### 4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

가. 벼 현탁세포 유래 고순도 TEV endopeptidase와 Enterokinase의 대량생산 및 고순도 분리 정제 기술을 활용하여 다른 고부가가치 재조합 단백질(재조합 성장인자, 항체, 산업용 효소 등)의 생산 및 산업화에 활용 할 계획이다.

나. 추가 연구가 절실히 필요로 한다. 식물 세포를 단백질 생산 시스템으로 개발하기 위해서는 본 연구에서 얻어진 결과들을 더 확대하거나 추가할 필요가 있다. 21세기 바이오텍 산업의 핵심 중의 하나가 단백질 생산 산업일 것이다. 따라서 식물에서 저비용으로 대량의 의약품 및 산업용 단백질을 생산할 수 있다면 산업화 할 수 있을 것이므로 이 부분에 추가적인 연구가 절실히 필요하다.

#### 5. 연구기획사업

본 연구에서 얻어진 결과를 바탕으로 기회가 된다면 단백질 소재 생산 산업화 연구 기획 사업을 추진하고자 한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1절 연구관련 해외과학기술 수집현황

#### 1. 경구용 백신의 특허 자료

##### 가. 특허 분석

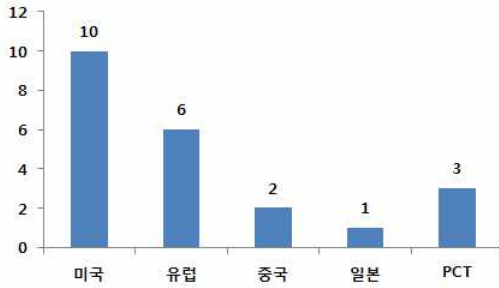
경구용 백신의 특허 분석 결과 미국, 유럽, 중국, 일본 등지에서 출원 및 등록이 활발하게 진행중에 있다. 재조합 단백질을 생산하기 위한 대상은 식물과 유산균이 대부분이며, 도입 유전자는 세균성 질환 유발 균으로부터 유래한 것이 다수이다.

제목	출원국	출원기관(출원인)	host	gene
Vaccines expressed in plants	미국	Prodigene, Inc.	담배, 토마토, 벼	HBsAg
Exression of protective antigens in transgenic chloroplasts and the production of improved vaccines	유럽	UNIVERSITY OF CENTRAL FLORIDA	토마토, 당근, 옥수수, 담배	탄저균, 페스트균 백신
Exression of protective antigens in transgenic chloroplasts and the production of improved vaccines	유럽	UNIVERSITY OF CENTRAL FLORIDA	토마토, 당근, 옥수수, 담배	탄저균, 페스트균 백신
Expression of protective antigens in transgenic chloroplasts	미국	University of Central Florida Research Foundation, Inc.	토마토, 당근, 옥수수, 담배	탄저균, 페스트균 백신
Chloroplast-derived human vaccine antigens against malaria	PCT	University of Central Florida Research Foundation, Inc.	담배	말라리아 백신
Exression of protective antigens in transgenic chloroplasts and the production of improved vaccines	미국	Daniell Henry	토마토, 당근, 옥수수, 담배	탄저균, 페스트균 백신
Chloroplast-derived human vaccine antigens against malaria	미국	Daniell Henry	담배, 상추	말라리아 백신
Oral vaccines produced and administered using edible micro-organism	미국	Vaxgene Corporation	락토코커스 락티스 (유산균)	H5N1 바이러스
Oral vaccines produced and administration using edible micro-organism	유럽	Vaxgene Corporation	락토코커스 락티스 (유산균)	H5N1 바이러스
Oral vaccines produced and administration using edible micro-organism	PCT	Vaxgene Corporation	락토코커스 락티스 (유산균)	H5N1 바이러스
Immunoprotection by oral administration of recombinant Lactococcus lactis mini-capsules	PCT	Vaxgene Corporation	락토코커스 락티스 (유산균)	H5N1
Human papilloma virus vaccine for oral administration	유럽	Asahi Glass Company	yeast	HPV
Edible vaccine	미국	ASAHI GLASS CO., LTD.	yeast	HPV
Transgenic ficus, method for producing same and use thereof	미국	Flaishman Moshe	무화과나무	형질전환 및 regeneration 방법
Highly pathogenic avian influenza virus protein vaccine derived from transgenic plant, and preparing method thereof	미국	Helix, Co., Limited		H5N1(CBD)
Highly pathogenic avian influenza virus protein vaccine derived from transgenic plant, and method for preparing same	유럽	Helix, Co., Limited		H5N1(CBD)
Immunoprotection by oral administration of recombinant Lactococcus lactis mini-capsules	미국	Lam Dominic Man-Kit	락토코커스 락티스 (유산균)	H5N1
Pharmaceutical Proteins, Human Therapeutics, Human Serum Albumin Inulin, Native Cholera Toxin B Subunit on Transgenic Plastids	미국	University of Central Florida Research Foundation, Inc.	담배	insulin-CT B 융합 단백질
Immunization through oral administration of a vaccine with an edible product	유럽	HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND DEVELOPMENT LTD.	토마토	간염 A 바이러스 (HAV)
Method and device for culturing liquid cultivation seed of mushroom for eating and medicine	중국	Feng Wei	공개X	
Cordyceps militaris plastic bag cultivation method	중국	Zheng Wei	공개X	
Bacillus natto vaccine	일본	TAKANO FOODS KK		bacillus Natto vaccine

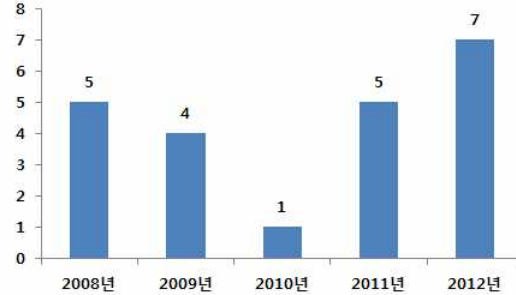
나. 국가별, 연도별 분석

미국에서의 경구용 백신 개발의 특허건 수가 가장 많으며, 2010년을 기점으로 증가되는 추세이다.

국가별 등록건수



연도별 등록건수



2. 식물유래 백신생산

가. 형질전환방법 비교 분석

식물유래의 재조합 단백질을 생산하는데 가장 널리 이용되는 3가지 방법을 조사한 결과 색소체 형질전환을 포함한 안정적 형질전환 방법이 단백질 발현이 가장 높았다. 세포배양을 통한 대량배양 방법은 인프라 비용이 높아 생산비용이 높은 단점을 가진다.

	Stable transformation	Transient transformation	Stable cell line based expression
필요사항	최적화 된 형질전환 방법	바이러스 / A. tumefaciens strain	최적화 된 세포 배양방법
발현기관	식물 or 조직	잎	세포 현탁액 or 모상근
발현 level	상	중	중
제품화	식용 / 정제	식용 / 정제	정제
소요시간	길다	짧다	짧다
인프라비용	저	저	고
최종 제품 제작 비용	저	중	고
Transgene silencing	예	예	예
증식	천천히	적용 할 수 없음	빠른
유전 (안정성)	Yes	No	No

Biotechnology Advances 27 (2009) 449-467

나. 타겟 작물 조사

식물을 이용한 재조합 단백질 생산에는 담배가 가장 많이 이용되고 있으며, 경구용 백신 개발이라는 특징 때문에 생식으로 섭취할 수 있는 토마토, 바나나 등의 연구도 활발하게 진행 중이다.

Plant/fruit	advantages	Disadvantages
Tobacco	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Good model for evaluating recombinant proteins</li> <li>- Low-cost preserving</li> <li>- Easy purification of antibodies stored in the seeds, at any location</li> <li>- Large harvests, number of times/year</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produces toxic compounds</li> </ul>
Potato	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dominated clinical trials</li> <li>- Easily manipulated/transformed</li> <li>- Easily propagated from its "eyes"</li> <li>- Stored for long periods without refrigeration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Needs cooking, which can denature the antigens and decrease immunogenicity</li> </ul>
Banana	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Do not need cooking</li> <li>- Proteins not destroyed even if cooked</li> <li>- Inexpensive</li> <li>- Grown widely in developing countries</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trees take 2-3 years to mature</li> <li>- Transformed trees take about 12 months to bear fruit</li> <li>- Spoils rapidly after ripening</li> <li>- Contains very little protein, so unlikely to produce large amounts of recombinant proteins</li> </ul>
Tomato	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grow quickly</li> <li>- Cultivated broadly</li> <li>- High content of vitamin A may boost immune response</li> <li>- Overcome the spoilage problem by freeze-drying technology</li> <li>- Heat-stable, antigen-containing powders, made into capsules</li> <li>- Different batches blended to give uniform doses of antigen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spoils readily</li> </ul>
Rice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Commonly used in baby food because of low allergenic potential</li> <li>- High expression of proteins/antigens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grows slowly</li> <li>- Requires specialized glasshouse conditions</li> </ul>
Lettuce	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Easy storage/transportation</li> <li>- Expressed protein is heat-stable</li> <li>- Fast-growing</li> <li>- Direct consumption</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spoils readily</li> </ul>
Soybean and Alfalfa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Large harvests, number of times/year</li> </ul>	
Musk melon (cantaloupe)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fast growing</li> <li>- Easily propagated by seed</li> <li>- Easily transformed</li> </ul>	
others	Carrots, peanuts, wheat, corn	

다. 식물유래 경구용 백신의 연구동향

식물유래 경구용 백신을 개발하기 위해 대학 뿐만 아니라 다국적 기업이 증가하고 있는 추세이다. 대학연구팀으로는 예일대, 텍사스대 등이 있으며, 기업으로는 바이엘사 (립프종), 메디카고사 (조류독감), VAXX사 (노로바이러스), Temp사 (독감, 노로바이러스, 대장균), 마스 터진 및 제노마인진 (자궁경부암) 등이 식물유래 경구백신을 개발 중에 있다.



라. 색소체 형질전환 유래의 경구백신 연구동향

핵형질전환에 비해 재조합 단백질 발현이 높은 방법으로 알려진 색소체 형질전환을 통해 다양한 재조합 단백질을 생산하고 있다. 쌍자엽, 단자엽 식물을 가리지 않고 형질전환을 시도하고 있다.

Protein	Source of transgene	Plant species	Protein level	Protein immunogenicity
p24-Nef <sup>a</sup>	HIV-1	Tobacco	40% TSP	NR <sup>b</sup>
		Tomato	2.5% TSP	NR
Pr55 <sup>gag</sup>	HIV-1	Tobacco	7-8% TSP	NR
p24 <sup>a</sup>	HIV-1	Tobacco (Maryland Mammoth)	4.5% TSP	NR
L1_2xCysM (Mutated L1)	HPV-16	Tobacco	1.5% TSP	NR
L1 <sup>a</sup>	HPV-16	Tobacco	1.5% TSP	NR
L1	HPV-16	Tobacco	24% TSP	Immunogenic in mice
E7-CP	HPV-16	Tobacco	0.5% TSP	NR
A27L	Vaccinia virus	Tobacco	18% TSP	NR
F1-V	<i>Yersinia pestis</i>	Tobacco	14.8% TSP	Immunogenic in mice
VP-βGUS	Footh-and-mouth disease virus	Tobacco	51% TSP	Immunogenic in Mice
E2	Classical swine fever virus	Tobacco	1-2% TSP	Immunogenic in mice
2 I21-TD	Canine parvovirus	Tobacco	6% TSP	Immunogenic in mice
DPT	<i>Corynebacterium Diphtheria</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Clostridium tetani</i>	Tobacco	0.8% TSP	Immunogenic in mice
CTB-AMA1	<i>Vibrio cholerae</i> - <i>Plasmodium falciparum</i>	Tobacco	13.2% TSP	Immunogenic in mice
		Lettuce	7.3% TSP	
CTB-MSP1	<i>V. cholerae</i> - <i>P. falciparum</i>	Tobacco	10.1% TSP	Immunogenic in mice
		Lettuce	6.1% TSP	
LTB-ST <sup>a</sup>	<i>Escherichia coli</i>	Tobacco	2.3% TSP	Immunogenic in mice
LTB-HNE <sup>a</sup>	Newcastle disease virus	Tobacco	0.5%TSP	NR
<i>Adjuvant</i> EDA (Extra domain A-fibronectin)	Mouse	Tobacco	2% TCP	Retain proinflammatory properties

<sup>a</sup> Synthetic genes with plastid-optimized codon usage.

<sup>b</sup> Not reported.



### 3. 경구용 백신의 임상실험 현황

현재까지 개발된 식물유래의 경구용 백신의 효능입증을 위한 임상실험이 진행 중이다. 동물 질병 이외에도 사람의 질병에 대해 다양한 식물유래의 경구백신이 동시다발적으로 진행되고 있으며, 질병의 원인 또한 바이러스, 세균 및 제1형 당뇨 치료용 등 다양하다.

	Vaccine antigen	Disease	Expression system	Expression level	Immunological investigation	
Viral antigens	HPV-16 L1 VLPs	HPV (자궁경부암)	Tobacco	1.5~26% TSP	Y	
	Potato virus X coat protein (CP) fused with HPV-16 E7 onco protein (E7-CP)	HPV (자궁경부암)	Tobacco	0.5% TSP	N	2008-2011
	Vaccinia virus envelope protein	Small pox (천연두)	Tobacco	18% TSP	N	2009
	Hepatitis E or C virus	Hepatitis (간염)	Tobacco	1.09 ng/μg TSP	Y	2006-2010
	Rotavirus (VP6)	Diarrhoea (설사병)	Tobacco	3% TSP	Y	2004
	Epstein-Barr virus (VCA)	전염성 단핵증, T-림프종, 위암, 상피암	Tobacco	0.002~0.004% TSP	N	2006
	HIV	AIDS (면역결핍증)	Tobacco, Tomato	2.5~40% TSP	1Y, 5N	2001
Bacterial antigens	CTB	Cholera (콜레라)	Tobacco, Lettuce	6.1~31.1%	Y	2004-2010
	CTB fused with fibronectin-binding domain (D2) of Staphylococcus aureus (CTB-D2)	Skin infections, Bacteremia (피부감염, 패혈증)	Chlamydomonas	23% TSP	Y	2010
	E. coli	Diarrhoea, Colera	Tobacco	2.3~3.7% TSP	Y	2003-2009
	LTB fused with Hemagglutinin-neuraminidase neutralizing epitope (LTB-HNE)	Diarrhoea, Newcastle disease	Tobacco	0.5% TSP	Y	2009
	Tetanus toxin fragment C (Tet C)	Tetanus (파상풍)	Tobacco	10~25% TSP	Y	20,032,005
	Anthrax protective antigen (pA)	Anthrax (탄저병)	Tobacco, lettuce	14.2~29% TSP, 22% TSP	2Y, 1N	2004, 2005
	Borrelia burgdorferi outer surface lipoprotein A	Lyme disease (라임병)	Tobacco	10% TSP	Y	2006
	Yersinia pestis F1-V antigen	Plague (흑사병)	Tobacco	14.8% TSP	Y	2008
	Multi-epitope DPT fusion protein	Diphtheria, Pertussis, Tetanus (파상풍)	Tobacco	0.8% TSP	Y	2009
	Fibronectin extra domain A	Adjuvant (보조제)	Tobacco	2% TCP	Y	2010

	Vaccine antigen	Disease	Expression system	Expression level	Immunological investigation	
Protozoan antigens	Gal/Gal lectin of entamoeba histolytica (LecA)	Amoebiasis (아메바 감염증)	Tobacco	6.3% TSP	Y	2007
	CTB-AMA1 and CTB-MSP1	Malaria (말라리아)	Tobacco, Lettuce	10.1~13.2% TSP, 2.5 TSP	Y	2010
Autoantigens	Cholera toxin B-proinsulin fusion protein (CTB-Pins)	Diabetes type 1 (제1형 당뇨)	Tobacco, Lettuce	10.1~13.2% TSP, 2.5 TSP	Y	2007
	Cholera toxin B-proinsulin fusion protein (CTB-Pins)	Diabetes type 1 (제1형 당뇨)	Tobacco, Lettuce	72% TLP, 24% TLP	N	2010
	Glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65)	Diabetes type 1 (제1형 당뇨)	chlamydomonas	0.3% TSP	Y	2008

#### 4. 어류 면역원성 테스트

최근의 연구결과들 (Hedfors 등, 2012; Rombout 등, 2011)을 살펴보면 아직도 어류의 면역시스템에 대한 이해가 완전하지 않아 어류의 항체 class 및 chemokine, cytokine 등에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 현재도 능성어류의 면역체계에 대해서는 확실한 자료가 없는 상황이어서 앞으로도 immunoglobulin의 class 규명이나 장관면역계를 이해하는데 어느 정도 시간이 소요되리라 보인다.

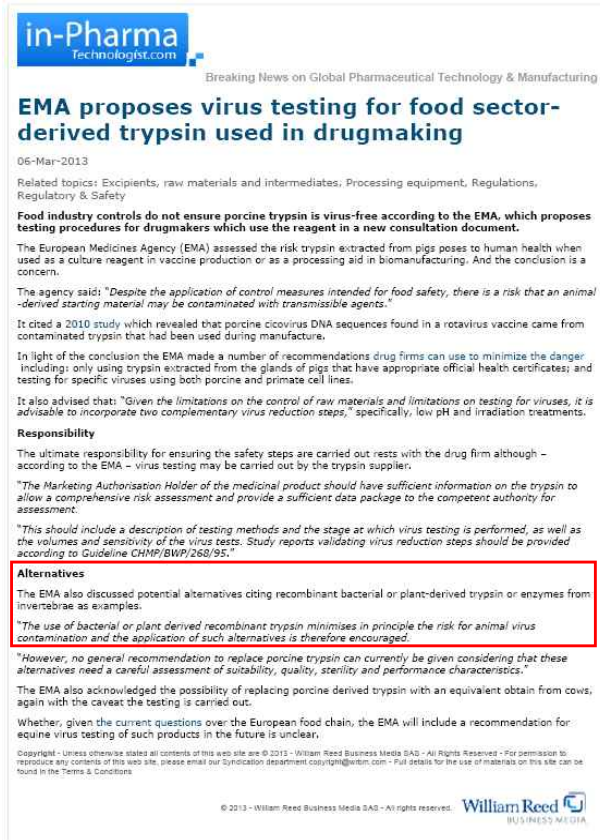
집단면역을 할 수 밖에 없는 양식어류의 성격상 주사를 통한 개별면역은 그 한계가 여실히 드러나 있어서 결국 침지 및 경구 투여를 통한 immunization 만이 양식 어류의 예방에 대한 필요충분조건이 될 것으로 보인다. 이중에서도 특히 경구 투여를 통한 immunization은 세계적으로 선두그룹에 속한 연구팀에 의해 이루어지는 연구들이며 그 연구팀 중에서도 한국은 어류의 경구 투여를 통한 면역에 관해서 선두를 달리는 그룹임에 의심할 바가 없다 (Seo 등, 2013; Shin 등, 2013).

#### 5. 분자농업 관련 해외과학기술 수집

최근에는 animal free 컨셉이 대세가 되면서 식물유래 단백질의 상용화에 기업의 투자가 활발해지고 있으며, 미국 PEPROTECH(<https://www.peprotech.com/en-US/Pages/default.aspx>)사는 animal free 컨셉으로 식물유래 사이토카인의 판매에 돌입하였으며, 스웨덴 Agrenvec (<http://agrenvec.com/>)사 또한 2012년부터 식물유래 고부가가치 재조합 단백질의 시판을 시작하였다.

국내외적으로 biosimilar라 부르는 단백질 의약품을 만들고자 하는 강력한 흐름이 나타나고 있으며, 특히 고부가가치의 의약품에 대한 특허가 만료됨으로 인하여 더 값싸게 단백질을 생산하기 위한 방법에 대한 수요가 급격히 증가되고 있다. 이러한 흐름에서 식물에서 biosimilar와 같은 의료용 단백질 뿐만 아니라 식품용 및 산업용 단백질을 저비용으로 대량으로 생산하기 위한 기술은 biotech의 가장 중요한 핵심 기술 중의 하나일 것이다.

유럽 의약품청 (European Medicines Agency)은 돼지유래 트립신을 이용하여 생산한 의약품에서 돼지 쉼코바이러스의 DNA가 검출됨에 따라 향후 돼지유래 트립신의 사용을 금지하는 방안을 마련하여 현재 의견수렴 중에 있으며, 유럽의약품청은 돼지유래 트립신을 대신할 제품으로 식물에서 생산한 재조합 트립신의 사용을 제시하고 있는 상황이다.



좌 문서의 적색부분 확대:

### Alternatives

The EMA also discussed potential alternatives citing recombinant bacterial or plant-derived trypsin or enzymes from invertebrates as examples.

“The use of bacterial or **plant derived recombinant trypsin** minimises in principle the risk for animal virus contamination and the application of such alternatives is therefore encouraged.

< 돼지유래 트립신의 의약용으로 사용에 대한 유럽의약품청(European Medicines Agency)의 견해 >

Draft guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products

Email Help

**Document details**

<b>Download document</b>	Draft guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products
<b>Reference number</b>	EMA/CHMP/BWP/814397/2011
<b>Status</b>	draft: consultation open
<b>First published</b>	01/03/2013
<b>Last updated</b>	01/03/2013
<b>Consultation start date</b>	01/03/2013
<b>Consultation end date</b>	31/08/2013
<b>Email address for submissions</b>	<a href="mailto:ana.trullas@ema.europa.eu">ana.trullas@ema.europa.eu</a>

**Summary**

This guideline describes the information to be considered by the manufacturer of human biological medicinal products using porcine trypsin.

< 유럽의약품청(European Medicines Agency)이 공개하고 현재 의견수렴 중인 돼지유래 트립신의 의약용으로 사용에 대한 가이드라인(안). 자료출처: <http://www.ema.europa.eu> >

이전 연구들에서 M cell의 기원에 대해 여러 가설이 있었으나 더 많은 연구들이 요구되어왔다. 최근 알려진 Lgr5<sup>+</sup> stem cells의 단독 분리 및 in vitro crypt-villus 구조 형성이 확인되었으며, RankL 처리에 따라 M cell 분화 유도 및 in vitro miniguts의 구조 형성이 확인됨에 따라 새로운 M cell 분화 방법이 제시되었다. 최근 Lgr5<sup>+</sup> stem cell 이외 Intestinal stem cells을 surface markers를 이용하여 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>lo</sup>CD166<sup>+</sup>GPR<sup>10/-</sup>ckit<sup>-</sup> single cell로 분리 방법이 제안되었으며 M cell을 제외한 여러 type의 cell로 분화 유도됨이 확인되었다. 따라서, 기존의 M-like cell culture model을 이용한 방법 이외에, intestinal stem cells로 부터의 M cell 분화 유도 및 특성 연구의 가능성이 제시되고 있다.

#### 6. 식물에서 생산된 고세병 치료 효소(Elelyso)의 시장진출

2009년 12월 이스라엘의 Protalix Biotherapeutics사는 당근 세포배양을 통해 생산한 고세병(Gaucher's Disease) 치료 효소(glucocerebrosidase)인 taliglucerase alpha를 이용하여 환자들을 대상으로 실시한 단계 III 임상실험에서 매우 긍정적인 결과를 얻게 되었다. 세계 최대 규모의 다국적 제약회사인 Pfizer와 Protalix Biotherapeutics는 2009년 12월 1일에 식물 세포에서 발현된 glucocerebrosidase인 taliglucerase alfa를 고세병(Gaucher's Disease) 치료제로 개발하고 상용화하여 Pfizer가 taliglucerase alfa의 판매에 대한 전세계 독점 특허사용 권한을 가지고 Protalix Biotherapeutics는 이스라엘에서 독점적인 상업화 권리를 가지게 된다는 계약 체결하였다. Pfizer는 Protalix Biotherapeutics에 6천만 달러(600억 원)의 초기 계약금을 지불하고, Protalix Biotherapeutics는 최대 5천5백만 달러(550억 원)의 규제 마일스톤 지불금(regulatory milestone payments)을 받을 수 있게 되고, Pfizer와 Protalix Biotherapeutics는 각각 6:4의 비율로 taliglucerase alfa(당근세포 유래 glucocerebrosidase)의 개발 및 상품화를 위한 지출과 미래의 수익을 공유하기로 계약하였다. 2012년 5월에 Pfizer와 Protalix Biotherapeutics가 type 1 고세병 성인 환자들의 효소 교환 치료용 주사제로 개발한 Elelyso가 FDA의 승인을 받음으로써 세 번째 고세병 효소 치료제가 미국에서 판매될 수 있게 되었다. Elelyso의 연간 환자 당 치료비용은 \$150,000로 책정되었고 이것은 Cerezyme의 \$200,000와 Vpriv의 \$170,000에 비해 각각 25% 및 12% 낮은 가격이다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

### 제 1절 연구시설, 장비 구입 및 관리 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)
전북대학교	LMO 식물재배 시설	온실	1	2012. 11.30	300,000,00 0		전북대학교
전북대학교	초저온냉장 고	JP/CLN-50 CW	1	2009. 11.13	16,500,000		전북대학교
전북대학교	진탕배양기	DF-94S	2	2011.7.14	7,480,000	두리과학	전북대학교
(주)젠닥스	식물생장실	자동제어 광독립 식물생장실 (개발장비)	1	2011.09.08	23,540,000	고려과학 (055-759-7023)	(주)젠닥스 연구소
(주)젠닥스	형광현미경 및 카메라	SET (Vright Microscope DM2500)	1	2010.10.15	42,900,000	(주)비엠에스 대전지사 (042-824-7000)	(주)젠닥스 연구소
(주)젠닥스	원심분리기	75003237 (Sorvall microcentri fuge Model Pico)	1	2010.03.04	1,980,000	신한바로테크 (042-822-7252)	(주)젠닥스 연구소

## 제 8 장 참고문헌

- Aalberse, R.C., Koshte, V. and Clemens, J.G. (1981) Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol* 68, 356-364.
- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100: 551-560.
- Agren LC, Ekman L, Lowenadler B, Lycke NY. (1997) Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J. Immunol.* 158, 3936-3946.
- Altmann, F. (2007) The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 142, 99-115.
- Artis D. (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 411-420.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. (2011). Induction of colonic regulatory T cell by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337-341.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2002) Short protocols in molecular biology. 5th ed. New York: John Wiley & Sons
- Aviezer, D., Brill-Almon, E., Shaaltiel, Y., Hashmueli, S., Bartfeld, D., Mizrachi, S., Liberman, Y., Freeman, A., Zimran, A. and Galun, E. (2009) A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme - A preclinical and phase I investigation. *PLoS ONE* 4.
- Bae, W., Lee, Y. J., Kim, D. H., Lee, J., Kim, S., Sohn, E. J., and Hwang, I. (2008). AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. *Nature Cell Biol.* 10, 220-227.
- Balch, W.E., Kahn, R.A., and Schwaninger, R. (1992). ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi compartment. *J Biol Chem* 267, 13053-13061.
- Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L. and Lerouge, P. (2003) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* 13, 427-434.



- Bethke PC, and Jones RL. (2000) Vacuoles and prevacuolar compartments. *Curr Opin Plant Biol* 3:469-475.
- Bhushan, S., Lefebvre, B., St?hl, A., Wright, S.J., Bruce, B.D., Boutry, M., and Glaser, E. (2003) Dual targeting and function of a protease in mitochondria and chloroplasts. *EMBO Rep.* 4:1073-1078.
- Blais M, Seidman EG, Asselin C. (2007) Dual effect of butyrate on IL-1 $\beta$ -mediated intestinal epithelial cell inflammatory response. *DNA Cell Biol.* 26, 133-147.
- Bosmann M, Haggadone MD, Hemmila MR, Zetoune FS, Sarma JV, Ward PA. (2012) Complement activation product C5a is a selective suppressor of TLR4-induced, but not TLR3-induced, production of IL-27(p28) from macrophages. *J. Immunol.* 188, 5086-5093.
- Bruce, B.D. (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol* 10, 440-447.
- Bucci, C., Chiariello, M., Lattero, D., Maiorano, M., and Bruni, C.B. (1999) Interaction cloning and characterization of the cDNA encoding the human prenylated rab acceptor (PRA1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258:657-662.
- Caipang CMA, Hirono I, Aoki T (2006) Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major*. *Fish Shellfish Immunol* 20:596-609
- Calero, M., and Collins, R.N. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* Pral1p/Yip3p interacts with Yip1p and Rab proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:676-681.
- Castilho, A., Strasser, R., Stadlmann, J., Grass, J., Jez, J., Gattinger, P., Kunert, R., Quendler, H., Pabst, M., Leonard, R., Altmann, F. and Steinkellner, H. (2010) In planta protein sialylation through overexpression of the respective mammalian pathway. *J Biol Chem* 285, 15923-15930.
- Cerutti A, Chen K, Chorny A. (2011) Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 273-293.
- Chiba S, Nagai T, Hayashi T, Baba Y, Nagai S, Koyasu S. (2011) Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches in vivo. *Microbiol. Immunol.* 55, 123-129.
- Chou, M.L., Fitzpatrick, L.M., Tu, S.L., Budziszewski, G., Potter-Lewis, S., Akita, M., Levin, J.Z., Keegstra, K., and Li, H.M. (2003). Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J.* 22(12):2970-80.

- Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cell. *Infect. Immun.* 66, 1237-1243.
- Corr SC, Gahan CC, Hill C. (2008) M-cell: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 2-12.
- Cox, K.M., Sterling, J.D., Regan, J.T., Gasdaska, J.R., Frantz, K.K., Peele, C.G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., Cuisin, S., Cardarelli, P.M. and Dickey, L.F. (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat Biotechnol* 24, 1591-1597.
- Crotty S. (2011) Follicular helper CD4 T cell (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621-63.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M., and Cassel, D. (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* 270, 1999-2002.
- Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, Hancock RE, Speert DP. (2004) The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol.* 172, 1146-1156.
- Deshane J, Chaplin DD. (2010) Follicular dendritic cell makes environmental sense. *Immunity* 33, 2-4.
- D'Souza G, Kreimer AR (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 356(19): 1944-1956
- D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 347-358.
- Durocher, Y. and Butler, M. (2009) Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 20, 700-707.
- Fanata, W.I., Lee, K.H., Son, B.H., Yoo, J.Y., Harmoko, R., Ko, K.S., Ramasamy, N.K., Kim, K.H., Oh, D.B., Jung, H.S., Kim, J.Y., Lee, S.Y. and Lee, K.O. (2013) N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in *Oryza sativa*. *Plant J* 73, 966-979.
- Faye, L., Boulaflois, A., Benchabane, M., Gomord, V. and Michaud, D. (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 23, 1770-1778.
- Figueroa, C., Taylor, J., and Vojtek, A.B. (2001) Prenylated Rab acceptor protein is a receptor for prenylated small GTPases. *J. Biol. Chem.* 276: 28219-28225.

- Fischer, R. and Emans, N. (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* 9, 279-299; discussion 277.
- Fischer, R., Schumann, D., Zimmermann, S., Drossard, J., Sack, M. and Schillberg, S. (1999) Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur J Biochem* 262, 810-816.
- Frerichs GN, Rodger HD, Peric Z (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J Gen Virol.* 72:2537-2539
- Gebauer F, Hentze MW. (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(10):827-35. Review.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. and Carter, A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 18, 1151-1155.
- Gomord, V. and Faye, L. (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 7, 171-181.
- Gohda M, Kunisawa J, Miura F, Kagiya Y, Kurashima Y, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, Kiyono H. (2008) Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *J. Immunol.* 180, 5335-5343.
- Gomez DK, Baeck GW, Kim JH, Choresca CH Jr, Park SC (2008) Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. *J Vet Diagn Invest* . 20:38-44
- Hajishengallis G, Lambris JD. (2010) Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol.* 31, 154-163.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A (2006) Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 367:1247-1255
- Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, Ohno H. (2009) Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cell initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226-230.
- Hase K, Murakami M, Iimura M, Cole SP, Horibe Y, Ohtake T, Obonyo M, Gallo RL, Eckmann L, Kagnoff MF. (2003). Expression of LL-37 by human gastric epithelial cell as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 125, 1613-1625.

- He, X., Galpin, J.D., Tropak, M.B., Mahuran, D., Haselhorst, T., von Itzstein, M., Kolarich, D., Packer, N.H., Miao, Y., Jiang, L., Grabowski, G.A., Clarke, L.A. and Kermode, A.R. (2012) Production of active human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complex-glycan-deficient (cgl) plants. *Glycobiology* 22, 492-503.
- Hedfors IA, Bakke H, Skjødtt K, Grimholt U (2012) Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.* 33:1199-206
- Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342, 76-78.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. (2009) Induction of intestinal Th17 cell by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498.
- Iwasaki A. (2007) Mucosal dendritic cell. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 381-418.
- Jin, C., Altmann, F., Strasser, R., Mach, L., Schahs, M., Kunert, R., Rademacher, T., Gloszl, J. and Steinkellner, H. (2008) A plant-derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. *Glycobiology* 18, 235-241.
- Jones BD, Ghori N, Falkow S. (1994) *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cell of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180, 15-23.
- Jung C., Lee, G.-J., Jang, M., Lee, M., Lee, J., Kang, H., Sohn, E.J., Hwang, I. (2011b) Identification of Sorting Motifs of At $\beta$ Fruct4 for Trafficking from the ER to the Vacuole Through the Golgi and PVC Jung, C., *Traffic* 12,1774-1792.
- Jung CJ, Lee MH, Min MK, Hwang I. (2011a) Localization and trafficking of an isoform of the AtPRA1 family to the Golgi apparatus depend on both N- and C-terminal sequence motifs. *Traffic.* 12:185-200.
- Kanaji, S., Iwahashi, J., Kida, Y., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2000). Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 151, 277-288.
- Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. (1997) Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cell that transport bacteria. *Science* 277, 949-952.
- Kim Y, Lee G, Jeon E, Sohn EJ, Lee Y, Kang H, Lee DW, Kim DH, Hwang I. (2014) The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced

- effect on the translational efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 42(1):485–98.
- Kozak M, Shatkin AJ. (1977) Sequences and properties of two ribosome binding sites from the small size class of reovirus messenger RNA. *J Biol Chem.* 10;252(19):6895–908.
- Kuolee R, Chen W. (2008) M cell-targeted delivery of vaccines and therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5, 693–702.
- Lamm ME (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51:311–340
- Lee, D.W., Jung, C., and Hwang, I. (2013) Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *Biochim Biophys Acta.* 1833(2):245–52.
- Lee DW, Kim JK, Lee S, Choi S, Kim S, Hwang I. (2008) *Arabidopsis* nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *Plant Cell.*20:1603–1622.
- Lee, D.W., Lee, S., Lee, G.-J., Lee, K.-H., and Hwang, I. (2006) Functional characterization of sequence motifs in the transit peptide of RbcS. *Plant Physiol.*140:466–483.
- Lee, J., Lee, H., Kim, J., Lee, S., Kim, D. H., Kim, S., and Hwang, I. (2011). Both the hydrophobicity and a positively charged region flanking the C-terminal region of the transmembrane domain of signal-anchored proteins play critical roles in determining their targeting specificity to the endoplasmic reticulum or endosymbiotic organelles in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 23, 1588–1607.
- Lee, K.H., Kim, S.J., Lee, Y.J., Jin, J.B., and Hwang, I. (2003). The M domain of atToc159 plays an essential role in the import of proteins into chloroplasts and chloroplast biogenesis. *J Biol Chem.* 278:36794–36805.
- Lee, M.H., Jung, C., Lee, J., Kim, S.Y., Lee, Y., Hwang, I. (2011b) An *Arabidopsis* prenylated Rab acceptor 1 isoform, AtPRA1.B6, displays differential inhibitory effects on anterograde trafficking of proteins at the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 157,645–658.
- Lee MS, Kim YJ. (2007) Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 447–480.
- Lee, S., Lee, D.W., Yoo, Y.-J., Duncan, D., Oh, Y.J., Lee, Y., Lee, G., Whelan, J., and Hwang, I. (2012) Mitochondrial targeting of the *Arabidopsis* F1-ATPase  $\gamma$ -subunit via multiple compensatory and synergistic presequence motifs. *Plant Cell* 24:5037–5057.
- Lee, Y. J., Kim, D. H., Kim, Y. W., and Hwang, I. (2001). Identification of a signal that distinguishes between the chloroplast outer envelope membrane and the endomembrane

system in vivo. *Plant Cell* 13, 2175-2190.

- Lee, Y. J., Sohn, E. J., Lee, K. H., Lee, D. W., and Hwang, I. (2004). The transmembrane domain of AtToc64 and its C-terminal lysine-rich flanking region are targeting signals to the chloroplast outer envelope membrane [correction], *Mol Cells* 17, 281-291.
- Ma, J.K., Barros, E., Bock, R., Christou, P., Dale, P.J., Dix, P.J., Fischer, R., Irwin, J., Mahoney, R., Pezzotti, M., Schillberg, S., Sparrow, P., Stoger, E. and Twyman, R.M. (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep* 6, 593-599.
- Ma, J.K., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. and Lehner, T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268, 716-719.
- Mason, H.S., Lam, D.M.K. and Arntzen, C.J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 11745-11749.
- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620-625.
- Min, M.K., Jang, M., Lee, M., Lee, J., Song, K., Lee, Y., Hur, M.-W., Robinson, D.G., and Hwang, I. (2013) Recruitment of Arf1-GDP to Golgi by Glo3p-type ArfGAPs is crucial for Golgi maintenance and plant growth. *Plant Physiol.* 161:676-691.
- Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, Senman B, Otipoby KL, Yokota A, Takeuchi H, Ricciardi-Castagnoli P, Rajewsky K, Adams DH, von Andrian UH. (2006) Generation of gut-homing IgA-secreting B cell by intestinal dendritic cell. *Science* 314, 1157-1160.
- Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. (2012) Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cell as an invasive receptor. *J. Immunol.* 189, 1540-1544.
- Neutra MR, Pringault E and Kraehenbuhl JP (1996) Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 14:275-300
- Nunzia Scottia, M. Manuela Riganob, Teodoro Cardi (2012) Production of foreign proteins using plastid transformation. *Biotechnol Adv.* 30(2):387-97
- Obata T, Goto Y, Kunisawa J, Sato S, Sakamoto M, Setoyama H, Matsuki T, Nonaka K, Shibata N, Gohda M, Kagiya Y, Nochi T, Yuki Y, Fukuyama Y, Mukai A, Shinzaki S, Fujihashi K, Sasakawa C, Iijima H, Goto M, Umesaki Y, Benno Y, Kiyono H. (2010). Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and



- share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 7419-7424.
- Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S. and Reddy, S.V. (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv* 29, 210-222.
- Ogra PL. (2003) Mucosal immunity: some historical perspective on host-pathogen interactions and implications for mucosal vaccines. *Immunol. Cell Biol.* 81, 23-33.
- Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. (2012) New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30, 142-154.
- Paliard X, Liu Y, Wagner R, Wolf H, Baenziger J and Walker CM (2000) Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:273-282
- Ramirez, N., Ayala, M., Lorenzo, D., Palenzuela, D., Herrera, L., Doreste, V., Perez, M., Gavilond, J.V. and Oramas, P. (2002) Expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for the hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res* 11, 61-64.
- Rapaport, D. (2003). Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep* 4, 948-952.
- Rhee JW, Kim D, Park BK, Kwon S, Cho S, Lee I, Park MS, Seo JN, Kim YS, Choi HS, Lee Y and Kwon HJ (2012) Immunization with a hemagglutinin-derived synthetic peptide formulated with a CpG-DNA-liposome complex induced protection against lethal influenza virus infection in mice. *PLoS One* 7, e48750
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol.* 18: 1167-1171
- Rombout JH, Abelli L, Picchietti S, Scapigliati G, Kiron V (2011) Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 31:616-626
- RUMA guidelines (2006) Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. Supported by the National Office of Animal Health (NOAH)
- Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO (2011) Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol.* 35:1346-1365
- Schirmbeck R, Bohm W, Reimann J (1996) Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen. *Intervirology.* 39(1-2): 111-119

- Schmitz, J., Poll, L.W. and vom Dahl, S. (2007) Therapy of adult Gaucher disease. *Haematologica* 92, 148-152.
- Schwarz, F. and Aebi, M. (2011) Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 21, 576-582.
- Seo JY, Chung HJ, Kim TJ (2013) Codon-optimized expression of fish iridovirus capsid protein in yeast and its application as an oral vaccine candidate. *J Fish Dis.* 36:763-768
- Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., Dym, O., Boldin-Adamsky, S.A., Silman, I., Sussman, J.L., Futerman, A.H. and Aviezer, D. (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J* 5, 579-590.
- Schauber J, Svanholm C, Termen S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W, Melcher R, Agerberth B, Luhrs H, Gudmundsson GH. (2003). Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 52, 735-741.
- Shin YJ, Kwon TH, Seo JY, Kim TJ (2013) Oral immunization of fish against iridovirus infection using recombinant antigen produced from rice callus. *Vaccine.* 31:5210-5215
- Sohn EJ, Kim ES, Zhao M, Kim SJ, Kim H, Kim YW, Lee YJ, Hillmer S, Sohn U, Jiang LW, and Hwang I. (2003) Rha1, an Arabidopsis Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *Plant Cell* 15:1057-1070.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* 20;136(4):731-45. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.042. Review.
- Song K, Jang M, Kim SY, Lee G, Lee GJ, Kim D, Cho W, Hwang I. (2012) An A/ENTH domain-containing protein functions as adaptor for clathrin-coated vesicles on the growing cell plate in Arabidopsis root cells. *Plant Physiol.* 159:1013-1025.
- Sola, R.J. and Griebenow, K. (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci* 98, 1223-1245.
- Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glossl, J. and Steinkellner, H. (2004) Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose. *FEBS Lett* 561, 132-136.
- Strasser, R., Stadlmann, J., Schahs, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., Glossl, J., Weterings, K., Pabst, M. and Steinkellner, H. (2008) Generation of glyco-engineered Nicotiana benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous

- human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnol J* 6, 392-402.
- Strugnell RA, Wijburg OL. (2010) The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 656-667.
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial-antigen delivered in transgenic potato. *Nat Med.* 4:607-609
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM and Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *The Journal of infectious diseases* 182:302-305
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv.*27(4):449-467
- Toranzo AE, Romalde JL, Magariños B, Barja JL (2009) Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Opinions Méditerranéennes, A* 86:155-176
- van der Velden, A.W. and Thomas, A.A. (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 87-106.
- van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J.P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L. and Lerouge, P. (2000) Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 275, 11451-11458.
- Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. and Fischer, R. (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11128-11133.
- Victoria GD, Nussenzweig MC. 2012. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429-57
- Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK.. (2013). The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu. Rev. Pathol.* 8, 477-512.
- Vitale A, and Chrispeels MJ. (1992) Sorting of proteins to the vacuoles of plant cells. *Bioessays* 14:151-160.
- Waizenegger, T., Stan, T., Neupert, W., and Rapaport, D. (2003). Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem* 278, 42064-42071.
- Walsh, G. (2010a) Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 28, 917-924.

- Walsh, G. (2010b) Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today* 15, 773-780.
- Wegrzyn, R. D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C., and Deuerling, E. (2006). A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J. Biol. Chem.* 281, 2847-2857.
- Wild, K., Halic, M., Sinning, I., and Beckmann, R. (2004) SRP meets the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1049-1053.
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S. and Gray, N.K. (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci*, 28, 182-188.
- Yang YH, Wu WK, Tai EK, Wong HP, Lam EK, So WH, Shin VY, Cho CH. (2006). The cationic host defense peptide rCRAMP promotes gastric ulcer healing in rats. *J. Pharm. Exp. Ther.* 318, 547-554.
- Yuki Y, Kiyono H (2003) New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol.* 13:293-310
- Zhang, X.P., and Glaser, E. (2002). Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7(1):14-21.