

발간등록번호

11-1543000-000853-01

**버섯 자실체 원기 형성 관련 단백질의 분비서열을
이용한 고부가 유용단백질 생산시스템개발 및 기능성
강화 품종개량**

**Development of productive system for higher value-added and
useful proteins using target sequence of fruiting body
primordium-related proteins in mushroom and Breeding of
functionality-enriched strain**

대구대학교 생명환경대학

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “버섯 자실체 원기 형성 관련 단백질의 분비서열을 이용한 고부가 유용단백질 생산시스템개발 및 기능성 강화 품종개량 ” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 01 월 26 일

주관연구기관명 : 대구대학교

주관연구책임자 : 최 장 원

세부연구책임자 : 최 장 원

연 구 원 : 김 준 근

연 구 원 : 박 석 중

연 구 원 : 금 도 란

연 구 원 : 우 연 정

연 구 원 : 이 승 우

연 구 원 : 정 월 례

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 박 희 성

연 구 원 : 이 민 구

연 구 원 : 오 지 민

연 구 원 : 윤 소 정

연 구 원 : 이 호 창

참 여 기 관 명 : (주)새롬바이오

참여기관책임자 : 배 송 환

연 구 원 : 박 민 주

연 구 원 : 송 치 현

연 구 원 : 지 보 미

연 구 원 : 최 양 미

요 약 문

I. 제 목

버섯 자실체 원기 형성 관련 단백질의 분비서열을 이용한 고부가 유용단백질 생산시스템 개발 및 기능성 강화 품종개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

: 본 연구개발의 목적은 영양학적 가치 및 경제성이 높은 새송이 버섯을 이용하여 단백질 대량생산의 공장 시스템을 개발하여 고부가가치 창출 및 바이오시밀러 시대를 대비한 산업화의 의학소재 원료를 제공하려 함이고, 또 다른 목적으로서 기능성이 강화된 새로운 새송이 품종을 개발하여 FTA 시장개방에 따른 국내 시장의 보호 및 GMO 규제 완화에 의한 방어적 개념의 특허를 선점하고 미래 시장의 잠재성에 대비한 신품종 개발의 원천 기술력을 확보하려 함이다.

1. 연구개발의 목적

가. 버섯 원기형성 관련 단백질 분비서열을 이용한 유용 단백질 생산 시스템 개발

- (1) 자실체 원기형성 관련 단백질의 특성 및 기능 분석
- (2) 원기형성 관련 단백질의 유전자 분리 및 특성 분석
- (3) 원기내 발현 단백질 유전자를 (promoter & target sequence) 이용한 발현 및 분비 벡터 시스템 개발
- (4) 발현 및 분비 vector로 유용유전자 도입 및 형질전환
- (5) 원기(primordium) 및 균사체 내 단백질 생산 시스템 구축
- (6) 균사체 대량배양에 의한 단백질 분비 및 원기 수집에 의한 단백질 정제 과정의 용이성 확립
- (7) 바이오시밀러 시대 대비 단백질 생산을 위한 버섯 공장화 및 생물학적 활성 검증에 의한 원재료 소재화
- (8) 유용단백질 대량생산에 의한 부가가치 창출 및 산업화 기술 제공

나. 새송이버섯 형질전환법 개발에 의한 기능성 강화 버섯 품종 개량

- (1) 식물 및 fungal 벡터 이용 새송이 버섯 형질전환법 개발
- (2) 색소 및 식용백신 유전자 도입에 의한 형질전환 및 재분화 조건 확립
- (3) 기능성 강화 버섯 신품종 개량 및 대량생산
- (4) 기능성 건강 보조 식품 및 식용백신 개발

2. 연구개발의 필요성

가. 새송이 버섯을 숙주로 사용하여 유용 단백질을 분비 또는 생산하는 시스템 부족

- (1) 버섯 특이적 promoter 및 분비서열에 관한 분자생물학적 연구 필요
- (2) 버섯 이용 유용 단백질 생산 공장화

나. 새송이버섯을 대상으로 형질전환 및 재생, 유전적 및 단백질 발현 연구 관련 체계적 연구가 미진함.

다. 생명산업 기술을 작물 분자유종 분야에 접목시키기 위해서는 버섯에서 형질전환 및 재분화 효율 개선 protocol 개발이 필수적.

라. 원기 (primordium)내 분자생물학적 연구를 통하여 발현분비 시스템 개발 필요

- (1) 단백질 생산시스템 개발에 의한 독자적인 생명산업 기술적 우위 선점 필요.
- (2) 균사체 대량배양에 의한 단백질 분비, 원기 수집에 의한 단백질 정제 과정의 용이성

마. 바이오시밀러 시대를 대비한 복제약(제네릭)을 대량생산 할 수 있는 시스템 개발 필요

- (1) 유용 단백질들의 의약 원료 소재화 필요

바. FTA시장 개방에 대비한 공격방어적 개념의 특허권 및 기술력 확보 (유전자원의 국제적 권익보호) 필요.

사. 부가적 기능이 강화된 품종개발에 의한 신품종 개발 원천 기술력 확보 필요

아. 기능성물질 함유 농작물 개발에 의한 농가소득 증대 및 국민건강 증진 필요성

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용 및 범위

가. 버섯 원기형성 관련 단백질 분비서열을 이용한 유용 단백질 생산 시스템 개발

: 버섯 균사체로부터 자실체 형성 과정에서 필수적인 원기를 구성하고 있는 단백질들을 분석하여 그 단백질들이 원기형성 과정에서 역할 및 관련 기작을 규명하고, 또한 원기형성 단백질의 유전자 프로모터 및 분비서열을 이용하여 유용 단백질들 (EPO, EGF, hGH, CSF, surfactant protein, fibrinolytic enzyme 등)의 발현 및 분비 조절에 미치는 영향을 조사하므로써 궁극적으로 단백질 대량생산의 공장 시스템을 개발하여 고부가가치 창출 및 산업화의 기술을 제공하려 한다.

- (1) 자실체 원기형성 관련 단백질의 특성 및 기능 분석
- (2) 원기형성 관련 단백질의 유전자 분리 및 특성 분석
- (3) 원기내 발현 단백질 유전자를 (promoter & target sequence) 이용한 발현 및 분비 벡터 시스템 개발

- (4) 발현 및 분비 vector로 유용유전자 도입 및 형질전환
- (5) 원기(primordium) 및 균사체 내 단백질 생산 시스템 구축
- (6) 균사체 대량배양에 의한 단백질 분비 및 원기 수집에 의한 단백질 정제 과정의 용이성 확립
- (7) 단백질 생산을 위한 버섯 공장화 및 대량생산 확립
- (8) 생물학적 활성 검증에 의한 의학 원재료 소재화
- (9) 유용단백질 대량생산에 의한 부가가치 창출 및 산업화 기술 제공

나. 새송이버섯 형질전환법 개발에 의한 기능성 강화 버섯 품종 개량

식물 및 fungal 벡터 이용 새송이 버섯 형질전환법을 확립하고 색소유전자 (β -carotenoid, anthocyanin) 및 유용유전자 (HBsAg, GAD)가 도입되어 기능성이 강화된 새로운 새송이 품종을 개발하므로써 FTA 시장개방에 따른 국내 시장의 보호 및 GMO 규제 완화에 의한 방어적 개념의 특허를 선점하고 미래 시장의 잠재성에 대비한 신품종 개발의 원천 기술력을 확보하려함이다.

- (1) 식물 및 fungal 벡터 이용 새송이 버섯 형질전환법 개발
- (2) 색소 유전자 및 유용유전자 (HBsAg, GAD) 도입에 의한 형질전환 및 재분화 조건 확립
- (3) 기능성 강화 버섯 신품종 개량 및 대량생산
- (4) 기능성 강화 건강 보조 식품 개발

IV. 연구개발결과

1. 제 1세부 : 버섯 원기형성 관련 단백질 분비시열을 이용한 유용단백질 생산시스템 개발

가. 새송이 버섯 균사체 형질전환법 확립

버섯 생명공학에서의 필수적 요건은 유전자 도입 수단의 확보이다. 유전자 도입을 위한 형질전환 수단으로서 protoplast 방법 (REMI법), biolistic bombardment, electroporation, *Agrobacterium* 방법 등이 개발되었으나 가장 큰 문제점은 그 효율성 및 재생률이 매우 낮은데 있다. 본 연구에서 균사체 및 자실체 절편을 이용하여 protoplast, electroporation, gene gun, *Agrobacterium* 방법 등을 사용하여 형질전환을 시도하였지만, 최적화 조건을 확립하기가 쉽지 않았다. 따라서 시행착오에 의해 *Agrobacterium*을 이용하여 최적화된 효율로 형질전환체들을 확보하였다.

나. 새송이버섯 cDNA library 제조

새송이버섯 조직에서 분리한 약 500 µg의 total RNA로부터 oligo(dT) cellulose를 사용하여 Molecular cloning 실험 protocol (Maniatis *et al*, Cold Spring Harbor, New York)에 따라 poly(A⁺) cytoplasmic RNA를 추출하였고 λZAP cDNA 합성 kit (Stratagene)를 이용하여 cDNA library (~1 x 10⁸ pfu/ul)를 제조하였다. 형성된 재조합 phage library는 원기 분석을 통하여 확인된 단백질들에 대한 유전자 분리를 위한 gene source 및 PCR 주형으로 사용하였다.

다. 새송이버섯 genomic DNA library 구성

새송이버섯 genomic DNA로부터 λFIXII kit (Stratagene)를 이용하여 genomic library (0.5 x 10⁶ pfu/ul)를 제조하였다. 형성된 genomic DNA library는 원기로부터 확인된 단백질의 genomic DNA 및 promoter 분리, 또는 필요한 부분을 PCR 증폭하기 위한 주형으로 사용하였다.

라. 원기형성 분비물 단백질 (laccase)에 대한 유전자 확보 및 염기서열 분석

새송이버섯 원기 내 존재하는 단백질을 SDS-PAGE와 2-D 의해 분석한 다음 주요 단백질 조각들을 CAF-MALDI sequencing에 의해 분석한 결과 부분 서열 (LPANKL IEVSIPGAGAHFHL HGHTFDIVRVSNSD)을 얻었고 Blast search 결과 laccase로 밝혀졌다. 따라서 laccase 유전자의 염기서열을 참고로 하여 분비벡터 제조에 필요로 하는 laccase promoter (330 bp) 및 laccase 신호서열(69 bp)을 genomic DNA library를 주형으로 사용하여 PCR에 의해 laccase DNA 단편들을 확보하였다.

마. Plant Vector를 이용한 secretion vector 구성

선형적 분비벡터를 구성하기 위하여 CaMV (Cauliflower Mosaic virus) S35 promoter를 갖는 pPEV 벡터에 알려져 있는 신호서열 (pathogenesis-related protein 1b, 102 bp)을 클로닝하여 pPEVPR1b 벡터를 구성하였고, 그 벡터에 human growth hormone 유전자를 도입하여 재조합벡터를 구성한 다음, 새송이버섯 균사체를 이용하여 여러 형질전환 방법에 의해 도입한 결과 Agrobacterium 법에 의해 형질전환체(*Pleurotus eryngii*/pPEVpR1bhGH)를 구성하여, 차후 재조합벡터 구성의 positive control로 사용하였고, 발현되는 단백질을 SDS-PAGE 및 western blot에 의해 확인하였다.

바. Promoter 및 분비서열을 포함하는 발현/분비벡터 구성 및 GFP 발현

Green fluorescent protein (GFP)의 유전자를 reporter gene으로 사용하여 promoter의 strength 및 적합한 분비서열 조합을 조사하기 위하여, CaMV 35S promoter (538 bp), laccase promoter (330 bp), pR1b (pathogen related protein) signal sequence (102 bp),

및 laccase signal sequence (69 bp)등을 사용하여 6 종류의 발현/분비 벡터를 구성하였다 (pCam35S, pCam35SLacS, pCam35SpR1b, pCamLacP, pCamLacPS, pCamLacPpR1b vector). GFP의 세기 및 형질전환 선별의 용이성에 의해 가장 효율적인 vector 시스템으로서 laccase promoter와 laccase 신호서열 및 pR1b 신호서열로 구성된 발현벡터 (pCamLacP, pCamLacPS, pCamLacPpR1b vector)를 선택하였고, 3종류의 발현/분비벡터에 유용유전자 6종류를 도입하여 새송이버섯 재조합 형질전환체 18종을 구성하였다.

사. pCamLacPS에 도입된 유전자들의 발현 : Laccase promoter 및 Laccase 분비서열

발현벡터 pCamLacP에 6 종 유전자가 도입되어 구축한 재조합벡터들(pCamLacPCSF, pCamLacPEGF, pCamLacPEPO, pCamLacPhGH, pCamLacPPLSP3, pCamLacPSPB)을 함유하는 형질전환체들의 경우 어떤 클론에서도 단백질이 합성되지 않았다.

분비벡터 pCamLacPS에 6 종 유전자가 도입되어 구축한 재조합벡터들 pCamLacPSCSF, pCamLacPSEGF, pCamLacPSEPO, pCamLacPShGH, pCamLacPSPLSP3, pCamLacPSSPB)을 함유하는 형질전환체들의 경우 EGF, hGH, PLSP3를 함유하는 클론들에서 단백질이 분비는 되지 않았지만 세포내에서 발현되었고 (균사체내 총 수용성단백질 중 약 3-7%), 항원항체 반응에 의해 각각의 단백질을 확인하였다.

아. pCamLacPpR1b에 도입된 유전자들의 발현 : Laccase promoter 및 pR1b 분비서열

분비벡터 pCamLacPpR1b에 6 종 유전자가 도입되어 구축한 재조합벡터들 pCamLacPpR1bCSF, pCamLacPpR1bEGF, pCamLacPpR1bEPO, pCamLacPpR1bhGH, pCamLacPpR1bPLSP3, pCamLacPpR1bSPB)을 함유하는 형질전환체들의 경우 EGF, hGH를 함유하는 클론들에서 단백질이 분비는 되지 않았지만 세포내에서 발현되었고 (균사체내 총 수용성단백질 중 약 3-5%), 항원항체 반응에 의해 각각의 단백질을 확인하였다.

자. 대량배양에 의한 단백질 발현 패턴 변화

단백질 발현이 확인된 클론들, pCamLacPSEGF, pCamLacPShGH, pCamLacPSPLSP3 pCamLacPpR1bEGF, pCamLacPpR1bhGH)을 함유하는 새송이버섯에서 배양시간에 따른 발현 패턴, wet and dry weight, 발현정도 등을 조사하기 위하여 20 L 배양기 (working vol. 10 L)에서 발효를 진행하였다. 그 결과 pCamLacPShGH 함유하는 형질전환체는 8 일 만에 최대성장에 도달하였고, 균사체의 중량(wet weight)은 38 g, 건조중량은 2.3 g 이었다. 단백질 발현은 배양시간에 비례하여 증가하였고 분석결과 총 수용성단백질의 15% (24 ug hGH/g powder)정도 발현이 되었으며 도입된 유전자도 안정적으로 존재하였다. pCamLacPSEGF 함유하는 형질전환체는 14일 만에 최대성장에 도달하였고 균사

체의 중량(wet weight)은 45.7 g, 건조중량은 2.9 g 이었다. 단백질 발현은 배양시간에 비례하여 증가하였고, 분석결과 총 수용성단백질의 5% 정도 발현이 되었으며 도입된 유전자도 안정적으로 존재하였다. pCamLacPSPLSP 함유하는 형질전환체는 14일 만에 최대성장애 도달하였고 균사체의 중량(wet weight)은 35.5 g, 건조중량은 2.4 g 이었다. 단백질 발현은 배양시간에 비례하여 증가하였고, 분석결과 총 수용성단백질의 5% 정도 발현이 되었으며 도입된 유전자도 안정적으로 존재하였다. pCamLacPpR1bEGF와 pCamLacPpR1bhGH를 함유하는 형질전환체의 경우에도 5-6%정도의 발현정도를 보였으나, pCamLacPS에 도입된 클론들 (pCamLacPSEGF, pCamLacPShGH) 보다는 낮은 수준으로 단백질을 생산하였다.

자. hGH 유전자가 도입된 형질전환체들의 외형적 변화

hGH가 도입된 새송이버섯 균사체와 대조구 새송이버섯 균사체의 성장속도를 비교한 결과 hGH 유전자가 도입된 재조합 균사체 (pCamLacPShGH, pCamLacPpR1bhGH)의 경우 성장속도가 대조구 균사체 보다 대략 6 배 정도 빠른 것으로 나타났다. 이런 결과는 동물유래의 성장호르몬이 식물에서도 작용할 수 있다는 것으로 보여주며, 또한 균사체내에서 생물학적 활성을 갖는 단백질이 합성될 수 있다는 것을 나타낸다. 그러나 균사체에서 자실체를 유도하였을 때는 정상적인 자실체와는 다른 분재형태의 자실체가 형성되는 것으로 확인하였다. 이는 hGH가 균사체의 영양성장에 있어서 성장을 증가에는 좋은 효과를 나타내지만, 자실체로의 생식생장은 저해하는 것으로 보여진다.

차. 형질전환 자실체 분석 : genomic DNA analysis

균사체로부터 유도된 각각의 새송이버섯 자실체내에 존재하는 유전자를 확인하기 위하여 각각의 자실체로부터 genomic DNA를 추출하였고, 각 유전자에 특이적 primer를 이용하여 PCR 한 결과 target gene (CSF, EGF, EPO, hGH, PLSP3, SPB)들의 예상된 DNA 조각들이 증폭되었고 최종적으로는 염기서열 분석에 의해 integration 여부를 하였다. 또한 자실체로부터 후대검정을 위하여 포자 분리 후 균사체 계대배양을 하여 자실체를 재유도 했을 경우에도 새송이버섯 자실체에 각각의 유전자들이 안정하게 존재하는 것으로 확인하였다 (제 2세대 line 구축).

카. 형질전환 자실체들의 전사수준 분석

형질전환된 새송이버섯 자실체에 도입된 유용 유전자의 전사 수준을 조사하기 위하여, 우선 각각의 자실체로부터 total RNA를 추출하고 각 유전자의 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR 방법으로 분석한 결과, 형질전환된 균사체의 자실체에서 각각의 유전자들 (CSF, EGF, EPO, hGH, PLSP3, SPB)의 예상된 크기의 DNA 조각들이 증폭되었고, 최종적으로는 염기서열 분석에 의해 확인하였다. 이런 결과는 각 유전자가 도입된 모든 새

송이버섯 자실체에서 전사수준까지는 정상적으로 RNA가 합성된다는 것을 보여준다.

타. 형질전환 자실체들의 단백질 발현 분석

분비벡터 pCamLacPS에 도입된 3가지 유전자(hGH, PLSP3, EGF)의 재조합 벡터들 (pCamLacPSEGF, pCamLacPShGH, pCamLacPSPLSP3)과 pCamLacPpR1b에 도입된 2가지 유전자(hGH, EGF)의 재조합벡터(pCamLacPpR1bEGF, pCamLacPpR1bhGH)들이 도입된 새송이버섯 자실체로부터 단백질을 추출하여 SDS-PAGE 및 western blot에 의해 확인한 결과, 약 8.8 kD EGF, 23 kD hGH, 27 kD PLSP3 단백질들이 균사체와 동일한 수준으로 자실체에서도 안정적으로 발현되는 것을 확인하였다. 다른 유전자들이 도입된 자실체에서는 전사수준에서 mRNA는 만들어지지만 단백질은 생성되지 않는 것으로 분석되었다. 이는 각 유전자들의 mRNA 5'-말단에 존재하는 서로 다른 이차구조에 의해 단백질 합성에 중요한 영향을 미치는 것으로 분석되었다.

파. 재조합 벡터내 신호서열과 유용유전자 서열의 mRNA 이차구조 분석

5'-말단 mRNA에 존재하는 특이 이차구조에 의해 단백질 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, Zuker (1989)의 RNA secondary prediction (mFOLD) program에 의해 이차구조를 분석하였다. pCamLacPS에 도입된 유전자들의 경우에는 laccase 신호서열 (69 bp)과 각 유전자의 N-말단 20 아미노산 (60 bp)에 해당하는 서열을 분석하였고, pCamLacPpR1b에 도입된 유전자들의 경우에는 pR1B 신호서열 (102 bp)과 각 유전자의 N-말단 20 아미노산 (60 bp)에 해당하는 서열을 분석하였다. 그 결과 전체적인 경향은 발현율이 증가함에 따라 이차구조의 ΔG 값이 + 값으로 증가하는 것으로 나타났고, 단백질 발현이 가장 높은 pCamLacPShGH의 경우 mRNA 이차구조 ΔG 값이 - 13.07 Kcal/mole로 다른 유전자들의 ΔG 값보다 + 쪽으로 가장 높았으며, pCamLacPSEGF (- 15.6 Kcal/mole), pCamLacPSPLSP3 (- 17.7 Kcal/mole) 의 경우에도 흡사한 것으로 나타났다. 또한 pCamLacPpR1bhGH과 pCamLacPpR1bEGF의 경우에도 다른 클론들과 비교해 볼 때, + 값으로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 도입유전자의 5'-말단에 존재하는 이차구조를 제거하는 것이 새송이버섯에서 유용단백질의 발현에 중요한 요소라는 것을 제시하고 있다.

하. *In vitro* (Insulinoma cell)에서 세포 활성 측정

당뇨세포인 RINm5F 세포에서 유용단백질 hGH 및 EGF의 항당뇨효과 및 세포 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pCamLacPShGH와 pCamLacPSEGF를 함유하는 균사체를 배양 배양하여 metal chelating법에 의해 hGH 및 EGF를 부분정제 하였다. 준비된 시료를 일정농도로 RINm5F 세포에 처리하여 세포성장효과와 streptozotocin에 의해

유발된 전 당뇨 (prediabetes) 모델 RINm5F 세포에 처리 후 세포에 미치는 영향을 조사한 결과, hGH 및 EGF는 최대 5~20%의 세포활성 증가 효과를 보였으며, RINm5F의 항당뇨 활성은 hGH의 처리 농도 5 ng/ml에서 약 12% 당뇨 개선 효과를 보였으며, EGF는 1 ng/ml의 농도에서 약 19% 정도 개선되었다. 이런 결과는 hGH와 EGF가 STZ 처리에 의한 1형 당뇨에서 세포독성 및 세포자살에 대한 보호 및 치유 기능을 갖는 후보물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

가. hGH 생물학적 활성 : 사료첨가제

(1) 쥐 (SD rat)를 이용한 생체 내 (in vivo) 실험

발현벡터 pCamLacPShGH를 함유하는 새송이버섯 균사체를 배양하여 2가지 형태의 시료를 제조하였다 (액상 type, p-hGH1 & 2 ; powder 형태, Myc1 & 2).

생체 내에서 재조합 hGH의 성장효과는 사료 첨가제로 제조하여 투여함으로써 쥐의 체중 증가, 생화학적 분석 (지질 수준, 칼슘, ALP, BALP, IGF-1, GH, GHRF), 및 뼈 성장에 대하여 조사하였다. 새송이버섯 균사체를 첨가하지 않은 사료 (negative control)에 비해 재조합 새송이버섯 균사체가 첨가된 액상 그룹과 분말 그룹에서 성장률은 약 3~5% 증가되었고, 총 콜레스테롤 수준은 약 12~15% 감소되었으며, LDL-콜레스테롤은 16-28% 감소, 총 트라이글리세라이드 수준은 약 15~18% 감소되었다. ALP (alkaline phosphatase)의 경우에는 대조구에 비해 15-31%까지 증가하였으며, BALP의 경우에는 29.7-47.5%까지 크게 증가한 것으로 나타났다. 성장관련 인자들은 시험구에서 대조구에 비해 IGF-1은 17-26%정도, rat GH는 28-46% 정도, GHRF는 26-42%로 크게 증가한 것으로 나타났다. 뼈 성장 측정에서 경골 성장판의 경우에도 시험구에서 길이가 대조구보다 약간 증가한 것으로 나타났다. 이런 결과는 pCamLacPShGH 벡터가 도입된 새송이버섯 균사체가 생물학적 활성을 가진 hGH를 생산할 수 있다는 것을 보여주며, 재조합 hGH는 쥐의 성장을 촉진시키는데 효과적인 것으로 나타났다.

(2) 육계농장에서 필드시험

새송이버섯 (pCamLacPShGH 함유) 대량배양에 의해 얻은 균사체에서 metal chelating 방법에 의해 단백질을 회수하여 단백질을 정량한 결과 균사체 그램당 약 600 ug 정도의 hGH를 얻었다. 말분 (wheat flour)을 이용하여 말분 그램당 hGH 농도가 1 ug 되도록 사료첨가제를 제조하였고, 본사료에 0.1% 정도로 투여하였다. 경북 김천에 위치한 육계농장에서 대조구 (10,800수) 및 시험구 (23,500수)에 한달동안 투여한 결과, 출고시 전체중량은 시험구는 36,363 kg (대조구 15,280 kg)이었고, 평균 한수당 체중은 시험구는 1.59 kg으로 대조구 1.45 kg 보다 9.6% 정도 증체 효과를 나타냈다. 일당 체중 증가율은 시험구에서 54.82 g이며 대조구의 경우 42.64 g으로 일당증가율이 28.6% 정도 시험구에서 높게 나타났다. 전체적인 사료요구율 ($FE = \text{total feed intake} / \text{total body}$

weight)은 시험구에서 1.56이었으며, 대조구의 경우 1.77로서 시험구에서 훨씬 좋은 효과를 보이는 것으로 보여진다. 또한 생산지수의 경우 시험구에서는 341.95이며, 대조구에서는 235.16으로 사료첨가제(hGH 포함)를 본 사료에 0.1% 투여한 결과 생산성이 크게 증가한 것으로 나타났다. 그 결과 대조구에서 사육기간도 5일정도 앞 당겨졌고, 사료비 절감 및 부수적인 농가 소득도 증가한 것으로 나타났다.

나. 상피성장인자(epidermal growth factors, EGF) : 화장품 원료

EGF (pCamLacPSEGF) 단백질의 화장품 안정성 측정 : PH, 점도변화, 온도, 자외선에 안정도가 있는 것으로 확인하였음. Patch test를 통한 안전성 실험 : 개발된 원료나 제품을 이용할 때 피부염이 일어나지 않는 것을 확인하기 위해서 간편한 예비 실험으로서 안전성 확인

다. PLSP3 : Semi-quantitative Enzyme Assay

단백질 분해효소 분비능을 간접적으로 알아보기 위하여 protease assay plate (1% skim milk, 0.1% yeast extract, 1.5% agar)에 살균된 paper disc를 올려놓고 추출한 PLSP3 단백질을 점적하여 37°C에서 overnight 배양하여 형성된 clear zone을 확인 한 결과, protease 활성을 갖는 형태로 PLSP3 단백질이 발현되었으며 혈전용해제로서 산업적 활용 가능성을 제시하고 있다.

라. 본 연구에서 구성된 pCamLacPSEGF, pCamLacPShGH, pCamLacPSPLSP3, pCamLacPpR1bEGF, pCamLacPpR1bhGH 재조합백터가 도입된 세송이버섯 균사체는 생물학적 활성을 갖는 재조합 단백질들 (**Human growth hormone, Epidermal growth factor, *Periserrula leucophryna* serine protease**)을 생산할 수 있다는 것을 보여주며, 재조합 hGH는 성장을 촉진시키는 효과. EGF는 세포활성증가, PLSP3는 혈전용해 등에 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 세송이버섯(*Pleurotus eryngii*)을 생물학적 활성을 갖는 유용단백질을 대량 생산할 수 있는 공장시스템으로 활용할 수 있으며, 이런 발현 시스템의 확립에 의해 산업적으로 다양한 유용단백질 생산에 적용될 수 있을 것이다.

2. 협동과제 : 세송이버섯 형질전환법 개발에 의한 기능성 강화 버섯 품종 개량

가. 전체요약

기능성 세송이 품종개발을 위하여 세송이 균사체의 성장촉진을 위한 배양조건, 효율적인 균사체 형질전환 및 선발, 형질전환 균사체의 자실체 생성 유도를 연구하였다. 생장배지에 spent coffee ground (SCG)를 첨가 시 성장속도 및 생체중량 증가가 나타났으

며 flavonoid 및 phenol 함량 그리고 항산화능이 증가하였다. 기타 죽엽이나 겨우살이 첨가도 SCG와 유사한 효과를 보였다. 당근추출액은 감자추출액을 대신하여 균사체 생장을 증대시키는 효과를 보였다. Metal ion은 자실체 발생 개체 수에서의 변화를 일부 야기하였다. 균사체의 형질전환을 위한 *Agrobacterium*의 이용 시 균사체에 간단한 물리적 상해를 가하는 경우에서만 형질전환이 가능하였다. 색소발현 세송이 제조를 위하여 *myb*, *crtO*, PAC (*psy+crtI*) 등의 색소 생합성 관련 유전자를 발현백터에 도입하였으며 *Agrobacterium*을 이용하여 균사체 형질전환체를 제조, 선발 및 확인하고 자실체 생산을 유도하였다. 자실체는 대부분 비정상적 형태를 보였으며 삽입변이에 의한 성장저해가 나타났다. 색소형성은 이루어지지 않았는데 세송이의 색소발현시스템에 대한 보다 세밀한 기초 연구가 필요시 되었다. 식용백신용 세송이 제조를 위하여 hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) 및 glutamic acid decarboxylase (GAD1) 유전자를 균사체에 도입 후 선발된 형질전환체를 mice에 경구 투여 시 간염 항체형성 및 혈당감소를 확인함으로써 형질전환 세송이의 식용백신으로서의 가능성을 확인하였다.

(1) 균사체 성장촉진

커피는 다양한 생리활성물질을 포함하며 커피박 (spent coffee ground: SCG)에도 상당량 잔존한다. SCG를 1-7.5% 첨가 시 세송이를 포함한 여러 다른 종류의 균사체에서 성장 촉진 효과가 나타났다. 고체, 액체 또는 병배양에서 성장 직경, 생체 중량 증가 효과가 확인되었으며 flavonoid나 phenol성분의 증가 및 DPPH 소거능 증가도 나타났다. 천연산물인 죽엽이나 겨우살이등도 0.1 - 2% 첨가 시 SCG와 유사한 효과를 나타냈다. 감자 추출액을 대신한 당근 추출액을 배지에 첨가 시 세송이, 느타리, 맛느타리, 표고, 잎새 등의 균사체 생장이 훨씬 촉진되었으며 자실체 생산 시 단백질과 fiber함량이 증가하는 것으로 나타났다.

(2) 색소발현 세송이

포도의 transcription factor *myb*, β -carotene을 canthaxanthin으로 전환시키는 기능을 지닌 *Haematococcus pluvialis* β -C-4 Oxygenase (*crtO*), carotenoid 생합성관련 고추의 phytoene synthase (*psy*) 및 *Pantoea*의 caroten desaturase (*crtI*)을 지니는 PAC gene을 cloning 및 재조합을 통하여 발현백터에 도입하였다. 이는 *Agrobacterium*을 이용하여 균사체에 도입하고 hygromycin 저항성 선발을 실시하여 형질전환체를 생산하였으며 유전자도입을 PCR, southern blot등으로 확인하였다. 자실체 생산을 유도하였으며 그 결과 형태적으로는 대조군에 비해 대부분 왜소하였으며 T-DNA 삽입변이에 의한 결과로 추측되었다. 색소발현 정도도 대조군과 다르지 않았으며 세송이 색소발현체계에 대한 연구 및 이해가 필요시 되었다. 한편, 각 형질전환 균사체별로 액체배양을 실시 후 수확한 EPS가 SKOV-3 (ovarian cancer cell line)의 세포활성에 미치는 효과를

MTT법에 의하여 분석하였으며 대조군에 비해 차이가 없거나 촉진시키거나 또는 억제하는 경우로 구분됨으로써 기능성 증대 균사체의 제조를 확인할 수 있었다.

(3) 새송이 식용백신

간염바이러스(Hepatitis B virus: HBV)에 대한 식용 vaccine을 제조하기 위하여 HBsAg 유전자를 클로닝하고 발현벡터에 도입하여 pCamHBsAg를 제조하였다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 및 선발 그리고 PCR 및 hybridization을 통한 유전자도입 그리고 ELISA에 의한 단백질 발현정도를 확인하였다. 형질전환 균사체를 BALB/c mice에 경구투여를 실시하고 안와 채혈과 심장채혈을 통하여 간염항체 형성 수준을 측정된 결과 prime+oral/booster+oral 처리에 의하여 간염항체 생성에 관한 면역 반응을 효과적으로 증폭시킴을 알 수 있었다. 경구 투여만으로써 면역원성이 발휘되기 힘들지만 상용백신을 이용한 경우 HBsAg 균사체 기능이 뚜렷한 것을 알 수 있었다.

췌장의 glutamic acid decarboxylase (GAD67)는 인슐린 의존성 당뇨(Insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM)의 발생과 관련되어 있다. GAD67 유전자를 클로닝하고 발현벡터에 도입하여 pCamGAD67을 제조하였다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 및 선발 그리고 PCR 및 hybridization을 통한 유전자도입 그리고 ELISA에 의한 단백질 발현정도를 확인하였다. 형질전환 균사체를 NOD mice에 반복적으로 경구 투여함으로써 혈당 증가가 상당 억제되었으며 인슐린의존성 1형 당뇨의 예방을 위한 식용백신의 효과를 확인할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구논문

본 연구에서 얻어진 직, 간접의 결과들을 이용하여 국내 및 국제 저널에 투고하여 발간되었으며 일부 논문들은 현재 투고 및 준비 중에 있다

가. 국내 논문

- (1) Choi, J. W., D. I. Shin, and H. S. Park. 2012. Enhancement of growth and bioactivity of *Pleurotus eryngii* mycelia by spent coffee ground. *Journal of Agriculture & Life Science*. 46(6), 157-163.

나. 국제논문

- (1) Park, H. S. and J. W. Choi. 2014. Functional expression of bovine growth hormone gene in *Pleurotus eryngii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17, 176-184. (SCIE, IF = 1.224)

2. 학회발표

- (1) M. G. Lee, K. B. Koo and J. W. Choi. 2014. Functional expression of the human growth hormone gene in mycelia of *Pleurotus eryngii*. Annual Meeting of the Korean Society for Plant Biotechnology. "Genome to Phenome in Plants". Daegu, 2014. 10. 30. P1-47

3. 특허

가. 특허 등록

- (1) 커피박을 유효성분으로 함유하는 버섯 균사체 배양 배지 조성물 (Composition of culture medium for mushroom mycelium comprising spent coffee ground) : 출원일자 2012.10.19; 출원번호10-2012-0116338; 등록일자 2014.11.10; 등록번호 10-1462233

나. 특허출원

- (1) 새송이버섯 형질전환용 재조합 벡터 및 이를 이용한 목적단백질 제조방법 (A recombinant vector for transformation of *Pleurotus eryngii* and methods for preparation of target protein using the same) : 출원일자 2013.10.16; 출원번호 10-2013-0123254
- (2) 새송이버섯 분비벡터를 이용한 목적단백질 생산방법 (Production methods of foreign protein using secretion vector in *Pleurotus eryngii*) : 출원일자 2013.10.16; 출원번호 10-2013-0123273
- (3) 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 재조합 분비 벡터 및 이를 이용한 목적단백질 제조방법 (Secretion vector harboring laccase promoter of *Pleurotus eryngii* and methods for preparation of target protein using the same : 출원일자 2013.10.16; 출원번호 10-2013-0123293
- (4) 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 재조합 분비 벡터 및 이를 이용한 표피성장인자 단백질 제조방법 (Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Epidermal Growth Factor Protein Using the Same : 출원일자 2014.12.15; 출원번호 10-2014-0180050

- (5) 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 재조합 분비 벡터 및 이를 이용한 인간 성장호르몬 단백질 제조방법 (Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Human Growth Hormone Protein Using the Same : 출원일자 2014.12.15; 출원번호 10-2014-0180054
- (6) 새송이버섯 형질전환용 재조합 벡터 및 이를 이용한 표피성장인자 단백질 제조방법 (Production Methods of Epidermal Growth Factor Protein using a Vector for Transforming *Pleurotus eryngii*) : 출원일자 2014.12.15; 출원번호 10-2014-0180062
- (7) 새송이버섯 형질전환용 재조합 벡터 및 이를 이용한 인간 성장호르몬 단백질 제조방법 (Production Methods of Human Growth Hormone Protein using a Vector for Transforming *Pleurotus eryngii* : 출원일자 2014.12.15; 출원번호 10-2014-0180064
- (8) 새송이버섯 분비벡터를 이용한 표피성장인자 단백질 생산 방법 (Production Methods of Epidermal Growth Factor Protein Using Secretion Vector in *Pleurotus eryngii* : 출원일자 2014.12.15; 출원번호 10-2014-0180071
- (9) 새송이버섯 분비벡터를 이용한 인간 성장호르몬 단백질 생산 방법(Production Methods of Human Growth Hormone Protein Using Secretion Vector in *Pleurotus eryngii* : 출원일자 2014.12.15; 출원번호 10-2014-0180078

4. 성과활용

가. 기술이전

(1) 대상기업 : (주)그린팜

(2) 기술 :

(가) 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 분비벡터를 이용한 표피 성장인자 단백질 제조방법(출원번호 : 10-2014-0180050)

(나) 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 분비벡터를 이용한 인간 성장 호르몬 단백질 제조방법(출원번호 : 10-2014-0180054)

(3) 기술이전 : 통상실시권 (2년)

(4) 기술료 : 선급기술료 (300 만원) + 경상기술료 (제품판매액의 3%/년)

나. 상품화 및 시제품 제조

- (1) 상품화 : 성장인자(hGH)를 이용한 사료첨가제 개발, 상피성장인자(EGF)를 이용한 피부 재생 화장품 원료 소재 개발 및 혈전용해제를 이용한 건강식품개발 관련 상품 프로토콜 확립
- (2) 시제품 : 사료첨가제 (액상, 고형)

SUMMARY

I . Title of Research Project

Development of productive system for higher value-added and useful proteins using target sequence of fruiting body primordium-related proteins in mushroom and Breeding of functionality-enriched strain

II . Objective and Necessity of the Research and Development

The goal of this study develop factorial system of mass production of foreign proteins using *Pleurotus eryngii* with nutritional and economical values and provide industrial and medicinal materials, preparing for biosimilar era and creating high value-added. The other goal, by development of new mushroom species enriched with biological functionality, secure core technology of new species development to prepare for potential of the future market by protection of domestic market caused by FTA market opening and preemption of protective patent by mitigation of GMO regulation

1. Objective of the Research and Development

A. Development of productive system for higher value-added and useful proteins using target sequence of fruiting body primordium-related proteins in mushroom

- (1) Analysis of property and functionality for proteins related with primordium formation of fruiting body
- (2) Analysis of genes encoding for proteins related with primordium formation of fruiting body
- (3) Development of expression and secretion vector using promoter and signal sequence of the gene encoding for protein present in the primordium
- (4) Cloning of useful genes into the expression and secretion vector and Its transformation
- (5) Establishment of protein productive system in the primordium and mycelium
- (6) Establishment of protein purification system by mass production of mycelial culture and collection of the primordium
- (7) Establishment of mushroom factory to produce useful proteins for preparation of biosimilar era and Pharmaceutical raw materials by verification of the biological activity
- (8) Creation of high value-added by mass production of useful protein and Provision of industrial technology

B. Breeding of new mushroom species enriched with biological functionality

- (1) Development of transformation method for *Pleurotus eryngii* using plant and fungal vector
- (2) Establishment of regeneration conditions by introduction of pigment and edible vaccine encoding genes
- (3) Breeding of functionality-enriched mushroom strain and Mass production
- (4) Development of functional healthy food and edible vaccine

2. Necessity of the Research and Development

A. Deficiency of system to produce and secrete useful proteins using *Pleurotus eryngii* as host strain

- (1) Need for molecular biological study of mushroom-specific promoter and signal sequence
- (2) Need for mushroom factory to produce useful proteins

B. Deficient systematic study for transformation, regeneration, genetics, and protein expression of *Pleurotus eryngii*

C. Need for developing protocols to improve efficiency of transformation and regeneration in mushroom to connect BT to molecular breeding field of crops

D. Need for developing expression/secretion system by molecular biological study of primordium

- (1) Need for preemption of technical predominance of our inherent BT by developing protein productive system
- (2) Need for easiness of protein purification procedure by collection of primordium or protein secretion of mycelium through mass fermentation

E. Need for developing mass production system of generics to prepare for Biosimilar era

- (1) Need for pharmaceutical raw materials of useful proteins

F. Need for securing technical power and defensive/aggressive intellectual property to prepare for FTA open market (international right protection of genetic resources)

G. Need for securing core technology of new species development enriched with additional function

H. Need for increase of farm income and public health promotion by crops development containing functional materials

III. Contents and Scope of the Research and Development

1. Contents and Scope the Research and Development

A. Development of productive system for higher value-added and useful proteins using target sequence of fruiting body primordium-related proteins in mushroom

: By analyzing proteins present in primordium which is essential for formation of fruiting body, it will result in elucidating related mechanisms and roles of the proteins in process of primordium formation. By investigating effects of gene promoter and signal sequence encoding for the protein on regulations of expression and secretion of useful proteins (EPO, EGF, hGH, CSF, Surfactant protein, fibrinolytic enzyme), this study aim for creation of high value-added and offer of industrial technology

- (1) Characterization and functional analysis of the protein related to primordium formation of fruiting body
- (2) Characterization and gene isolation encoding for proteins related to primordium formation
- (3) Development of expression/secretion system using genes (promoter & signal sequence) encoding for proteins expressed in primordium
- (4) Introduction of useful genes into expression/secretion vector and transformation
- (5) Establishment of productive system for proteins in mycelium and primordium
- (6) Establishment of easiness for protein purification procedure by collection of primordium or protein secretion of mycelium through mass fermentation
- (7) Establishment of mushroom factory for mass production of protein
- (8) Pharmaceutical raw materials of useful proteins by verification of biological activity
- (9) Creation of high value-added and offer of industrial technology by mass production of useful proteins

B. Breeding of new mushroom species enriched with biological functionality

: In cooperative project, the goal is to establish transformation method of *Pleurotus eryngii* using plant and fungal vectors and to develop new *Pleurotus eryngii* strain enriched with functionality by introduction of colorful genes (β -carotenoid and anthocyanin) and useful genes (HBsAg, GAD), resulting in protection of domestic market for FTA open market and preemption of protective patent by mitigation of GMO regulation and securing core technology of new species development to prepare potential of the future market.

- (1) Development of tranformation method for *Pleurotus eryngii* using plant and fungal vector
- (2) Establishment of regeneration conditions by introduction of pigment and edible vaccine

encoding genes

(3) Breeding of functionality-enriched mushroom strain and Mass production

(4) Development of functional healthy food and edible vaccine

IV. Results of the Research and Development

1. The 1st detailed project : Development of productive system for higher value-added and useful proteins using target sequence of fruiting body primordium-related proteins in mushroom

A. Establishment of transformation method suitable for mycelium of *Pleurotus eryngii*

The necessary requirement in mushroom BT is to secure method for gene introduction. Although transformation methods such as protoplast (REMI), biolistic bombardment, electroporation, and Agrobacterium were developed, the big problem is that there is low effectiveness and regeneration rate. In this study, we performed traditional transformation methods (protoplast, electroporation, gene gun, and Agrobacterium) to find out new protocol of transformation using mycelium and explants of fruiting body. However, it was not easy to establish optimized condition for transformation. Accordingly, we carried out to obtain transformants using Agrobacterium mediated methods through trial and error.

B. Construction of cDNA library of *Pleurotus eryngii*

From tissue of *Pleurotus eryngii*, total RNA was extracted, followed by poly(A⁺) RNA isolation as described in Molecular Cloning protocol (Green and Sambrook, 2012) using oligo(dT) cellulose, and cDNA library (~ 1 x 10⁸ pfu/ul) was constructed using λZAP cDNA synthesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). The library was used as gene source and PCR template to screen some genes encoding proteins confirmed by primordium analysis.

C. Construction of genomic DNA library of *Pleurotus eryngii*

The genomic library (0.5 x 10⁶ pfu/ul) was constructed from genomic DNA of *Pleurotus eryngii* using FixII kit (Stratagene, La Jolla, CA). The library was used as gene source and PCR template to screen genomic DNA encoding proteins confirmed by primordium analysis.

D. Isolation of gene encoding protein (laccase) in exudate of primordium and DNA sequencing

Primordium proteins of *Pleurotus eryngii* were analyzed using SDS-PAGE and 2-D, and major proteins were characterized by CAF-MALDI sequencing. As a result, partial sequence

(LPANKLIEVSIPGAHPFHL HGHTFDIVRVSNDS) of the protein was characterized and it was turned out to be laccase protein by BLAST search. Through retrieval of other reference for laccase DNA sequence, laccase promoter (330 bp) and signal sequence (69 bp) were obtained to construct secretion vector by PCR using genomic DNA library as template.

E. Construction of secretion vector using plant vector

Preceding to main experiment, the pPEVpR1b vector was constructed using pPEV binary vector (Clontech, USA) containing CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S promoter and signal sequence (102 bp) of pathogenesis-related protein 1b. And then the gene of human growth hormone was cloned to the pPEVpR1b vector, named pPEVpR1bhGH, and transferred into mycelium of *Pleurotus eryngii* using *Agrobacterium*-mediated transformation. Finally, transformant harboring the pPEVpR1bhGH was constructed and the expressed protein was analyzed by PAGE and western blot. The clone was used as positive control when next recombinant vectors is constructed because its fast growth appear to be an indicator of efficient transformation.

F. Construction of expression/secretion vector with laccase promoter and signal sequence and GFP expression

To investigate promoter strength and efficient signal sequence by using GFP gene as reporter, 6 types of expression/secretion vectors (pCam35S, pCam35SLacS, pCam35SpR1b, pCamLacP, pCamLacPS, pCamLacPpR1b vectors) were constructed with CaMV 35S promoter (538 bp), laccase promoter (330 bp), pR1b (pathogen-related protein 1b) signal sequence (102 bp), and laccase signal sequence (69 bp). Finally, as efficient vector system by comparison of GFP strength and easiness of transformant selection, expression/secretion vectors composed of laccase promoter, laccase signal sequence, pR1b signal sequence were optimal for our purpose (pCamLacP, pCamLacPS, pCamLacPpR1b vector). By introduction of 6 types useful genes (CSF, EGF, EPO, hGH, PLSP, SPB) into the above expression/secretion vectors, respectively, 16 types of recombinant *Pleurotus eryngii* were obtained

G. Gene expression cloned in pCamLacPS vector : laccase promoter and signal sequence

There were no expression in pCamLacPCSF, pCamLacPEGF, pCamLacPEPO, pCamLacPhGH, pCamLacPPLSP3, and pCamLacPSPB constructed by cloning 6 types of useful genes into pCamLacP vector. Among recombinant vectors as pCamLacPSCSF, pCamLacPSEGF, pCamLacPSEPO, pCamLacPShGH, pCamLacPSPLSP3, and pCamLacPSSPB constructed by cloning 6 types of useful genes into pCamLacPS vector, each protein (EGF,

hGH, PLSP) in pCamLacPSEGF, pCamLacPShGH, and pCamLacPSPLSP3 was not secreted but expressed in mycelium of *Pleurotus eryngii* (approximately 3-7% of total soluble proteins). The proteins were confirmed by antigen-antibody reaction, respectively.

H. Gene expression cloned in pCamLacPpR1b vector : laccase promoter and pR1b signal sequence

Among recombinant vectors as pCamLacPpR1bCSF, pCamLacPpR1bEGF, pCamLacPpR1bEPO, pCamLacPpR1bhGH, pCamLacPpR1bPLSP3, pCamLacPpR1bSPB constructed by cloning 6 types of useful genes into pCamLacPpR1b vector, each protein (EGF and hGH) in pCamLacPpR1bEGF and pCamLacPpR1bhGH was not secreted but expressed in mycelium of *Pleurotus eryngii* (approximately 3-5% of total soluble proteins). The proteins were confirmed by antigen-antibody reaction, respectively.

I. Changes of protein expression pattern by large culture

To study changes of expression pattern, mycelium weights (wet and dry), and expression levels under different culturing times, fermentation was carried out using 20 L fermenter (10 L of working volume). As a result, transformant harboring pCamLacPShGH reached to maximal growth at 8 days. When the mycelium was harvested, wet and dry weight were 38 g and 2.3 g, respectively. The protein expression was increased in proportional to culture time and the expression level was 15% of total soluble proteins (~24 ug/g wet powder). And also, the cloned gene (hGH) was stably maintained in transformant harboring pCamLacPShGH. Transformant harboring pCamLacPSEGF reached to maximal growth at 14 days. When the mycelium was harvested, wet and dry weight were 45.7 g and 2.9 g, respectively. The protein expression was increased in proportional to culture time and the expression level was 5% of total soluble proteins. And also, the cloned gene (EGF) was stably maintained in transformant harboring pCamLacPSEGF. Transformant harboring pCamLacPSPLSP reached to maximal growth at 14 days. When the mycelium was harvested, wet and dry weight were 35.5 g and 2.4 g, respectively. The protein expression was increased in proportional to culture time and the expression level was 5% of total soluble proteins. And also, the cloned gene (PLSP3) was stably maintained in transformant harboring pCamLacPSPLSP. The clones in pCamLacPS vector showed slightly higher expression than those of pCamLacPpR1b vector.

J. Phenotypic change of transformant harboring hGH gene

When the growth rates between control *Pleurotus eryngii* and recombinant *Pleurotus eryngii* harboring pCamLacPShGH and pCamLacPpR1bhGH were compared, the recombinant

Pleurotus eryngii harboring hGH gene showed 6 times faster growth than that of the control, interestingly. This result indicates that growth hormone originated from animal can influence the activity on plant or mushroom and active protein can be synthesized in the mycelium. However, when the fruiting body was induced by mycelium scratching, it showed bonsai type of *Pleurotus eryngii*, suggesting that the hGH can affect profitably on the increase of mycelium nutritional growth, while can give bad effect on sexual growth to fruiting body.

K. Fruiting body analysis of transformants : Genomic DNA analysis

To confirm the interest genes in various fruiting bodys, genomic DNAs were extracted from the body. Using gene-specific primer, the expected DNA fragments were amplified for target genes by PCR and finally the correct sequences of the integrated genes were confirmed by DNA sequencing. To verify next generation of the fruiting body, the spores were isolated from each type of fruiting body, followed by serial culture of the mycelium, and the fruting body was re-induced. It was finally confirmed that all fruiting bodies contained stably 6 types of the genes, respectively.

L. Transcriptional analysis of the integrated genes in the transformants

To investigate transcriptional levels of the cloned genes in fruiting bodies of recombinant *Pleurotus eryngii*, total RNAs were extracted from the fruiting bodies. Using gene-specific and oligo(dT) primers, the expected DNA fragments were amplified for target RNAs by RT-PCR and finally the correct sequences of the amplified fragments were confirmed by DNA sequencing, indicating that all fruiting bodies can normally make gene-specific RNA.

M. Translational analysis of transformants : Protein analysis

From fruiting bodies of various transformants (pCamLacPSEGF, pCamLacPShGH, pCamLacPSPLSP3, pCamLacPpR1bEGF, and pCamLacPpR1bhGH), the proteins were extracted and analyzed in SDS-PAGE and western blot. As a result, the specific protein bands (8.8 kD EGF, 23 kD hGH, and 27 kD PLSP) were confirmed, showing that the fruiting bodies expressed same specific proteins as in the mycelium. The fruiting bodies containing other genes can make RNA at transcriptional level, but the proteins were not synthesized, indicating that mRNA secondary structure present in 5'-end of mRNA might affect importantly on the synthesis of proteins.

N. Prediction of mRNA secondary structure present in signal sequence and 5'-end of genes

To study effect of mRNA secondary structure on protein synthesis, it is analyzed using mFOLD program (Zuker, 1989). In case of the genes cloned in pCamLacPS vector, laccase signal sequence (69 bp) and DNA sequence (60 bp) in 5'-end of genes were analyzed, while pR1b signal sequence (102 bp) and DNA sequence (60 bp) in 5'-end of genes were analyzed for the genes cloned in pCamLacPpR1b vector. The overall expression trends were proportional to the increase of ΔG value to + direction as expression level is increased. In case of pCamLacPS_{hGH} showing high level expression of hGH, ΔG value was predicted to be -13.07 Kcal/mole, which is higher value (to + direction) than those of other clones. The pCamLacPSEGF (-15.6 Kcal/mole) and pCamLacPSPLSP3 (-17.7 Kcal/mole) which expressed EGF and PLSP proteins showed similar trend as in pCamLacPS_{hGH}. In pCamLacPpR1b_{hGH} and pCamLacPpR1bEGF, ΔG values were increased to + direction, compared with other clones. Accordingly, it is assumed that disruption of mRNA secondary structure present in 5'-end of gene might be important factor for gene expression in *Pleurotus eryngii*.

O. Measurement of cell viability in insulinoma cell (RINm5F)

To investigate antidiabetic effect and cell viability of insulinoma RINm5F cell by hGH and EGF, the samples were prepared by large culture of transformants harboring pCamLacPS_{hGH} and pCamLacPSEGF, followed by partially purification using metal chelating method and treated in culture broth of RINm5F cell and STZ-treated RINm5F cell to examine the effects. As a result, hGH and EGF increased cell viability to 5-20% and antidiabetic effects were improved to 12% (hGH, at 5 ng/ml conc.) and 19% (EGF, at 1 ng/ml conc.), suggesting that by treatment of hGH and EGF in type I diabetes (STZ-treated cell), these materials can be candidates having protective and curing functions for cell toxicity and cell death.

P. Biological activity of hGH : feed additive

(1) In vivo experiment of SD (Sprague Dawley) rat

Two types of feed additives (liquid and powder) were manufactured by mycelial culturing of transformant harboring pCamLacPS_{hGH} (liquid type, p-hGH1 & 2 ; powder type, Myc1 & 2). The effects of mycelial extracts containing hGH on growth rate, plasma lipid levels, alkaline phosphatase (ALP, BALP) activity, growth related factors (GH, IGF-1, GHRF) and bone growth were investigated after 4 weeks of treatment. The growth rates of the treated groups slightly increased approximately 3-5%, compared to that of the control group, but it

was not a dose-dependent effect and total cholesterol levels of the treated group decreased by approximately 12-15% ; LDL-cholesterol levels (16-28% decrease), and total triglyceride level (15-18% decrease), compared to the control group. The levels of ALP and BALP increased largely to 15-31% and 29.7-47.5%, respectively, compared to the control group. And also, levels of growth-related factors increased largely to 17-26% of IGF-1, 28-46% of rat GH, and 26-42% of GHRF, respectively. In experiment of bone growth, tibial growth plate increased slightly than the control group and serum BALP is considered to be a good marker of bone formation. Conclusively, these results indicate that hGH expressed in mushroom was biologically active and stimulated effectively rat growth.

(2) Field test in chicken broiler farm

From large mycelial culture of transformant harboring pCamLacPShGH, the mycelium was harvested and lyzed. The hGH was partially purified by metal cheating method and the concentration was determined to be approximately 600 ug/g of wet weight. Feed additive was manufactured by mixing the hGH and wheat flour (1 ug hGH/g powder of wheat flour) and administrated with a final concentration of 0.1% to main feed during 1 month. Field test was carried out in chicken broiler farm located in Kimcheon (Gyeongbuk). Chicks were randomly divided into two groups, control group (10,800 chicks) and treated group (23,500 chicks). Before going to the market, total body weights (TBW) were weighed (treated group, 36,363 kg ; control group, 15,280 kg). Average body weight (ABW) of treated group is 1.59 kg, while that of control group is 1.45 kg. There was 9.6% of weight gain effect in the treated group. Average daily gain (ADG) is 28.6% higher in the treated group (54.82 g) than that of the control group (42.64 g). Feed efficiency (total feed intake/total body weight) showed better effect in the treated group (1.56) than the control group (1.77). And also, production index (PI) was largely increased in the treated group (341.95) than that of the control group (235.16), indicating that addition of hGH (0.1%) can stimulate all growth related factors. Accordingly, culturing period will be shortened (4-5 advanced days to market), feed cost will be saved and farm income will increase by treatment of new functional feed additive.

Q. Epidermal growth factor (EGF) : cosmetic ingredient

Measurement of cosmetic stability by EGF : it was confirmed that there were stabilities for pH, viscosity, temperature, and UV

Safety experiment by patch test : it was confirmed that EGF did not give rise to dermatitis

R. *Periserrula leucophryna* serine protease (PLSP3) : Semi-quantitative assay

To test protease activity of PLSP3 expressed in mycelium of *Pleurotus eryngii*, partial purified PLSP was spotted on sterilized paper disc in protease assay plate (1% skim milk, 0.1% yeast extract, 1.5% agar) and incubated at 37°C overnight. As a result, clear zone was observed around paper disc, suggesting that PLSP was expressed as biological active protein in the mycelium and it present industrial utilization of PLSP as fibrinolytic protease.

S. In this study, we are presenting that biological active proteins can be produced in recombinant *Pleurotus eryngii* harboring various vectors, hGH with growth-stimulating effect, EGF with cell viability promotion, and PLSP with fibrinolytic activity. Accordingly, we can utilize *Pleurotus eryngii* to produce biological active proteins as factorial system, and this expression system will be applicable for production of industrially useful, other proteins.

2. The 1st cooperative project : Breeding of new mushroom species enriched with biological functionality

A. Total summary

In order to develop a high-valued *Pleurotus eryngii* cultivar, improvement of mycelium culture condition, methods of practical transformation and selection, and induction of fruiting body have been investigated. Supplementation of spent coffee ground (SCG) to the culture media resulted in the increase of mycelium growth rate and biomass and enhancement of flavonoid and phenol contents and antioxidative activity. Similar results were observed by the supplementation of bamboo leaf and mistletoe extracts. Carrot extracts, instead of potato extracts in the culture medium, greatly increased the mycelium growth rate. Addition of metal ion during bottle culture resulted in the slightly different number of fruiting body generation. In order to establish an efficient transformation method using *Agrobacterium*, a brief mechanical wounding to the mycelia was determined to be prerequisite before co-cultivation with the bacteria.

In order to produce pigmented *P. eryngii*, pigment-biosynthesis related genes including *myb*, *crtO* and PAC (*psy+crtI*) were cloned and introduced into the mycelium to finally obtain transgenic fruiting bodies. In most cases, transgenic *P. eryngii* was retarded in its growth and deformed. No distinctive change in pigment development in the transgenic mushroom suggested a further study of pigment biosynthesis system in *P. eryngii* in the future.

P. eryngii mycelium was exploited as edible vaccines against hepatitis B virus and type I diabetes. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and glutamic acid decarboxylase (GAD1) were cloned, constructed as expression vectors, and introduced into the mycelium. Oral administration of transgenic mycelia expressing HBsAg and GAD1 in mice resulted in the significant induction of anti-HBsAg antibody in BALB/c mice and the suppression of blood glucose level in NOD mice, respectively.

B. Detailed summary

(1) Acceleration of mycelium growth

Many bioactive compounds are still remained in spent coffee grounds (SCG), a coffee waste. Supplementation of 1-7.5% SCG to the culture medium accelerated the mycelium growth of *P. eryngii* and also other several mushroom species. In solid, liquid and bottle cultivation, SCG was greatly effective for the improvement of growth and biomass, total contents of flavonoid and phenol, and DPPH scavenging activity. The effect of 0.1-2% bamboo leaf or mistletoe extracts was very similar to that of SCG. Carrot extracts were found to be an excellent substitute for potato extracts in the cultivation medium to accelerate the mycelium growth of *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *Lentiniula edodes* and *Grifola frondosa*. Also, improvement of total protein and fiber contents was made by carrot extract-based cultivation.

(2) Pigment biosynthesis in transgenic *P. eryngii*

Transcription factor *myb* from grape, *Haematococcus pluvialis* β -C-4 oxygenase (*crtO*) that converts β -carotene to canthaxanthin, and carotenoid-biosynthetic PAC containing pepper phytoene synthase (*psy*) and *Pantoea* caroten desaturase (*crtl*) were cloned and introduced into the expression vector. Mycelia transformants generated by *Agrobacterium*-mediated method were confirmed by PCR and dot blot hybridization. Almost all of the transgenic fruiting bodies showed smaller than the wild type in size, implying the results of T-DNA insertion-mediated genetic mutagenesis. No change in the level of pigmentation was monitored suggesting a further study to be needed for detailed understanding of the metabolic system of pigment biosynthesis in *P. eryngii*. Extracellular polysaccharides from some of the mycelia transformants showed a significant toxicity to SKOV-3 (ovarian cancer cell line) in MTT assay. This indicated improvement of EPS function owing to T-DNA insertional mutagenesis in *P. eryngii*.

(3) Evaluation of transgenic *P. eryngii* as an edible vaccine

In order to generate edible vaccine against hepatitis B virus, hepatitis B surface antigen (HBsAg) was cloned and inserted into expression vector to obtain pCamHBsAg. Mycelium was transformed by the *Agrobacterium* method and selected by hygromycin resistance. Transgene integration was verified by PCR and dot blot hybridization. HBsAg protein expression was measured by ELISA. Oral administration of the mycelium expressing HBsAg in mice significantly increased anti-HBsAg antibody titer levels using a double prime-boost strategy that combined parenteral and oral HBsAg boosters. It was evident that parenteral priming led to a recall response induced by mycelium-derived HBsAg. Transgenic mycelium was verified as an excellent immuno-booster effector in combination with a primer and booster injection of the commercial vaccine.

Pancreatic glutamic acid decarboxylase (GAD67) is strongly associated with insulin-dependent diabetes mellitus. GAD67 was cloned and introduced into the expression vector to construct pCamGAD67. Mycelium was transformed by the *Agrobacterium* method and selected by hygromycin resistance. Transgene integration was verified by PCR and dot blot hybridization. GAD67 protein expression was confirmed by western blot and ELISA. Notably, oral administration of the GAD67 mycelium to prediabetic NOD mice kept the initial blood glucose levels almost constant for 15 weeks, and sufficiently prevented the onset of diabetes. Optimized oral delivery of the mycelia expressing higher levels of GAD67 antigen could eventually provide a convenient way to prevent type I diabetes.

V. Research outcome and Its applicable plans

1. Research papers

Using direct and indirect results obtained from this research, the manuscripts were submitted to domestic and international journals, published, and manuscripts are under preparation

A. Domestic paper

- (1) Choi, J. W., D. I. Shin, and H. S. Park. 2012. Enhancement of growth and bioactivity of *Pleurotus eryngii* mycelia by spent coffee ground. *Journal of Agriculture & Life Science*. 46(6), 157-163.

B. International paper

- (1) Park, H. S. and J. W. Choi. 2014. Functional expression of bovine growth

hormone gene in *Pleurotus eryngii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17, 176-184. (SCIE, IF = 1.224)

2. Meeting and Poster presentation

- (1) M. G. Lee, K. B. Koo and J. W. Choi. 2014. Functional expression of the human growth hormone gene in mycelia of *Pleurotus eryngii*. Annual Meeting of the Korean Society for Plant Biotechnology. "Genome to Phenome in Plants". Daegu, 2014. 10. 30. P1-47

3. Patents registration and application

A. Patent registration

- (1) Composition of culture medium for mushroom mycelium comprising spent coffee ground
(Registration date 2014.11.10; Registration number 10-1462233)

B. Patent application

- (1) A recombinant vector for transformation of *Pleurotus eryngii* and methods for preparation of target protein using the same
(Application date 2013.10.16; Application number 10-2013-0123254)
- (2) Production methods of foreign protein using secretion vector in *Pleurotus eryngii*
(Application date 2013.10.16; Application number 10-2013-0123273)
- (3) Secretion vector harboring laccase promoter of *Pleurotus eryngii* and methods for preparation of target protein using the same
(Application date 2013.10.16; Application number 10-2013-0123293)
- (4) Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Epidermal Growth Factor Protein Using the Same
(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180050)
- (5) Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Human Growth Hormone Protein Using the Same
(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180054)
- (6) Production Methods of Epidermal Growth Factor Protein using a Vector for transforming

Pleurotus eryngii)

(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180062)

(7) Production Methods of Human Growth Hormone Protein using a Vector for Transforming *Pleurotus eryngii*

(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180064)

(8) Production Methods of Epidermal Growth Factor Protein Using Secretion Vector in *Pleurotus eryngii*

(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180071)

(9) Production Methods of Human Growth Hormone Protein Using Secretion Vector in *Pleurotus eryngii*

(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180078)

4. Applications

A. Technology transfer

(1) Participant : Greenfarm

(2) Technology :

Ⓐ Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Epidermal Growth Factor Protein Using the Same

(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180050)

Ⓑ Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Human Growth Hormone Protein Using the Same

(Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180054)

(3) Technical transfer : Normal license (2 years)

(4) Royalties : Prepaid royalties (3,000,000 won) + Ordinary royalties (3% per total sales/year)

B. Commercialization and Manufacturing prototype

(1) Commercialization : "In preparation"

(2) Prototype : Feed additive (liquid & solid types)

CONTENTS

Chap. 1. Introduction of the Research and Development	67
I. Purpose of the Research and Development	67
1. Final Purpose of the Research and Development	67
2. Characteristics of the Research and Development	67
2.1. General characteristic of <i>P. eryngii</i>	68
2.2. Primordium Formation and fruiting body.....	69
2.3. Useful genes material and Its function.....	71
II. Necessity of the Research and Development	77
1. Purpose of the Research and Development	77
1.1. Purpose of the research and development.....	77
1.2. Total purpose of the research and development.....	77
1.3. Detail purpose of the research and development.....	77
1.4. Differentiation of research and development projects.....	78
2. Necessity of the Research and Development	79

Chap. 2. Current Domestic and International Technology and Developments	83
I. Current Technology and Development of Foreign Countries	83
1. Overseas Research Trends of Mushrooms	83
1.1. Research paper trends.....	83
1.2. Patent trends.....	85
2. Overseas Trends of GM crops	86
3. Overseas Biosimilar Trends	89
3.1. Bioindustrial trends of foreign countries.....	89
3.2. Biosimilar trends of Foreign Countries.....	89
4. Overseas Functional Foods Trends	96
II. Current Domestic Technology and Developments	99
1. Domestic Research Trends of Mushroom	99
1.1 Domestic research paper trends.....	99
1.2. Domestic patent trends	101
2. Current Domestic Trends of GM Crops	102
3. Domestic Biosimilar Trends	103
3.1. Domestic bioindustrial trends	103
3.2. Domestic biosimilar trends	106

4. Domestic Functional Foods Trend	110
Chap. 3. Results of the Research and Development	112
I. The 1st detailed Project	112
1. R&D Contents and Methods	112
1.1. R&D driving strategy and method.....	112
1.2. R&D contents and method.....	113
2. Results of Research	121
2.1. General property of <i>P. eryngii</i>	121
A. <i>Pleurotus eryngii</i>	121
B. Research trends of <i>P. eryngii</i>	121
2.2. Establishment of culture conditions of <i>P. eryngii</i> mycelium.....	122
A. Culture conditions of <i>P. eryngii</i> mycelium	122
(1) Mycelial growth change by carbon sources.....	122
(2) Mycelial growth change by nitrogen sources.....	123
(3) Mycelial growth change by yeast extract.....	123
2.3. Establishment of primordium & fruiting body-formation conditions of <i>P. eryngii</i>	124
A. Induction procedure of <i>P. eryngii</i> fruiting body	124
2.4. Establishment of transformation method of <i>P. eryngii</i> mycelium.....	126
A. Transformation using protoplast.....	128
(1) Antibiotic resistance of <i>P. eryngii</i>	128
(2) Mycelium culture and formation of protoplast.....	128

(3) REMI transformation using protoplast.....	131
B. General <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation.....	133
C. Enhancement of transformation efficiency by <i>Agrobacterium</i> method.....	134
(1) General <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation and Hygromycin resistance.....	134
(2) Wound-mediated <i>Agrobacterium</i>	134
2.5. Construction of cDNA library from <i>P. eryngii</i>	137
A. Total RNA extraction from <i>P. eryngii</i> mycelium.....	137
B. Construction of cDNA library	137
(1) Isolation of poly(A) ⁺ RNA	137
(2) First & second cDNA synthesis.....	138
(3) Packaging and library amplification.....	139
2.6. Construction of genomic DNA library of <i>P. eryngii</i>	141
A. Genomic DNA extraction from <i>P. eryngii</i> mycelium.....	141
B. Construction of genomic DNA library.....	141
(1) Restriction enzyme digestion and size fractionation.....	141
(2) Packaging & Amplification.....	142
2.7. Protein analysis of primordium exudates.....	143
A. Primordium system.....	143
B. Collection of primordium exudates.....	144
C. Analysis of proteins and amino acid sequences of primordium exudates and Protein characterization	145
(1) 1 st Analysis by SDS-PAGE.....	145
(2) 2 nd Analysis by 2-Dimensional electrophoresis.....	149
(3) 3 rd Analysis by SDS-PAGE.....	152
(4) Partial genes encoding proteins of primordium exudate and DNA sequencing.....	154
2.8. Genes encoding the protein of primordium exudate.....	157
(1) PCR amplification of laccase gene.....	157

(2) Sequence analysis of Laccase gene.....	158
2.9. Construction of secretion vector using fungal and plant vector.....	159
A. Expression and secretion of hGH gene in plant vector, pPEV.....	159
(1) Construction of secretion vector, pPEVpR1b.....	159
(2) Introduction of hGH gene in secretion vector, pPEVpR1b.....	160
(3) Fungal transformation.....	161
(4) Expression of hGH gene in mycelium of <i>P. eryngii</i>	163
B. Construction of secretion vector using fungal vector, pBARGPE1.....	164
(1) Total construction strategy of secretion vector	164
(2) Cloning of laccase promoter and signal sequence into pBARGPE1 vector.....	165
(3) Introduction of laccase signal sequence into pBARGPE1 vector.....	167
C. Construction of secretion vector using fungal vector, pCAMBIA1302.....	168
(1) Antibiotic resistance of <i>P. eryngii</i>	169
2.10. Target protein used in <i>P. eryngii</i>	171
2.11. Vector construction containing promoter and target sequence and Expression of green fluorescent protein.....	172
A. Vector construction containing CaMV 35S promoter (pCam35S).....	175
(1) Cloning strategy.....	175
(2) Selection of transformants and PCR confirmation.....	176
(3) Analysis of sequencne	177
(4) Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	178
(5) Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	179
(6) GFP analysis from transformant of <i>P. eryngii</i> (pCam35S).....	180
B. Vector construction containing CaMV 35S promoter and pR1b signal sequence (pCam35SpR1b).....	181
(1) Cloning strategy.....	181
(2) Selection of transformants and PCR confirmation.....	182
(3) Analysis of sequencne	183
(4) Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	184

(5) Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	185
(6) GFP analysis from transformant of <i>P. eryngii</i> (pCam35SpR1b)	186
C. Vector construction containing CaMV 35S promoter and laccase signal sequence (pCam35SLacS)	187
(1) Cloning strategy	187
(2) Selection of transformants and PCR confirmation	188
(3) Analysis of sequence	189
(4) Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	190
(5) Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	191
(6) GFP analysis from transformant of <i>P. eryngii</i> (pCam35SLacS)	192
D. Vector construction containing laccase promoter (pCamLacP vector)	193
(1) Cloning strategy	193
(2) Selection of transformants and PCR confirmation	194
(3) Analysis of sequence	195
(4) Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	196
(5) Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	197
(6) GFP analysis from transformant of <i>P. eryngii</i> (pCamLacP)	198
E. Vector construction containing laccase promoter and pR1b signal sequence (pCamLacPpR1b)	199
(1) Cloning strategy	199
(2) Selection of transformants and PCR confirmation	200
(3) Analysis of sequence	201
(4) Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	202
(5) Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	203
(6) GFP analysis from transformant of <i>P. eryngii</i> (pCamLacPpR1b)	204
F. Vector construction containing laccase promoter and laccase signal sequence (pCamLacPS)	205
(1) Cloning strategy	205
(2) Selection of transformants and PCR confirmation	206
(3) Analysis of sequence	207
(4) Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	208

(5) Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	209
(6) GFP analysis from transformant of <i>P. eryngii</i> (pCamLacPpR1b).....	210
2.12. Cloning of useful genes into vectors containing laccase promoter or Lac promoter/LacS (Intracellular expression).....	211
A. Cloning of genes into pCamLacP vector containing laccase promoter	211
(1) Cloning strategy.....	211
B. Cloning of genes into pCamLacPS vector containing laccase promoter/signal sequence (Extracellular expression).....	212
(1) Cloning strategy.....	212
C. Target genes for expression and secretion	214
(1) Human growth hormone.....	214
(2) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease).....	214
(3) Colony stimulating factor.....	215
(4) Surfactant protein B.....	215
(5) Epidermal growth factor.....	216
(6) Erythropoietin	216
D. Gene amplification and Isolation of target genes.....	217
(1) Human growth hormone.....	217
(2) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease).....	217
(3) Colony stimulating factor.....	218
(4) Surfactant protein B.....	218
(5) Epidermal growth factor.....	219
(6) Erythropoietin	220
E. Introduction of useful genes into pCamLacP vector containing laccase promoter.....	221
(1). Human growth hormone.....	221
① Cloning strategy.....	221
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	222
③ Analysis of sequencne	222
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	224
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	223
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	225
⑦ Gene expression of hGH in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	226

(2) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease).....	227
① Cloning strategy.....	227
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	228
③ Analysis of sequencne	228
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	229
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	230
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	231
⑦ Gene expression of PLSP in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	232
(3) Colony stimulating factor.....	233
① Cloning strategy.....	233
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	234
③ Analysis of sequencne.....	234
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	235
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	236
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	237
⑦ Gene expression of CSF in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	238
(4) Surfactant protein B.....	239
① Cloning strategy.....	239
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	240
③ Analysis of sequencne.....	240
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	241
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	242
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	243
⑦ Gene expression of SPB in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	244
(5) Epidermal growth factor.....	245
① Cloning strategy.....	245
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	246
③ Analysis of sequencne.....	246
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	247
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	248
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	249

⑦ Gene expression of EGF in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	250
(6) Erythropoietin.....	251
① Cloning strategy.....	251
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	252
③ Analysis of sequencne.....	252
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	253
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	254
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	255
⑦ Gene expression of EPO in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	256
F. Introduction of useful genes into pCamLacPS vector containing laccase promoter/signal sequence.....	257
(1) Human growth hormone.....	257
① Cloning strategy.....	257
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	258
③ Analysis of sequencne	258
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	259
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	260
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	261
⑦ Gene expression of hGH in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	262
⑧ Comparison of mycelial growth of <i>P. eryngii</i>	263
⑨ Gene expression (mass culture) of hGH in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	264
(2) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease).....	266
① Cloning strategy.....	266
② Selection of transformants and PCR confirmation.....	267
③ Analysis of sequencne	267
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	268
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants.....	269
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR.....	270
⑦ Gene expression of PLSP in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	271
⑧ Comparison of mycelial growth of <i>P. eryngii</i>	272
(3) Colony stimulating factor.....	274
① Cloning strategy.....	274

② Selection of transformants and PCR confirmation	275
③ Analysis of sequencne	275
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	276
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	277
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	278
⑦ Gene expression of CSF in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	279
(4) Surfactant protein B	280
① Cloning strategy	280
② Selection of transformants and PCR confirmation	281
③ Analysis of sequencne	281
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	282
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	283
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	284
⑦ Gene expression of SPB in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	285
(5) Epidermal growth factor	286
① Cloning strategy	286
② Selection of transformants and PCR confirmation	287
③ Analysis of sequencne	287
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	288
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	289
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	290
⑦ Gene expression of EGF in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	291
⑧ Comparison of mycelial growth of <i>P. eryngii</i>	292
(6) Erythropoietin	294
① Cloning strategy	294
② Selection of transformants and PCR confirmation	295
③ Analysis of sequencne	295
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	296
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	297
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	298
⑦ Gene expression of EPO in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	299

G. Introduction of useful genes into pCamLacPpR1b vector containing laccase promoter/pR1b signal sequence	300
(1) Human growth hormone	300
① Cloning strategy	300
② Selection of transformants and PCR confirmation	301
③ Analysis of sequencne	301
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	302
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	303
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	304
⑦ Gene expression of hGH in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	305
⑧ Comparison of mycelial growth of <i>P. eryngii</i>	306
⑨ Gene expression (mass culture) of hGH in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	307
(2) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	309
① Cloning strategy	309
② Selection of transformants and PCR confirmation	310
③ Analysis of sequencne	310
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	311
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	312
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	313
⑦ Gene expression of PLSP3 in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	314
(3) Colony stimulating factor	315
① Cloning strategy	315
② Selection of transformants and PCR confirmation	316
③ Analysis of sequencne	316
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	317
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	318
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	319
⑦ Gene expression of CSF in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	320
(4) Surfactant protein B	321
① Cloning strategy	321
② Selection of transformants and PCR confirmation	322
③ Analysis of sequencne	322

④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	323
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	324
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	325
⑦ Gene expression of SPB in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	326
(5) Epidermal growth factor	327
① Cloning strategy	327
② Selection of transformants and PCR confirmation	328
③ Analysis of sequencne	328
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	329
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	330
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	331
⑦ Gene expression of EGF in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	332
⑧ Comparison of mycelial growth of <i>P. eryngii</i>	333
(6) Erythropoietin	335
① Cloning strategy	335
② Selection of transformants and PCR confirmation	336
③ Analysis of sequencne	336
④ Introduction and identification of recombinant vector into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	337
⑤ Transformation and selection of <i>P. eryngii</i> transformants	338
⑥ Screening of mycelial transformants by PCR	339
⑦ Gene expression of EPO in the mycelium of <i>P. eryngii</i>	340
H. Analysis of transformed fruiting body	341
(1) PCR analysis	341
① Human growth hormone	342
② PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	345
③ Colony stimulating factor	348
④ Surfactant protein B	351
⑤ Epidermal growth factor	354
⑥ Erythropoietin	357
(2) RT-PCR analysis	360
① Human growth hormone	361
② PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	364

③ Colony stimulating factor.....	367
④ Surfactant protein B.....	370
⑤ Epidermal growth factor.....	373
⑥ Erythropoietin.....	376
(3) Gene expression in fruiting body of <i>P. eryngii</i>	379
① Human growth hormone.....	379
② PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease).....	380
③ Epidermal growth factor.....	381
(4) Prediction of mRNA secondary structure with signal sequence and 5'-end sequence of genes.....	382
II. The 1st cooperative project.....	384
1. R&D Contents and Methods.....	384
1.1. Research contents.....	384
2. Results of Research.....	387
2.1. Growth promoting study of <i>P. eryngii</i> mycelium.....	387
A. Growth promotion of <i>P. eryngii</i> mycelium by Spent coffee ground (SCG).....	387
(1) Mycelial culture and Growth measurements.....	388
(2) Analysis of functionality in growth promoted mycelium.....	390
B. Mycelial growth in bottle cultivation of <i>P. eryngii</i> mycelium by SCG.....	392
(1) Mycelial culture and Growth measurements.....	393
C. Cultivation of <i>P. eryngii</i> mycelium in other ingredient added medium.....	394
(1) Addition of natural products and changes of mycelial culture.....	395
(2) Preparation of the medium using Carrot scraps	396
(3) Cultivation of fruiting body.....	399
① Changes of fruiting body generation by metal ion	399
② Component changes of fruiting body by carrot extracts.....	401

2.2. Cloning study of pigment genes	402
A. Pigments	402
B. Expression regulation of pigment biosynthesis-related genes by transcription factor and genetic engineering	403
C. Carotenoids biosynthesis and Genetic Engineering	404
D. Cloning of pigment biosynthesis-related genes	407
(1) Cloning	407
(2) PAC gene for carotenoid biosynthesis	407
(3) Cloning of β -C-4 Oxygenase (crtO) using RT-PCR from <i>Haematococcus pluvialis</i>	411
(4) Myb gene cloning	415
2.3. Introduction of pigment-related genes	419
A. Transformation vector in higher basidiomycetes	419
B. Development of expression vector	421
(1) Cloning of pBARGPE1 vector	421
(2) Cloning of gpd promoter	421
① Isolation of fungal genomic DNA	423
② Gpd promoter cloning	423
③ Comparison of gpd promoter activity by GUS expression	425
(3) Construction of expression vector for pigment genes	426
① Cloning	426
② Subcloning into expression vector	426
2.4. Mycelial transformation, functional test, production of fruiting body	428
A. Introduction of pCamPAC, pCamcrtO and pCammyb in mycelium and screening	428
B. Functional test of EPS (exopolysaccharides)	430
C. Production of fruiting body	432
D. Expression analysis of pigment-related genes	434
(1) Confirmation of gene integration	434
(2) Confirmation of gene expression	434
(3) Discussion	435

2.5. Development of <i>P. eryngii</i> for edible hepatitis vaccine	436
A. Background of edible vaccine developmen t.....	436
B. Characteristics of mushroom fungus.....	438
C. Hepatitis B virus antigen (HBsAg) cloning	439
(1) Cloning of HBsAg and expression in <i>E. coli</i>	440
(2) Construction of expression vector for HBsAg	442
D. Fungal transformation.....	442
(1) Transformation of <i>P. eryngii</i> and expression of HBsAg.....	443
(2) Mycelial transformation of other mushrooms.....	447
E. Development of edible hepatitis vaccine using HBsAg expressing <i>P. eryngii</i> mycelium.....	450
(1) Backgroud.....	450
(2) Assessment of immune stability of the mycelium.....	451
① Administartion of mycelium into mice and changes of weight and organs.....	451
② Measurement of IgE & IgG in serum and cytokine & IgG in spleen cell culture...	451
③ Comparison of Immune Pathology	452
④ Administartion of mycelium and changes of humoral immunity.....	453
⑤ Effects of mycelium administration on immunity.....	454
(3) Analysis of antibody formation by oral administration with HBsAg mycelium.....	455
① Administartion of HBsAg mycelium to mouse.....	455
② Analysis of antibody formation by HBsAg(Prime + oral).....	457
③ Analysis of antibody formation by HBsAg(Prime + oral/booster + oral).....	458
(4) Conclusion.....	459
2.6. Development of antidiabetic, functional edible vaccine.....	460
A. Glutamic acid decarboxylase (GAD67) cloning	460
(1) Bacterial cloning and expression.....	461
(2) Construction of expression vector harboring GAD67	463
B. Expression analysis of mycelial GAD67.....	463
(1) Mycelium tranformation and screening.....	463
(2) Microwave-assisted protein extraction and confirmation of GAD67 expression by western blot	463
① Microwave-assisted protein extraction.....	464

② Microwave-assisted DNA extraction.....	466
C. Study of antidiabetic, functional edible vaccine.....	467
(1) Administration of NOD mice with GAD67 mycelium.....	467
(2) Mortality by diabetes onset (1st exp.).....	467
(3) Mortality by diabetes onset (2nd exp.).....	468
(4) Blood sugar levels between control and treated group with GAD67 (1st exp.).....	469
(5) Changes of blood sugar level by various conc. of GAD67 mycelium (2nd exp.)	469
(6) Conclusion.....	470
III. Biological Activity.....	471
1. <i>In vitro</i> Cell viability.....	472
1.1. Cell viability of Insulinoma cell.....	472
A. Characteristics of RINm5F Cell	472
B. Cell line and culture condition.....	473
C. Cell viability assay.....	473
2. Human growth hormone.....	475
2.1 Biological activity of hGH in vivo	475
A. Sample preparation and Administration	475
B. Biological activity	475
(1) Weight gain, feed intake, drinking water.....	475
(2) Biochemical analysis.....	477
① Organ weight.....	477
② Plasma lipid	477
③ Blood parameter (Ca, ALP, BALP) changes.....	478
④ Changes of growth-related factors (GH, IGF-1, GHRF).....	479
⑤ Bone growth.....	480
2.2 Field test	481
A. Chicken broiler farm test.....	481

3. Epidermal growth factors, EGF	483
3.1. Cosmetic development using EGF and Stability assessment.....	483
A. Example of toner recipe.....	483
B. Example of essence recipe.....	484
C. Measurement of cosmetic stability	485
D. Measurement of viscosity change.....	486
E. Examination of temperature stability.....	487
F. Safety experiment by patch test.....	488
4. Fibrinolytic protease, PLSP3	489
4.1. Measurement of enzyme activity.....	489
A. Semi-quantitative enzyme assay	489

Chapter 4. Accomplishment and Contribution to the Related Field..... 491

I. Total Research and Development Goals and Accomplishment 491

1. Total Research and Development Goals and Accomplishment..... 491

1.1. Goals of research accomplishments..... 491

1.2. Application of research accomplishments..... 491

II. Achievement of Annual R&D Goals and Contribution to Related Fields..... 492

1. Development of productive system for higher value-added and useful proteins using target sequence of fruiting body primordium-related proteins in mushroom..... 492

A. Achievement of Research and Development (1st year) and the Related Fields..... 492

B. Achievement of Research and Development (2nd year) and the Related Fields..... 493

C. Achievement of Research and Development (3rd year) and the Related Fields..... 494

2. Breeding of new mushroom species enriched with biological functionality	495
A. Achievement of Research and Development (1st year) and the Related Fields.....	495
B. Achievement of Research and Development (2nd year) and the Related Fields.....	496
C. Achievement of Research and Development (3rd year) and the Related Fields.....	497
3. Evaluation viewpoint and criteria	498
Chapter 5. Outcome of Research and Development and Its Application	500
I. Outcome of Research and Development	500
1. Research Paper and Poster Presentation in Conference	500
1.1. Domestic research paper.....	500
1.2. International research paper.....	501
1.3. Meeting & poster.....	502
2. Patent Registration and Application	505
2.1. Patent registration.....	505
2.2. Patent application.....	508
II. Application of R&D Outcome	517
1. Technology Transfer	517
2. Product Development by Technology Transfer	522
3. Application of the Developed Technology and Sales Strategy (by Serom Bio)	523
3.1. Application of the developed technology.....	523

3.2. Sales plan.....	523
4. Application to Other Research.....	524
Chapter 6. Foreign Technological Informations.....	525
Chapter 7. Research Facility and Equipments.....	526
Chapter 8. References.....	527

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	67
제 1 절	연구개발의 목표	67
1.	연구개발의 최종목표	67
2.	연구개발의 성격	67
가.	새송이버섯의 일반적 특성	68
나.	버섯 원기형성 및 자실체	69
다.	유용유전자 소재 및 기능	71
제 2 절	연구개발의 필요성	77
1.	연구개발 목적	77
가.	연구개발 목적	77
나.	연구개발 총괄 목표	77
다.	연구개발 세부 목표	77
라.	연구개발 과제의 차별성	78
2.	연구개발 필요성	79
제 2 장	국내외 기술개발 현황	83
제 1 절	국외 기술개발 현황	83

1. 국외 버섯 연구동향.....	83
가. 연구논문 동향.....	83
나. 특허 동향.....	85
2. 국외 GM 작물현황.....	86
3. 국외 바이오시밀러 동향.....	89
가. 국외 바이오산업 동향.....	89
나. 국외 바이오시밀러 동향.....	89
4. 국외 기능성 건강식품 동향.....	96
제 2 절 국내 기술개발 현황.....	99
1. 국내 버섯 연구동향.....	99
가. 국내 연구논문 동향.....	99
나. 국내 특허 동향.....	101
2. 국내 GM 작물현황.....	102
3. 국내 바이오시밀러 동향.....	103
가. 국내 바이오산업 동향.....	103
나. 국내 바이오시밀러 동향.....	106
4. 국내 기능성 건강식품 동향.....	110

제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	112
제 1 절	제 1세부	112
1.	연구개발 수행 내용 및 방법	112
가.	연구개발 추진전략 및 방법	112
나.	연구개발 수행 내용 및 방법	113
2.	연구결과	121
가.	새송이 버섯 일반 현황	121
(1)	새송이 버섯	121
(2)	새송이 버섯 실험 현황	121
나.	새송이 버섯 균사체 배양조건 확립	122
(1)	새송이 버섯 균사체 배양 조건	122
(가)	탄소원에 따른 균사체 생육 변화	122
(나)	질소원에 따른 균사체 생육 변화	123
(다)	Yeast extract에 따른 균사체 생육 변화	123
다.	새송이 버섯 원기 및 자실체 형성 조건 확립	124
(1)	새송이 버섯 자실체 유도 과정	124
라.	새송이 버섯 균사체 형질전환법 확립	126
(1)	원형질체를 이용한 형질전환법	128
(가)	새송이 버섯 항생제 내성 시험	128
(나)	균사체 배양 및 원형질체 형성	128
(다)	원형질체를 이용한 REMI 형질전환	131
(2)	General <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	133

(3) <i>Agrobacterium</i> 법을 이용한 새송이 균사체의 형질전환 효율 증진	134
(가) 일반적인 <i>Agrobacterium</i> 형질전환 및 Hygromycin 저항성	134
(나) 상해를 이용한 <i>Agrobacterium</i> 법	134
마. 새송이 버섯 cDNA library 구축	137
(1) 새송이 버섯 total RNA 추출	137
(2) 새송이 버섯 cDNA library 제조	137
(가) Poly(A) ⁺ RNA 분리	137
(나) First & second cDNA 합성	138
(다) Phage vector의 packaging 및 library amplification	139
바. 새송이 버섯 genomic DNA library 구성	141
(1) 새송이 버섯 genomic DNA 추출	141
(2) Genomic DNA library 제조	141
(가) 제한효소 처리 및 size fractionation	141
(나) Packaging & Amplificatio	142
사. 원기형성 분비물의 단백질 분석	143
(1) 원기 시스템	143
(2) 원기형성 분비물의 수집	144
(3) 원기형성 분비물의 단백질 분석, 아미노산 서열 분석 및 단백질 동정	145
(가) 1차 분석 (SDS-PAGE)	145
(나) 2차 분석 (2-Dimensional electrophoresis)	149
(다) 3차 분석 (SDS-PAGE)	152
(4) 원기형성 분비물 단백질에 대한 부분 유전자 확보 및 염기서열 분석	154
아. 원기형성 분비물 단백질에 대한 유전자 확보	157
(1) Laccase 유전자의 PCR 증폭	157
(2) Laccase 유전자의 염기서열 분석	158

자. Fungal 및 Plant Vector를 이용한 secretion vector 구성	159
(1) 식물벡터 pPEV에서 human growth hormone 유전자의 발현 및 분비	159
(가) 분비벡터 pPEVpR1b 구성	159
(나) 분비벡터 pPEVpR1b에 human growth hormone 유전자의 도입	160
(다) Fungal transformation	161
(라) 새송이 버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현	163
(2) Fungal vector인 pBARGPE1 vector를 이용한 분비벡터 제조	164
(가) 분비벡터 구성의 전체 전략	164
(나) pBARGPE1 vector로 laccase promoter 및 signal sequence 도입	165
(다) pBARGPE1 vector로 laccase signal sequence 도입	167
(3) Fungal vector인 pCAMBIA1302 vector를 이용한 분비벡터 제조	168
(가) 새송이 버섯 항생제 내성 현황	169
차. 새송이 버섯에서 사용되는 목적단백질 현황	171
카. Promoter 및 분비서열을 포함하는 벡터 구성 및 Green fluorescent protein 발현	172
(1) CaMV 35S promoter를 포함하는 벡터구성 (pCam35S)	175
(가) 클로닝 전략	175
(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	176
(다) 염기서열 분석	177
(라) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	178
(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	179
(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCam35S)의 GFP 분석	180
(2) CaMV 35S promoter 및 pR1b 분비서열을 포함하는 벡터구성(pCam35SpR1b)	181
(가) 클로닝 전략	181
(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	182
(다) 염기서열 분석	183
(라) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	184
(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	185
(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCam35SpR1b)의 GFP 분석	186
(3) CaMV 35S promoter 및 laccase 분비서열을 포함하는 벡터구성(pCam35SLacS)	187
(가) 클로닝 전략	187
(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	188

(다) 염기서열 분석	189
(라) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	190
(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	191
(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCam35SLacS)의 GFP 분석	192
(4) Laccase promoter를 포함하는 벡터구성 (pCamLacP vector)	193
(가) 클로닝 전략	193
(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	194
(다) 염기서열 분석	195
(라) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	196
(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	197
(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCamLacP)의 GFP 분석	198
(5) Laccase promoter 및 pR1b 분비서열을 포함하는 벡터구성(pCamLacPpR1b)	199
(가) 클로닝 전략	199
(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	200
(다) 염기서열 분석	201
(라) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	202
(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	203
(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCamLacPpR1b)의 GFP 분석	204
(6) Laccase promoter 및 laccase 분비서열을 포함하는 벡터구성(pCamLacPS)	205
(가) 클로닝 전략	205
(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	206
(다) 염기서열 분석	207
(라) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	208
(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	209
(바) 새송이버섯의 형질전환체(pCamLacPpR1b)의 GFP 분석	210

타. Laccase promoter 및 Lac promoter/분비서열을 포함하는 벡터로 유용유전자 도입
(Intracellular expression)

(1) Laccase promoter를 포함하는 pCamLacP vector로 유용유전자 도입	211
(가) 클로닝 전략	211
(2) Laccase promoter/신호서열을 포함하는 pCamLacPS vector 및 pCamLacPpR1b vector 로 유용유전자 도입 (Extracellular expression)	212
(가) 클로닝 전략	212
(3) 발현 및 분비를 위한 target 유전자	214

(가) Human growth hormone	214
(나) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	214
(다) Colony stimulating factor	215
(라) Surfactant protein B	215
(마) Epidermal growth factor	216
(바) Erythropoietin	216
(4) Target 유전자 증폭 및 분리	217
(가) Human growth hormone	217
(나) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	217
(다) Colony stimulating factor	218
(라) Surfactant protein B	218
(마) Epidermal growth factor	219
(바) Erythropoietin	220
(5) Laccase promoter를 포함하는 pCamLacP 벡터로 유용유전자 도입	221
(가) Human growth hormone	221
① 클로닝 전략	221
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	222
③ 염기서열 분석	222
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	223
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	224
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	225
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현	226
(나) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	227
① 클로닝 전략	227
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	228
③ 염기서열 분석	228
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	229
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	230
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	231
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 PLSP3 유전자 발현	232
(다) Colony stimulating factor	233
① 클로닝 전략	233
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	234
③ 염기서열 분석	234
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	235

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	236
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	237
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 CSF 유전자 발현	238
(라) Surfactant protein B	239
① 클로닝 전략	239
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	240
③ 염기서열 분석	240
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	241
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	242
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	243
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 SPB 유전자 발현	244
(마) Epidermal growth factor	245
① 클로닝 전략	245
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	246
③ 염기서열 분석	246
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	247
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	248
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	249
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 EGF 유전자 발현	250
(바) Erythropoietin	251
① 클로닝 전략	251
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	252
③ 염기서열 분석	252
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	253
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	254
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	255
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 EPO 유전자 발현	256
(6) Lac promoter/분비서열을 포함하는 pCamLacPS 벡터로 유용유전자 도입	257
(가) Human growth hormone	257
① 클로닝 전략	257
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	258
③ 염기서열 분석	258
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	259
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	260
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	261

⑦ 새송이 버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현	262
⑧ 새송이 버섯 균사체 증식비교	263
⑨ 새송이 버섯 균사체(대량생산)에서 hGH 유전자 발현	264
(나) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	266
① 클로닝 전략	266
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	267
③ 염기서열 분석	267
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	268
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	269
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	270
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 PLSP3 유전자 발현	271
⑧ 새송이 버섯 균사체 증식비교	272
(다) Colony stimulating factor	274
① 클로닝 전략	274
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	275
③ 염기서열 분석	275
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	276
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	277
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	278
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 CSF 유전자 발현	279
(라) Surfactant protein B	280
① 클로닝 전략	280
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	281
③ 염기서열 분석	281
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	282
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	283
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	284
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 SPB 유전자 발현	285
(마) Epidermal growth factor	286
① 클로닝 전략	286
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	287
③ 염기서열 분석	287
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	288
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	289
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	290

⑦ 새송이 버섯 균사체에서 EGF 유전자 발현	291
⑧ 새송이 버섯 균사체 증식비교	292
(바) Erythropoietin	294
① 클로닝 전략	294
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	295
③ 염기서열 분석	295
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	296
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	297
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	298
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 EPO 유전자 발현	299
(7) Lac promoter/pR1b 분비서열을 포함하는 pCamLacPpR1b 벡터로 유용유전자 도입	300
(가) Human growth hormone	300
① 클로닝 전략	300
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	301
③ 염기서열 분석	301
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	302
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	303
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	304
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현	305
⑧ 새송이 버섯 균사체 증식비교	306
⑨ 새송이 버섯 균사체(대량생산)에서 hGH 유전자 발현	307
(나) PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	309
① 클로닝 전략	309
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	310
③ 염기서열 분석	310
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	311
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	312
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	313
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 PLSP3 유전자 발현	314
(다) Colony stimulating factor	315
① 클로닝 전략	315
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	316
③ 염기서열 분석	316
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	317

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	318
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	319
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 CSF 유전자 발현	320
(라) Surfactant protein B	321
① 클로닝 전략	321
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	322
③ 염기서열 분석	322
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	323
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	324
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	325
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 SPB 유전자 발현	326
(마) Epidermal growth factor	327
① 클로닝 전략	327
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	328
③ 염기서열 분석	328
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	329
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	330
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	331
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 EGF 유전자 발현	332
⑧ 새송이 버섯 균사체 증식비교	333
(바) Erythropoietin	335
① 클로닝 전략	335
② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인	336
③ 염기서열 분석	336
④ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인	337
⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별	338
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR	339
⑦ 새송이 버섯 균사체에서 EPO 유전자 발현	340
(8) 형질전환 자실체 분석	341
(가) PCR analysis	341
① Human growth hormone	342
② PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	345
③ Colony stimulating factor	348
④ Surfactant protein B	351
⑤ Epidermal growth factor	354

⑥ Erythropoietin	357
(나) RT-PCR analysis	360
① Human growth hormone	361
② PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	364
③ Colony stimulating factor	367
④ Surfactant protein B	370
⑤ Epidermal growth factor	373
⑥ Erythropoietin	376
(다) 새송이 버섯 자실체에서 유전자 발현	379
① Human growth hormone	379
② PLSP3 (<i>Periserrula leucophryna</i> serine protease)	380
③ Epidermal growth factor	381
(라) 유용유전자 분비벡터 mRNA 이차구조 분석	382
제 2 절 협동과제	384
1. 연구개발 수행 내용 및 방법	384
가. 연구내용	384
2. 연구결과	387
가. 새송이 균사체 생육촉진 연구	387
(1) 커피박 (Spent coffee ground: SCG)을 이용한 새송이 균사체 생육촉진	387
(가) 균사체 배양 및 생육측정 결과	388
(나) 생장촉진 균사체의 기능성 분석	390
(2) SCG를 이용한 새송이 병채배에서의 균사체 증식	392
(가) 균사체 배양 및 생육 측정 결과	393
(3) 기타 성분첨가 배지에서의 새송이 배양	394
(가) 기타 천연물 첨가 및 균사체 생육의 변화	395
(나) 당근찌꺼기를 이용한 배지 제조	396
(다) 자실체 배양	399
① Metal ion 첨가에 의한 자실체 생성 변화	399
② 당근 추출액 첨가에 의한 자실체의 성분변화	401

나. 색소유전자 cloning 연구.....	402
(1) Pigments	402
(2) Transcription factor에 의한 색소 생합성관련 유전자발현 조절 및 genetic engineering	403
(3) Carotenoids 생합성 및 Genetic Engineering	404
(4) 색소 생합성관련 유전자 cloning	407
(가) Cloning	407
(나) PAC gene for carotenoid biosynthesis	407
(다) <i>Haematococcus pluvialis</i> 로부터의 β -C-4 Oxygenase (crtO) RT-PCR cloning	411
(라) Myb gene cloning	415
다. 색소 관련 유전자 도입	419
(1) 고등담자균류에서의 형질전환 vector	419
(2) 발현 vector의 개발	421
(가) pBARGPE1 vector cloning	421
(나) gpd promoter cloning	421
① Fungal genomic DNA 분리	423
② Gpd promoter cloning	423
③ GUS 발현을 통한 gpd promoter 활성 비교	225
(다) 색소유전자 발현 vector 제조	426
① Cloning	426
② Subcloning into expression vector	426
라. 색소관련유전자 균사체 형질전환, 기능성검정, 자실체 생산	428
(1) pCamPAC, pCamcrtO 및 pCammyb의 균사체 도입 및 확인	428
(2) EPS (exopolysaccharides)의 기능성 검정	430
(3) 자실체 생산	432
(4) 색소관련 유전자 발현 확인	434
(가) 유전자 삽입확인	434
(나) 유전자발현의 확인	434
(다) 고찰	435

마. Mouse모델이용 식용 간염백신용 새송이 개발.....	436
(1) 식용백신개발 배경	436
(2) 버섯균류의 특징	438
(3) Hepatitis B virus antigen (HBsAg) cloning	439
(가) HBsAg cloning과 대장균발현	440
(나) HBsAg 발현백터 제작.....	442
(4) Fungal transformation.....	442
(가) 새송이 형질전환 및 HBsAg 발현.....	443
(나) 기타 버섯류의 균사체 형질전환.....	447
(5) HBsAg 발현 새송이 균사체를 이용한 식용간염백신 개발.....	450
(가) 배경.....	450
(나) 새송이 균사체의 면역안정성 평가.....	451
① Mice에 균사체 투여 및 체중과 기관 변화.....	451
② 혈청내 IgE와 IgG 비장세포 배양액내 cytokine와 IgG 측정.....	452
③ 면역병리 비교 결과	453
④ 균사체 투여 및 체액면역의 변화.....	454
⑤ 균사체 투여가 면역에 미치는 영향.....	455
(다) HBsAg 균사체의 경구투여에 의한 항체형성 분석.....	455
① HBsAg 균사체의 mouse투여.....	457
② HBsAg 항체형성 분석 결과(Prime + oral).....	458
③ HBsAg 항체형성 분석 결과(Prime + oral/booster + oral).....	458
(라) 결론.....	459
바. 향당노 기능성 식용백신의 개발.....	460
(1) Glutamic acid decarboxylase (GAD67) cloning	460
(가) Bacterial cloning과 발현.....	461
(나) 새송이 발현용 GAD67 발현백터 제작	463
(2) 균사체 GAD67 발현분석.....	463
(가) 균사체 형질전환 및 확인.....	463
(나) Microwave-assisted protein extraction과 western blot에 의한 GAD67 발현 확인	463
① Microwave-assisted protein extraction.....	464
② Microwave-assisted DNA extraction.....	466

(3) 항당뇨기능성 식용백신연구.....	467
(가) GAD67 균사체의 NOD mice 투여.....	467
(나) 당뇨병 발현에 의한 치사율 (1차 시험).....	467
(다) 당뇨병 발현에 의한 치사율 (2차 시험).....	468
(라) GAD67 균사체 투여군과 대조군간 혈당치 비교 (1차 시험).....	469
(마) GAD67 mycelium 투여 농도별 혈당치의 경시적 변화 (2차 시험)	469
(바) 결론.....	470
제 3 절 생물학적 활성	471
1. <i>In vitro</i>에서 세포 활성	472
가. <i>In vitro</i> (Insulinoma cell)에서 세포 활성 측정.....	472
(1) RINm5F Cell의 특성	472
(2) 세포주 및 세포배양 조건	473
(3) 세포 활성 측정 (Cell viability assay).....	473
2. 성장호르몬 (human growth hormone).....	475
가. <i>In vivo</i> 에서 hGH의 생물학적 활성 측정	475
(1) 시료제조에 의한 실험동물 투여	475
(2) 생물학적 활성 검정	475
(가) 체중 증가, 식이량 및 음용수 변화 측정.....	475
(나) 생화학적 분석.....	477
① 기관무게 측정.....	477
② 혈중 지질 농도 측정.....	477
③ 혈중 parameter (Ca, ALP, BALP) 변화 측정.....	478
④ 혈중 성장관련 인자들(GH, IGF-1, GHRF)의 변화.....	479
⑤ 뼈 성장 측정.....	480
나. Field 실험	481
(1) 육계 사육 농장 실험.....	481

3. 상피성장인자(epidermal growth factors, EGF).....	483
가. EGF를 이용한 화장품 개발 및 안정성 평가.....	483
(1) 토너 예시 처방.....	483
(2) 에센스 예시 처방.....	484
(3) 화장품 안정성 측정	485
(4) 경시적 점도 변화 측정.....	486
(5) 온도별 경시적 안정도 관찰.....	487
(6) Patch test를 통한 안전성 실험.....	488
4. 혈전용해제 (Fibrinolytic protease, PLSP3).....	489
가. 효소 활성 측정.....	489
(1) Semi-quantitative Enzyme Assay	489

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 491

제 1 절 총괄 연구개발 목표 달성도 491

1. 총괄연구목표 및 달성도.....	491
가. 연구성과 목표.....	491
나. 연구성과 활용 목표.....	491

제 2 절 연도별 연구개발 목표 달성도 및 관련분야 기여도 492

1. 제 1 세부 : 버섯 원기형성 관련 단백질 분비서열을 이용한 유용단백질 생산시스템 개발	492
가. 1차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도.....	492
나. 2차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도.....	493

다. 3차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도	494
2. 제 2 세부 협동과제 : 세송이버섯 형질전환법 개발에 의한 기능성 강화 버섯 품종 개량	495
가. 1차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도	495
나. 2차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도	496
다. 3차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도	497
3. 평가의 착안점 및 기준	498
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	500
 제 1 절 연구개발 성과	500
1. 연구논문 및 학술대회 발표	500
가. 국내 연구논문	500
나. 국제 연구논문	501
다. 학술대회 발표	502
2. 특허 등록 및 출원	505
가. 특허등록	508
나. 특허출원	517
 제 2 절 연구성과 활용 계획	517
1. 기술이전	522
2. 기술이전에 의한 상품개발	523

3. 개발기술 활용계획 및 판매 전략 (그린팜).....	523
가. 개발기술 활용계획.....	523
나. 판매계획.....	523
4. 타 연구 활용계획.....	524
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	525
제 7 장 연구시설 장비 현황.....	526
제 8 장 참고문헌.....	527

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 연구개발의 최종목적

본 연구에서는 새송이버섯에서 자실체 원기 형성 관련 단백질들의 특성 분석 및 target 서열을 밝히고, 관련 단백질들의 유전자를 분리하여 특성을 조사하며, fungal 및 식물 벡터를 이용하여 promoter 및 target 서열이 도입된 분비벡터를 제조한 후, 고부가 가치의 유용단백질인 EPO (erythropoietin), EGF (epidermal growth factor), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), hGH (human growth hormone), 혈전용해제 (fibrinolytic enzyme), 계면활성제 단백질 (surfactant protein) 등의 유전자를 도입하여 새송이버섯에 형질전환시켜 식품으로 안정성이 확보된 버섯의 원기 (primordium) 및 균사체에서 새로운 개념의 단백질 대량생산의 공장 시스템을 개발하여 고부가가치 창출 및 바이오시밀러 시대를 대비한 산업화의 의학소재 원료를 제공하려 함이고, 또 다른 목적으로서 색소유전자 (Anthocyanin, β -carotene) 및 식용백신 관련 유전자 (HBsAg, GAD)가 도입되어 기능성이 강화된 새로운 새송이 품종을 개발하여 FTA 시장개방에 따른 국내 시장의 보호 및 GMO 규제 완화에 의한 방어적 개념의 특허를 선점하고 미래 시장의 잠재성에 대비한 신품종 개발의 원천 기술력을 확보하려 함이다.

궁극적으로 기능적이 첨가된 농산물 (새송이버섯)을 소재화하여 고부가가치의 기능성식품 (의약 및 화장품 원료, 기능성 사료첨가제 등)을 개발함으로써 농업은 고부가가치 산업으로, 농촌은 녹색산업기반의 발전모델을 제시하며, 국민보건 향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고하고자 한다.

2. 연구개발의 성격 및 현황

가. 새송이버섯의 일반적 특성

버섯이란 계통 분류학적 관점이 아닌 인위적인 분류군으로서의 육안으로 식별할 수 있을 만큼 자실체를 크게 형성하는 균류로 대부분의 담자균류와 일부 자낭균류가 이에 속한다. 새송이버섯, 일명 큰 느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)은 분류학적으로 느타리버섯과(*Pleurotaceae*), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하는 버섯으로서 버섯의 줄기가 일반 느타리에 비해 굵고 길며, 주로 아열대지방의 대초원에서 발생하며 분포지역은

유럽남부, 중앙아시아, 아프리카북부, 러시아남부 등지에서 자생하는 버섯이다. 일반명은 King Oyster Mushroom 또는 Boletus of the Steppes로 우리말로 왕(큰)굴버섯 또는 초원 버섯으로 해석되지만, 우리나라에서는 큰느타리버섯으로 품종등록이 되어 있고, 상품명인 새송이버섯으로 정착되어 있다.



새송이버섯은 맛과 향이 좋아 소비가 늘어나고 있으며, 다른 버섯에 비해 가공 전의 상태에서도 저장성이 좋고, 수분함량이 낮아 수출 상품으로써 가치가 매우 높아 농가의 소득원으로 기대가 큰 버섯이다. 버섯의 소비량은 국민소득과 비례하며, 세계적으로 버섯 생산량은 매년 3~4% 정도 증가하고 있는 추세에 있으며, 새송이버섯의 경우 일본에서는 90년대 후반부터 인기품목의 하나로 버섯시장을 주도하고 있으며, 현대인들에게 많은 수요를 창출해 낼 수 있는 가능성을 가지고 있다. 새송이버섯은 자실체의 균사조직이 치밀하여 육질감이 뛰어나 맛이 탁월하고 자연산 송이와 식미가 거의 유사하며, 영양적인 측면에서도 비타민 C가 풍부하고 필수아미노산을 다양하게 함유하고 있으므로 생산 가치가 매우 높고, 특히 다른 버섯에는 없는 비타민 B₁₂(악성빈혈치유인자)를 함유하고 있다. 최근 새송이버섯에 대한 영양학적 가치와 저칼로리 식품으로써 단백질, 비타민 및 각종 무기성분이 풍부하게 함유된 건강식품으로 각광을 받고 있으며, 해마다 다이어트 식품으로서의 그 소비가 증가함에 따라 재배면적 및 재배농가의 증가와 더불어 그 이용 방법도 다양화되고 있는 실정이다.

- 분류 : 균계, 담자균문, 담자균강 주름버섯목 느타리과 느타리속, 새송이
- 영문명 : **Pleurotus eryngii** (King Oyster mushroom, 왕 큰굴버섯, 또는 초원버섯)
- 큰느타리버섯으로 품종 등록, 느타리 품종개량, 상품명은 새송이버섯
- 분포 : 아열대 지방 대초원에서 발생, 유럽남부, 중앙아시아, 아프리카북부, 러시아남부
- 특성 : 자실체 균사조직이 치밀하여 맛과 향이 좋고 다른 버섯에 비해 수분함량이 낮아 수출 상품으로써 가치가 매우 높아 농가의 소득원으로 기대가 큰 버섯
- 생리물질 : 고함량 Vit C, 칼슘, 각종 미네랄, 필수아미노산, 식이섬유, Vit B₆, Vit B₁₂ (악성빈혈치유인자), tyrosinase 등
- 효과 : 건강웰빙식품, 해독작용, 면역증강, 항암효과, 장기능 및 위보호 효과, 고혈압, 항산화, 노화방지, 다이어트 효과 등
- 1997년 경남농업기술원에서 국내 최초 재배기술개발 농가보급
- 버섯 생산량은 매년 3-4% 증가, 소비증가와 더불어 재배면적 및 재배농가 증가

〈새송이버섯 생산량〉

(단위:ha, 천톤)

구 분	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
재배면적	122	183	249	207	231	155	134 ^{자동화}	
생산량	18	33	43	43	46	46	37	44

〈연도별 수출실적〉

(단위 : 톤, 천불)

구 분	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
물 량	1	15	66	223	362	932	1,989	3,177
금 액	122	164	229	948	1,631	3,455	7,298	9,667

〈국가별 수출실적〉

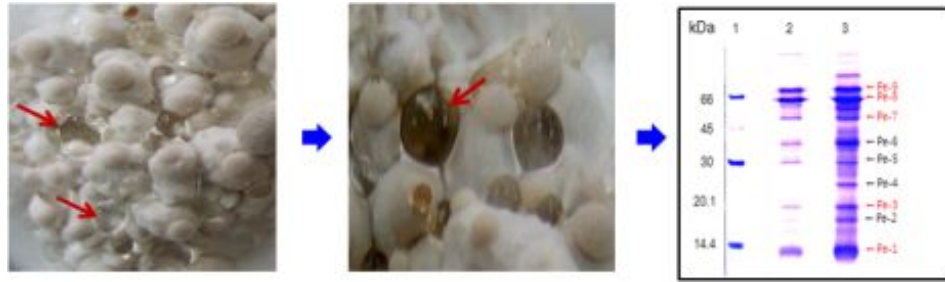
(단위 : 톤, 천불)

구 분	2006		2007		2008		2009	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액
미 국	74	298	285	808	584	1,594	1,612	3,585
네덜란드	183	856	401	1,921	695	3,613	529	2,412
캐나다	3	14	40	104	195	614	238	710
호 주	9	36	84	338	71	249	178	599
홍 콩	1	3	45	74	160	191	146	470

(2010 농림부, 농수산물유통공사, 산림청 임업통계연보)

나. 버섯 원기형성 및 자실체

원기 (primordium)는 균사체에서 자실체 형성 시 나타나는 분비물로서, 원기발달의 초기단계에서는 균사가 더 이상 가지를 치지 않는 특징을 보이며, 원기가 형성되는 지역의 균사는 외부로 자라지 않고, 곧바로 균사의 막이 두터워지고 균사의 직경이 변화되기 시작한다. 따라서 자실체의 기간 (基幹)이 되는 자실체 원기가 발생하며, 원기를 경유하여 비로소 자실체가 형성되는 것이다.



<원기형성 및 분비물내 단백질>

모든 버섯은 자실체내에 삼투압 관련 당 성분을 만들어 내며, 이들 당성분을 자실체 표면에 내어 놓으면, 자실체 표면에 거주하는 미생물들이 그 삼투압 관련 당을 먹어 치워야 온전한 자실체로 발달이 가능하게 된다. 자실체 표면의 당 농도가 낮고 자실체 체내의 당 농도가 높아야 버섯은 그 당성분의 농도 편차로 인하여 외부의 수분을 끌어들이고 버섯 자실체의 부피가 커져서 점차 성숙한 버섯 자실체로 발달이 가능하게 되는데, 대표적인 미생물의 예가 *Pseudomonas fluorescens* 이다. 이들이 느타리나 새송이, 표고버섯 등의 표면에 자라서 표면에 존재하는 삼투압관련 당 성분을 먹어 치울 때 버섯은 아주 건강하게 자란다.

균사가 가지를 치고 균사끼리 융합이 일어나면 균사격자(hyphallattices) 같은 것이 형성되고, 이 균사격자는 기중균사(aerial hyphase)를 형성한다. 이 때 기중균사는 2핵끼리 서로 접합하여 직경이 0.1-0.2 mm 정도되는 접합체를 형성한다. 원기의 성장에는 외적성장(gymnocarpic, 바깥쪽으로 자라는 것으로 밖에서 관찰이 가능함)과 내적성장(angiocarpic, 내부로 자라는 것으로 감싸여져 있고 보통 버섯의 버턴단계와 유사함)의 두가지로 나눌 수 있다.

버섯 자실체의 발생은 빛에 의해 유기되거나 촉진되고, 자실체의 분화 생육에도 빛이 있어야 한다. 따라서 자실체 발생에 적당한 광량은 80~120 Lux 이지만 이보다 낮은 광량에서도 발생이 가능하며 대부분의 담자균은 근자외선부터 청색 영역의 빛이 유효하고, 원기 형성이나 자실체의 갓이 분화하는 데는 330~520 nm 파장이 효과가 높은 것으로 밝혀졌다. 버섯의 원기 형성에는 적은 양의 빛이 필요하지만, 버섯이 생육할 때 광량이 부족하면 색깔이 나타나지 않고 대가 길어진다. 이와 반대로 광량이 많으면 버섯의 대가 짧아지고 색깔이 진해져 품질이 불량하므로 알맞은 광량을 유지하여야 한다. 발이유기 후 7~8일이 지나면 배지표면에 낱알모양의 원기가 덩어리로 형성되고, 계속해서 원기덩어리가 솟아오름과 동시에 원기 선단부가 갓으로 분화되기 위해 흑갈색으로 착색되어 작은 구슬모양을 하면서 9~10일 쯤에 어린 자실체가 형성된다. 이때부터 자실체의 생육단계로 들어가게 된다.

다. 유용유전자 소재 및 기능

유용유전자		대상 유전자	현 황	비 고
GFP		Green Fluorescence Protein (GFP)	<ul style="list-style-type: none"> 특정 파장의 빛을 흡수하여 활성화, 정상상태로 돌아가는 과정에서 특정 파장 빛을 외부로 발산, 독특한 색의 빛을 내는 단백질 표지 유전자로 사용: 형질전환벡터개발, promoter 세기 측정, 단백질 발현과정 추적, 세포내 위치, 암세포 위치 파악 등에 사용 	녹색(GFP), 적색(RFP) 청색(BFP), 황색(YFP)
EPO		Erythropoietin (EPO) (2008 수출 현황: LG : 500 만불, CJ : 343만불)	<ul style="list-style-type: none"> 적혈구 계열 전구세포의 성장 분화 촉진 당단백질(빈혈, 산부전증, 항암치료보조제, AIDS 치료 등에 사용). 고가의 약품(60만불/1g), 미국, 일본에서 각각 10조원 시장 형성 2009년 6월 시장(120억불), 시장전망도 7-10% /년 증가 추세 	동아제약, LG, CJ, 조이제약, Amgen, 존슨앤존슨
EGF		Epidermal Growth Factor (EGF)	<ul style="list-style-type: none"> 상피세포성장인자: 피부 표면 수용체와 결합 선세포 생산 촉진 EGF 배양로산: 0.1µg/ml(0.00001%) 최고 872%, 평균 284% 성장 영양기는 2백만불/1g, EGF 성분 함유 화장품 개발 백화 외상-성형수술-노화방지 화장품, 정상, 특수개발 : 2010년 1800억원 	대웅제약, 넥스젠, 국내 화장품회사, Stanley Cohen(1989노벨상)
CSF		Granulocyte Colony Stimulating Factor	<ul style="list-style-type: none"> 혈액전구세포 분화 시 필요한 베타 인터페론 조절인자 암환자 백혈구 수치 증가 시 사용. G-CSF (1991 Amgen 상용화) 6억원/1g, 세계시장 규모 36억불, transgenic animal 생산 (엠젠) 	동아제약, 엠젠바이오, 신바이오(인도에 라이선스 및 판매승인)
혈전용해제		Human Growth Hormone (hGH)	<ul style="list-style-type: none"> 뇌하수체전엽에서 분비, 대사 및 성장 촉진, 건세포막에 존재하는 수용체 결합 IGF-1 생성, 세포 분화 및 증식 동아제약(동물세포), LG(미생물)에서 생산, 국내시장(60억원) 	동아제약, LG 세계시장 15조
Surfactant		Fibrinolytic Protease (PLSP3)	<ul style="list-style-type: none"> 뇌졸중, 심근경색, 폐색전증 등에 사용 우리나라 1종1속인 현이백장갯지렁이로부터 분리 (특허보유) 일반적 간접 용해용해제 (tPA, urokinase, streptokinase) 대체 가능 	전세계 환자 4천만명 추정 연간 3조원 규모
β-carotene		Surfactant Protein (SP)	<ul style="list-style-type: none"> 신생아 호흡곤란증후군: 폐의 표면활성제 (surfactant protein) 상설제 기원 SP-A, B, C, D 4종류, SP-B 단백질이 신생아 폐기능에 중요 활성화 단백질의 경우 80개 아미노산으로 구성 (8.7 kDa) 	유한양행, 국내 시장 규모는 약 70억 정도
Anthocyanin				

(1) Green Fluorescence Protein (GFP)

형광 단백질은 특정 파장의 빛을 받을 경우 이를 흡수하여 활성화가 된 다음, 다시 정상 상태로 되돌아가는 과정에서 특정 파장의 빛을 외부로 발산함으로써 독특한 색깔의 빛을 내는 단백질이다. 표지 유전자 (reporter gene)로 사용하여 형질전환용 벡터 개발, promoter 세기 측정, 단백질의 발현 과정 추적, 세포내 위치 등을 쉽게 알 수 가 있으며, 의학적인 관점에서도 암세포나 종양세포의 위치를 파악하는데도 사용한다. 대표적인 형광 단백질로는 녹색 형광을 나타내는 GFP (Green Fluorescence Protein)를 비롯해 적색의 RFP, 청록색의 CFP, 청색의 BFP, 황색의 YFP 등 많은 종류의 형광 단백질들이 개발되어 사용하고 있다. GFP는 특별한 기질이나 조효소 및 효소의 사용 없이도 검출이 가능한 특징을 가지고 있으며, 실험이 신속해진다는 여러 장점들을 가지고 있다. 따라서 본 실험에서도 GFP 유전자 앞쪽으로 프로모터 및 신호서열 클로닝에 의해 프로모터 세기 및 대상유전자 발현 등을 측정하기 위한 reporter 유전자로 사용하였다.

(2) Erythropoietin (EPO)

EPO란 사람의 신장에서 주로 생성되는 것으로 적혈구 계열 전구세포의 성장 및 분

화를 촉진시켜 성숙한 적혈구의 생성을 도와주는 역할을 하는 적혈구 조혈자극 단백질 제제이며, 신부전증, 빈혈환자뿐만 아니라 자사수혈, 항암제투여 및 AIDS 치료에까지 쓰이는 의약품이다. 사람 몸속의 적혈구 생성물질로 신부전증과 만성빈혈, 항암치료 보조제 등으로 사용되는 EPO는 1g 당 60만 달러를 호가하는 고가의약품으로 미국과 일본에서만 연간 각각 10조원 시장을 형성하고 있으며, EPO는 현재 세계적으로 120억 달러 (현 2009년 6월)의 시장규모를 나타내고 있고 향후 시장전망도 연평균 7~10%이상을 기록할 것으로 예상된다.

조아제약은 2005년 5월 EPO를 형질전환 복제돼지에서 생산한데 이어 2007년 6월에는 EPO 유전자가 도입된 형질전환 복제유산양을 생산하는데 성공하면서 상업성 검증 을 앞두고 있어 투자자들의 지대한 관심을 받고 있다. 형질전환 복제돼지의 유증을 통한 EPO 생산'에 대한 국내특허(등록번호: 10-0769291-0000)가 등록되면서 상업화에 성공할 경우 특허권 행사를 통한 로열티 매출도 가능하게 됐으며, 현재 국제특허도 출원된 상태. 세계에서 EPO를 생산하는 대표적인 회사로는 미국의 바이오기업 암젠과 다국적 제약사 존슨앤존슨 등이며, 국내에서는 동아제약, LG생명과학 (2008년 수출, 500만불) 및 CJ제일제당 (343만불)에서 EPO를 생산하고 있다. N-glycosylation은 단백질 활성화와 면역원성에 크게 영향을 미치며 인체 치료용 단백질의 생산을 위하여서는 인체에 상당하는 N-glycosylation pattern을 기본적으로 지녀야 한다. 치료용 단백질의 생산을 위한 가장 유용한 생물공장으로서는 자실체를 형성하는 담자균류로서 최근 제안되었으며 가장 큰 이유는 N-glycosylation을 위한 platform이 동일하다는 것이므로, engineering을 통하여 인체와 마찬가지로의 당단백질 생산이 가능하게 되었다.

- 유전체 비교분석에 따르면 intermediate oligomannosidic structures 형성은 담자균류, 효모, 식물, 사람 모두 같지만 non-mammalian epitopes으로 인식되는 N-glycan 합성관련 유전자나 hypermannosylation 관련 유전자는 담자균류에는 없는 것으로 밝혀짐.
- 실제 담자균류만이 oligomannosidic structures (Man9GlcNAc2-Man5GlcNAc2)를 합성하는데 이들 형태는 사람의 것과 유사한 것으로 분석됨.
- 담자균인 *S. commune* (치마버섯)에 가장 풍부한 N-glycan 구조는 사람의 N-glycosylation 중간체인 Man5GlcNAc2dhk 동일한 것으로 나타남. 따라서 Man5GlcNAc2 구조는 인간화 N-linked glycosylation의 시발구조로 이용할 수 있음

(1) EPO biological assay (WBC proliferation assay)

- 처리법 최소 8마리 mouse 준비
- 대조군은 0.1% BSA 포함 PBS (PBS-B)를 실험군은 EPO 시료 포함 PBS-B를 주사 단회투여
- + day 1: 10, 30 또는 90 IU EPO/0.5 ml/mouse 피하주사
- + day 5: 안와정맥동으로부터 혈액채취 및 WBC counting 다중투여
- 총 혈액세포에서 적혈구 세포 측정: Automated flow cytometry 이용. Brilliant cresyl blue 염색 및 계수

(2) normocytic mice assay

- 7주령의 B6D/F1 mice를 구입하여 1주간 순화시킨 후 phosphate-albumin buffer로 dilution 한 Sample을 200 ul씩 피하투여(40 ng/head, 20 ng/head, 10 ng/head) 한다.
- 4일 경과 후 채혈한 후 reticulocyte 수치를 측정하여 Parallel line assay를 실시한 결과 confidence limit 이 64~155% 범위를 충족하고, regression, parallelism, linearity가 유효한 조건에서, 실험하고자 한 시료의 potency가 standard와 비교해 80~125% 사이의 범위일 때 두 물질을 동등하다고 판정 한다.

(ii) Galp

	Yeast	Plants	Human	Basidiomycetes
DDH	Man	Man	Man	Man
Man ₅	Man	Man	Man	Man
Man ₆	Man	Man	Man	Man
Man ₇	Man	Man	Man	Man
Man ₈	Man	Man	Man	Man
Man ₉	Man	Man	Man	Man
Man ₁₀	Man	Man	Man	Man
Man ₁₁	Man	Man	Man	Man
Man ₁₂	Man	Man	Man	Man
Man ₁₃	Man	Man	Man	Man
Man ₁₄	Man	Man	Man	Man
Man ₁₅	Man	Man	Man	Man
Man ₁₆	Man	Man	Man	Man
Man ₁₇	Man	Man	Man	Man
Man ₁₈	Man	Man	Man	Man
Man ₁₉	Man	Man	Man	Man
Man ₂₀	Man	Man	Man	Man
Man ₂₁	Man	Man	Man	Man
Man ₂₂	Man	Man	Man	Man
Man ₂₃	Man	Man	Man	Man
Man ₂₄	Man	Man	Man	Man
Man ₂₅	Man	Man	Man	Man
Man ₂₆	Man	Man	Man	Man
Man ₂₇	Man	Man	Man	Man
Man ₂₈	Man	Man	Man	Man
Man ₂₉	Man	Man	Man	Man
Man ₃₀	Man	Man	Man	Man
Man ₃₁	Man	Man	Man	Man
Man ₃₂	Man	Man	Man	Man
Man ₃₃	Man	Man	Man	Man
Man ₃₄	Man	Man	Man	Man
Man ₃₅	Man	Man	Man	Man
Man ₃₆	Man	Man	Man	Man
Man ₃₇	Man	Man	Man	Man
Man ₃₈	Man	Man	Man	Man
Man ₃₉	Man	Man	Man	Man
Man ₄₀	Man	Man	Man	Man
Man ₄₁	Man	Man	Man	Man
Man ₄₂	Man	Man	Man	Man
Man ₄₃	Man	Man	Man	Man
Man ₄₄	Man	Man	Man	Man
Man ₄₅	Man	Man	Man	Man
Man ₄₆	Man	Man	Man	Man
Man ₄₇	Man	Man	Man	Man
Man ₄₈	Man	Man	Man	Man
Man ₄₉	Man	Man	Man	Man
Man ₅₀	Man	Man	Man	Man
Man ₅₁	Man	Man	Man	Man
Man ₅₂	Man	Man	Man	Man
Man ₅₃	Man	Man	Man	Man
Man ₅₄	Man	Man	Man	Man
Man ₅₅	Man	Man	Man	Man
Man ₅₆	Man	Man	Man	Man
Man ₅₇	Man	Man	Man	Man
Man ₅₈	Man	Man	Man	Man
Man ₅₉	Man	Man	Man	Man
Man ₆₀	Man	Man	Man	Man
Man ₆₁	Man	Man	Man	Man
Man ₆₂	Man	Man	Man	Man
Man ₆₃	Man	Man	Man	Man
Man ₆₄	Man	Man	Man	Man
Man ₆₅	Man	Man	Man	Man
Man ₆₆	Man	Man	Man	Man
Man ₆₇	Man	Man	Man	Man
Man ₆₈	Man	Man	Man	Man
Man ₆₉	Man	Man	Man	Man
Man ₇₀	Man	Man	Man	Man
Man ₇₁	Man	Man	Man	Man
Man ₇₂	Man	Man	Man	Man
Man ₇₃	Man	Man	Man	Man
Man ₇₄	Man	Man	Man	Man
Man ₇₅	Man	Man	Man	Man
Man ₇₆	Man	Man	Man	Man
Man ₇₇	Man	Man	Man	Man
Man ₇₈	Man	Man	Man	Man
Man ₇₉	Man	Man	Man	Man
Man ₈₀	Man	Man	Man	Man
Man ₈₁	Man	Man	Man	Man
Man ₈₂	Man	Man	Man	Man
Man ₈₃	Man	Man	Man	Man
Man ₈₄	Man	Man	Man	Man
Man ₈₅	Man	Man	Man	Man
Man ₈₆	Man	Man	Man	Man
Man ₈₇	Man	Man	Man	Man
Man ₈₈	Man	Man	Man	Man
Man ₈₉	Man	Man	Man	Man
Man ₉₀	Man	Man	Man	Man
Man ₉₁	Man	Man	Man	Man
Man ₉₂	Man	Man	Man	Man
Man ₉₃	Man	Man	Man	Man
Man ₉₄	Man	Man	Man	Man
Man ₉₅	Man	Man	Man	Man
Man ₉₆	Man	Man	Man	Man
Man ₉₇	Man	Man	Man	Man
Man ₉₈	Man	Man	Man	Man
Man ₉₉	Man	Man	Man	Man
Man ₁₀₀	Man	Man	Man	Man

(3) Epidermal Growth Factor (EGF)

EGF (세포재생인자/Epidermal growth factor)는 미국의 생물학자 스탠리 코헨 (Stanley Cohen) 박사에 의해 발견된 “상피세포 성장 인자”로 피부의 표면에 있는 수용체와 결합되어 새로운 세포의 생산을 촉진하며 체내에서 형성되는 단백질이며, EGF를 배합한 로션 (EGF 첨가량은 0.1 μ g/ml = 0.00001%)은 EGF 무첨가 로션보다 최고 872%, 평균 284%의 놀랄 만한 높은 세포 성장 효과를 보인다 (미국 특허#5618544).

피부 표면에 있는 수용체 (세포막을 관통하는 당단백질)는 EGF가 세포내에서 포화 상태가 되면 여분의 EGF를 받아들이지 않는 자동 조절 기능이 있으므로 부작용이 없으며, EGF의 현재 원료가는 1 g에 2백만불로서 1 kg 금괴 100개 이상의 값어치를 지닌 고가의 물질이다. 국내 화장품 업계에서도 화장품 원료지정에 관한 규정 개정 (식품의약품안전청고시 제2006-12호, 2006.04.12)에 의해 EGF 성분을 함유한 화장품 개발에 박차를 가하고 있다. EGF 성분이 함유된 화장품을 일부 선보이고 있으나 기술적인 수준의 한계로 인해 큰 효과를 보지 못하고 있으나, 현재 수십 만원대의 고가로 판매 중에 있으며, 미국, 일본, 선진국에서 EGF에 대한 깊은 관심 및 인기몰이 중에 있다. EGF에 대한 생물학적 특성 측정은 다음과 같이 한다.

- Cell proliferation activity
Mouse myelogenous leukemia 유래 부유 세포인 M-NFS-60 cell를 이용하여 측정한다. Cell을 96 well plate에 Cell (1×10^5 cells/50 ul/well)과 Sample (시험용 배지에 농도별로 희석) 50 ul를 처리한 후 incubator에서 44시간 배양한다. (이때, 세포배양용 배지에는 IL-3 (1 ng/ml)을 첨가하여 배양하고, 시험용배지에는 IL-3를 첨가하지 않는다.) MTS solution 20 ul를 넣고 다시 incubator에서 4시간 반응 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 세포증식 활성을 비교 분석한다.

(4) Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) : 과립구 군체 자극인자

혈액세포의 전구세포가 분화될 때 필요한 인자로 골수계 간세포를 증식시켜 과립구나 대식세포로 세포 분화를 촉진하는 펩티드성 조혈 조절인자이며 암환자의 백혈구 수치를 증가 시키는데 사용하고 항암치료 보조제이며 2006년 특허권이 만료되었다.

미국의 암젠사는 1991년 최초로 대장균을 이용하여 G-CSF를 상품화 하는데 성공하였으며, G-CSF는 그램당 가격이 6억원에 이르는 고가단백질로 G-CSF와 GM-CSF 합쳐 세계시장 규모는 36억불 정도이며, 국내 엠젠바이오 (2002년 설립)에서는 미생물에서 발현 이외에 돼지 장기를 사람에게 이식할 수 있는 이종장기 및 동물 젖으로부터 고가의 치료용 단백질 의약품을 대량 생산하는 기술을 개발하고 있다. 국내 선바이오 (1997년 설립)는 PEG-GCSF의 제조에 관한 특허기술을 보유하고 있으며, 이 기술을 인도의 Intas Biopharmaceuticals사에 2003년 11월에 기술이전 라이선싱 하였고, 3년간 임상시험을 거쳐 인도 내의 의약품 판매 승인을 취득하였다.

생물학적 활성 측정 : EGF의 생물학적 활성측정의 원리는 EGF가 세포표면에 존재하는 EGF receptor (EGFR)에 결합할 때 EGFR가 지닌 protein tyrosine kinase 활성이 나타나 세포 내에 존재하는 여러 기질 단백질의 tyrosine 잔기에 인산화를 시킨다. 이러한 인산화된 단백질은 그들을 특이적으로 인식하는 단일 클론 항체에 의해 면역학적 방법으로 분석된다.

NIH3T3 (mouse fibroblast) Cell과 MRC-5 (human embryonal lung) Cell을 이용한다. 직경 6 mm인 dish에 2×10^4 cells/dish를 배양하여 1×10^6 cells/dish 정도가 되면 serum이 없는 배지에서 12-18 시간 배양하여 세포내의 남아 있는 serum을 고갈시킨다. control로 10 ng/ml PDGF-BB (GIBCOBRL), human EGF (GIBCOBRL)을 처리하고 나머지는 sample를 처리한 다음 일정 시간 (10분, 5일, 75분) 후 Cell을 lysis buffer (RIPA buffer)로 녹여 Western blot 분석을 한다.

(5) Human growth hormone (hGH): 2008년 수출 현황(동아제약, 156 만불)

hGH는 대사 (신진대사, 지질대사, 탄수화물, 무기물 등) 및 성장 촉진에 필수적으로 관여하는 단백질로서 뇌하수체 전엽에서 생산되어 방출되는 191 아미노산으로 구성되어 있는 호르몬이다. 단백질 흡수에 의한 분해 시 존재하는 epitope 또는 단백질이 직접적으로 혈관 내로 흡수되어 간으로 전달되어 간세포 막에 존재하는 receptor와 결합하여 신호전달을 통하여 IGF-I 생성을 촉진하므로써 세포의 분화와 증식을 촉진한다. 국내에서 동아제약, LG 등에서 미생물이나 동물세포 시스템을 이용하여 생산하고 있으며 국내 시장은 연간 약 60 억 정도이며 세계시장은 연간 15 조 정도로 추산하고 있다. 생물학적 활성 측정 : 인간 성장호르몬 (hGH)이 인간의 간세포에 작용하여 IGF-1을 분비하도록 유도하여 목적하는 성장을 유도한다는 점에 착안하여 인간의 간세포인 HepG2 Cell을 배양하여 sample 처리 후 24시간 동안 배양하여 상층액에서 IGF-1의 분비 촉진 정도를 측정한다.

- Radioreceptor assay

호르몬과 특이적이고 강력한 친화력으로 결합하는 수용체가 간에 존재하는데 간세포 막에 존재하는 수용체와 hGH와 결합력을 간접적으로 측정하는 측정하는 방법이다. Positive control hGH에 방사능으로 표지 하여 RT에서 시료 hGH와 4-5시간 동안 경쟁을 통해 수용체와 결합하도록 한 후 Stop buffer를 첨가하여 반응을 중지한다. 결합한 complex를 원심분리하여 pellet만 gamma counter로 측정하여 hGH의 활성을 측정한다.

- In vivo assay

4주령 Sprague-Dawley (SD) rat을 구입하여 1주간 순화시킨 후 3주가량 sample을 자율급식 (또는 경구투여) 하여 체중의 증체율 변화 측정과 혈중 호르몬 분석을 한다. 혈중 호르몬 농도는 Immunoassay (RIA) 방법을 통하여 분석한다. 또한 뇌하수체 전엽을 제거한 쥐에 투여하여 대조군과 성장률 차이를 분석하여 활성을 측정한다.

(6) 혈전용해제 (Fibrinolytic serine protease, PLSP3)

혈전용해제는 혈관이 막혀 생기는 인체에 치명적인 질병 (뇌졸중, 심근경색, 폐색전증)의 치료제로 사용되고 있으며, 치료용 의약품인 인체·혈관 내피세포 유래 혈전용해제 (TPA)를 생산하는 참외 모상근 및 알팔파 식물시스템 개발 기술이 확립되어 있고, 또한 벼에서 혈전용해제 생산을 시도 중에 있다 (농촌진흥청, 2009). 일반적인 혈전용해제 (TPA, Staphylokinase, Streptokinase, urokinase 등)는 plasminogen을 plasmin으로 활성화 시키는 activator이지만 (약간의 부작용), 본 연구에서는 우리나라 고유의 한종 한속인 흰이빨 참갯지렁이 (*Periserrula leucophryna*)로부터 분리하여 직접적으로 fibrin을 분해하는 fibrinolytic 효소에 대한 유전자를 보유하고 있으므로 이 유전자를 사용하여 연구를 진행하였다 (특히 등록번호 10-0638318, GenBank accession number, AAP51250). 전 세계적으로 환자가 4천만 명 정도로 추정되는 뇌졸중의 치료제 시장은 적게 잡아도 연간 약 3조원 이상의 규모로 추정되고 있다.

생물학적 활성 측정 :

- Fibrin plate method
fibrinogen 용액, thrombin 용액, plasminogen 용액을 혼합하면 fibrin이 형성된다. 이 fibrin층 위에 적당한 농도의 sample를 점적하고 37℃에서 18시간 반응시킨다. 응고된 fibrin에서 용해활성은 투명도(zone clearance)의 면적을 측정해 분석한다.

- Colorimetric method
Chromogenic substrate를 이용하여 검증하는 방법이다. S-2444(pGlu-Gly-Arg-pNA) 또는 S-2551(Val-Leu-Lys-pNA) 용액 10 ul와 sample 10 ul를 넣고 50 mM Tris-Cl(pH 8.0) 180 ul를 넣어 450 nm에서 흡광도를 측정한다. 활성의 1단위(unit)는 25℃, pH 7.5에서 1분 동안 substrates 1 umol을 가수분해하는 양으로 정의한다.

- Casein assay
Casein과 glycin buffer가 있는 tube에 D.W로 희석한 Sample을 넣고 60℃에서 10분간 반응시킨 후 Stop solution을 넣어 반응을 중단시킨다. Ice에서 10분간 두었다가 원심분리하여 상층액을 275 nm에서 흡광도 측정하여 활성을 분석한다.

(7) Surfactant protein

신생아의 호흡곤란 증후군은 신생아의 미숙한 폐에서 자연적으로 폐의 윤활제 역할을 해주는 물질인 표면활성제 (surfactant protein)가 상실되어 나타나는 질환이다. 표면활성제 단백질 B (Surfactant protein-B, SP-B) 결핍은 신생아 호흡곤란 증후군의 드문 형태로, 폐의 표면활성제 B 유전자의 돌연변이에 의해 발생하며, 이러한 형태의 신생아 호흡곤란 증후군은 상염색체 열성으로 유전된다. SP-A, B, C, D와 같은 4 종류의 surfactant protein이 있으며 그중 SP-B와 C는 소수성이며 SP-A와 D는 친수성의 성질을 가지며, SP-B 단백질이 신생아 폐기능에 중요한 역할을 한다.

표면활성제 단백질은 (인지질과 단백질로 구성) 레시틴 (lecithin)에 기반 하는 기포의 막을 고정시키는 리포단백질 (lipoprotein)이며, 폐기능에 필수적인 요소이며 활성화된 단백질의 경우 80 개의 아미노산 (8.7 kDa)으로 구성되어 있고 국내시장 규모는 약 70억 정도로 추산되고 있다. 생물학적 활성 측정 :

CHCl₃/CH₂OH 용액에서 인지질에 SP를 첨가하거나 첨가하지 않은채로 혼합하고 용매를 45℃ N₂ 가스하에서 제거한다. 용액 (0.9% NaCl, 또는 0.9% NaCl/1.5 mM CaCl₂)를 첨가 하여 lipid film를 수화시키고 실온에서 15분간 분당 배양하고 현탁액을 vortex 한 다음 37℃ 2시간 배양하여 SP의 양을 측정한다. 재구성된 surfactant의 농도(1%)는 인지질(w/v)의 percentage로 나타낸다.

(8) Anthocyanin

안토시아닌 (anthocyanin)은 원래 꽃이나 과일, 곡류의 적색, 청색, 자색을 나타내는 플라비노이드계의 수용성 색소이며, 강력한 항산화작용, 노화억제작용, 항균작용, 들연 변이성 억제작용, 콜레스테롤 저하작용, 시력개선 효과, 혈관보호기능, 항괴양 및 항산화기능 등이 알려져 있는 식물색소이다. 겉게 보이지만 사실은 검은색이 아니고 짙은 붉은색이나 진보라색에 가깝고, 안토시아닌이 풍부한 대표적인 먹거리로는 검은 콩·검은 깨·검은 쌀 등 이들이 블랙푸드 돌풍의 핵이다.

딸기·포도의 안토시아닌(anthocyanin), 콩의 아이소플라본(isoflavone), 토마토의 라이코펜(lycopene) 등과 같은 phytochemical은 식품, 영양학자의 최대 관심사의 하나로 집중적인 연구가 진행되고 있다. 안토시아닌은 붉은색이나 보라색, 검은색 등으로 발현되는데 최근 자연계의 안토시아닌의 다양한 건강 기능성이 입증되고 있으며, 유전형질 전환을 통해 항산화와 항염, 함암 기능이 우수한 천연 안토시아닌 색소를 대량 함유한 담배와 배추 개발에 성공하였고, 국내외 연구진들의 색소 대량 발현 연구가 한창 진행 중이다. 안토시아닌을 지닌 담배가 상용화될 경우 대표적인 인체 위해 작물이 건강 기능성 작물로 되살아나는 계기가 될 것이다.

(9) β -carotene : GM황금쌀은 2016년 상업화가 예고

식물에서 노랗고 붉은 색을 띠는 항산화 물질로써 당근, 파프리카, 피망, 짙은 녹황색 잎파리 채소, 호박 (butternut squash, pumpkin), 살구 등에 많이 포함되어 있는 영양소이며, β -carotene은 tocopherol보다 강력한 생체 항산화성을 나타내고 있다. 다중유전자 동시발현 신기술로 베타카로틴 생성 황금쌀 (비타민A 쌀)이 개발 (농촌진흥청, 하선화 박사팀, 2008) 되었으나, 아직은 GMO food에 대한 사회적인 인식 때문에 실용화까지는 요원할 것으로 예상된다. 음식에서 섭취되는 베타 카로틴은 항암 치료나 방사선 치료 시 손상되는 정상 세포를 보호하고 천식 환자들이 운동 시에 증상이 악화되는 것을 막아준다. 하지만 영양제로 먹는 합성 베타 케로틴도 이런 효과를 내는지에 대해서는 아직도 많은 연구가 진행되고 있다. 생물학적 활성 측정 :

항산화활성 측정

- DPPH 라디칼 소거활성 측정

색소성분의 라디칼 소거효과는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma)를 이용하여 측정한다(Cheung, *et al.*, 2003). 에탄올에 녹인 0.2 M DPPH 용액 0.8 ml과 시료액 0.2 ml을 혼합한 후 10분 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, DPPH 라디칼 소거능(%)은 다음 식에 의해 구한다.

$$\text{라디칼 소거능 (\%)} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

- ABTS 라디칼 소거활성 측정

2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 사용하여 라디칼 소거능을 측정한다(Re *et al.*, 1999). 즉 2.45 mM potassium persulfate 용액에 7 mM ABTS를 첨가하고 이 혼합물을 상온의 암실에서 24시간 반응시킨다. 생성된 ABTS 양이온 용액은 증류수로 희석하여 414 nm에서 1.4-1.5의 흡광도를 나타내게 하며(Forni *et al.*, 1986), 희석한 ABTS 라디칼 양이온 용액 1 ml에 시료액 50 μ l 가해 90 분후 414 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능 (\%)} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 목적

가. 연구개발 목적

본 연구개발의 목적은 영양학적 가치 및 경제성이 높은 새송이 버섯을 이용하여 단백질 대량생산의 공장 시스템을 개발하여 고부가가치 창출 및 바이오시밀러 시대를 대비한 산업화의 의학소재 원료를 제공하려 함이고, 또 다른 목적으로서 기능이 강화된 새로운 새송이 품종을 개발하여 FTA 시장개방에 따른 국내 시장의 보호 및 GMO 규제 완화에 의한 방어적 개념의 특허를 선점하고 미래 시장의 잠재성에 대비한 신제품 개발의 원천 기술력을 확보하려함이다.

나. 연구개발 총괄 목표



다. 연구개발 세부 목표

- (1) 버섯 원기형성 관련 단백질 분비서열을 이용한 유용 단백질 생산 시스템 개발
 - (가) 자실체 원기형성 관련 단백질의 특성 및 기능 분석

- (나) 원기형성 관련 단백질의 유전자 분리 및 특성 분석
 - (다) 원기내 발현 단백질 유전자를 (promoter & target sequence) 이용한 발현 및 분비 벡터 시스템 개발
 - (라) 발현 및 분비 vector로 유용유전자 도입 및 형질전환
 - (마) 원기(primordium) 및 균사체 내 단백질 생산 시스템 구축
 - (바) 균사체 대량배양에 의한 단백질 분비 및 원기 수집에 의한 단백질 정제 과정의 용이성 확립
 - (사) 바이오시밀러 시대 대비 단백질 생산을 위한 버섯공장화 및 생물학적 활성 검증에 의한 의학 원재료 소재화
 - (아) 유용단백질 대량생산에 의한 부가가치 창출 및 산업화 기술 제공
- (2) 새송이버섯 형질전환법 개발에 의한 기능성 강화 버섯 품종 개량
- (가) 식물 및 fungal 벡터 이용 새송이 버섯 형질전환법 개발
 - (나) 색소 및 식용백신 유전자 도입에 의한 형질전환 및 재분화 조건 확립
 - (다) 기능성 강화 버섯 신제품 개량 및 대량생산
 - (라) 기능성 건강 보조 식품 및 식용백신 개발

라. 연구개발 과제 의 차별성

구 분	기존기술	핵심기술
단백질 생산균주	식물 , 버섯 (미생물, 효모, 동물)	모든 버섯 (원기형성이 많은 버섯)
Promoter	알려진 commercial promoter (CaMV S35, laccase, GPD, chitin)	원기단백질 유전자 promoter 서열(기존사용포함)
분비서열	Laccase signal seq. Pathogen-related seq.	원기단백질 유전자 signal sequence
선택 마커	Amp, Kanamycin, Hygromycin	Bar, ALS
Targetting	세포질 또는 소기관 Periplasmic region	원기(Primordium)
형질전환효율	low	30% 정도증가
발현방식	Intracellular (세포내)	extracellular (세포외)
정제 기술	Refolding, air-oxidation Chromatography, HPLC	원기액 수거방식(균사체대량배양) 부분정제
Production Cost	Medium or high	very low
발현량 /대량생산	Very low in plant(버섯)/ 불가능	~ 2 ml/400 ml port/가능 균사전체단백질중~25% 발현 (hGH)
Mature form	Δ (yes or not)	신호서열이제거된 활성단백질

2. 연구개발의 필요성

가. **바이오 시밀러** 시대를 대비하여 오리지널 의약품의 특허가 만료되면 출시할 수 있는 복제약 (제네릭)을 대량 생산할 수 생산시스템 개발 필요성이 있으며 2008년부터 2017년까지 연속적으로 이어질 바이오신약 제품의 특허 만료로 인해 상당한 규모의 시장을 창출할 것으로 예상된다 (Table 1 & 2).

Table 1. 특허 만료 바이오의약품

성분	적용증	브랜드명	개발기업	특허만료시점
인간 인슐린	당뇨병	Humulin	Eli Lilly	2002
인간 인슐린	당뇨병	Novolin	Novo Nordisk	2002
인간 성장호르몬	성장호르몬결핍	Nuytopin	Genentech	2002
인간 성장호르몬	성장호르몬결핍	Humatrope	Eli Lilly	2002
인터페론 알파-2b	백혈병	Intron-A	Schering-Plough	2002
EPO	빈혈	Epogen	Amgen	2004
EPO	빈혈	Procrit	Johnson&Johnson	2004
TPA	심부전, 심장발작	Activase	Genentech	2005
인간 성장호르몬	성장호르몬결핍	Protropin	Amgen	2005
G-CSF	항암치료 보조	Neupogen	Genzyme	2006
Imiglucerase	Gaucher병	Cerezyme	Biogen Idec	2010
인터페론 베타-1b	다발성 경화증	Avonex		2011

(자료 : ABN, AMRO, WSJ, ADL 종합)

나. 새송이버섯을 대상으로 재배 및 영양학적, 생리적 효능 연구 등은 이루어지고 있으나 형질전환 및 재생에 관련된 체계적인 연구가 현재 미비한 상태이다. 따라서 생명공학 기술을 실질적으로 작물 분자유종 분야에 접목시키기 위해서는 **버섯에서 형질전환 및 재분화 protocol 개발**이 필수적으로 선행 되어야 할 필요성이 있다 .

다. 여러 생명체 (동물, 미생물, 식물)를 이용한 유용 단백질 생산은 원활하게 이루어지고 있지만 **버섯을 숙주로 사용하여 유용 단백질을 생산하는 시스템**은 현재까지 거의 전무한 상태이다. 이는 버섯 특이적 promoter 및 분비서열에 관한 분자생물학적 연구가 미진하기 때문이라 사료되며, 또한 버섯에서 형질전환에 의한 재분화 과정의 효율성이 낮고 단백질이 생산 된다 하더라도 단백질 발현 수준이 낮을 것이라 예상되므로 많은 연구가 되지 않은 것으로 판단된다.

Table 2. 특히 만료 예상 바이오의약품

제품명	성분명	2007 매출 (십억불)	적응증	개발사	특히만료
엔브렐	Etanercept	5.0	류마티스	Amgen	2012
에포젠	Epoetin- α	5.3	빈혈	Amgen	2013
아보넥스	Interferon β - 1a	1.8	다발성 경화증	Biogen	2013
레미케이드	Inflixman	4.4	류마티스	Johnson & Johnson	2013
휴마로그	Insulin Lispro	1.4	당뇨병	Eli Lilly	2013
뉴포젠	Filgrastim	1.2	호중구 감소증	Amgen	2013
세레자임	Imiglucerase	1.1	고셔병	Genzyme	2013
코팍손	Glatiramer acetate	1.6	다발성 경화증	Teva	2014
리툭산	Rituximab	4.5	비호지킨 림프종	Genetech	2015
뉴라스타	Pegfilgtastim	3.0	백혈구 개선촉진	Amgen	2015
란투스	Insulin Gargine	2.7	당뇨병	Sanofi-Aventis	2015
휴미라	Adalimumab	3.0	류마티스	Abbott	2016
헤셉틴	Trastuzumab	4.0	유방암	Genetech	2019
아바스틴	Bevacizumab	3.4	대장암	Genetech	2019

자료 : 식품의약품안전청(KFDA)

- 대장균 : 증식이 빠르고, 대량배양 용이, 효율적 생산비, 굴절체 형성에 의한 refolding 과정 필요 (정제비용에 의한 생산단가 상승), 당단백질 생산 불가
- 효모 : 증식이 빠르고, 대량배양 용이, 효율적 생산비, 부분당 단백질 생성, Protease에 의한 목적 단백질 분해 단백질 발현 inducer 사용 불편
- 동물세포 : 증식속도 느림, 대량배양이 용이하지 않음, 비용부담, 바이러스 오염, 당단백질 생산
- 식물세포 : 증식속도 너무 느림, 대량배양이 용이하지 않음, 발현량이 적음, 후대 유전적 불안정성, 부분당단백질
- 버섯 : 증식속도 느림, 원기내 단백질 대량생산 가능, 당단백질 생산, 정제 용이, 활성단백질 생산

라. 유전자 도입에 의한 버섯 형질전환체를 만든다고 해도 환경단체에서 주장하는 GMO에 해당하기 때문에 처음부터 시도를 하지 않는 것으로 사료되지만, 그러나 세계적으로 유전자조작 생명체 (GMO)에 대한 거부감에도 불구하고 각국의 농업관계연구기관과 회사들은 품종 특성이 향상된 유전자조작 식물 및 생명체 생산 연구에 박차를 가하고 있는 실정이므로 국내에서도 FTA에 의한 시장 개방에 대비하여 방어적 개념의 특허권 및 기술력을 확보할 필요가 있다 (Table 3).

Table 3. 전 세계 GMO 재배면적 중 해당국가가 차지하는 비중

순위	국가	면적 (백만 ha)	유전자 변형 작물
1	미국	69.0 (43.1%)	옥수수 33.9, 콩 29.2, 면화 4.9, 사탕무 0.48, 케놀라 0.37, 알팔파, 호박, 파파야
2	브라질	30.3 (19%)	콩 20.6, 옥수수 9.1, 면화 0.6
3	아르헨티나	23.7 (15%)	콩 19.1, 옥수수 3.9, 면화 0.675
4	인도	10.6 (6.6%)	면화 10.6
5	캐나다	10.4 (6.5%)	케놀라 7.7, 옥수수 1.3, 콩 1.3, 사탕무
6	중국	3.9 (2.4%)	면화 3.9, 파파야, 포플라, 토마토, 피망
7	파라과이	2.8 (1.8%)	콩 2.8
8	파키스탄	2.6 (1.6%)	면화 2.6
9	남아공	2.3 (1.4%)	옥수수 1.87, 콩 0.38, 면화
10	우루과이	1.3 (0.8%)	콩 1.1, 옥수수 0.15
11	볼리비아	0.9 (0.6%)	콩 0.91
12	호주	0.7 (0.4%)	면화 0.597, 케놀라 0.139
13	필리핀	0.6 (0.4%)	옥수수 0.644
14	미얀마	0.3 (0.2%)	면화 0.283
15	부르키나파소	0.3 (0.2%)	면화 0.247
16	멕시코	0.2 (0.1%)	면화 0.171, 콩 0.014
17	스페인	0.1 (0.1%)	옥수수 0.097
18	콜롬비아	< 0.1	면화 49,333 ha
19	칠레	< 0.1	옥수수, 콩, 케놀라 : 42,300 ha
20	온두라스	< 0.1	옥수수 18,000 ha
21	포르투갈	< 0.1	옥수수 7,724 ha
22	체코	< 0.1	옥수수 5,091 ha
23	폴란드	< 0.1	옥수수 3,000 ha
24	이집트	< 0.1	옥수수 2,800 ha
25	슬로바키아	< 0.1	옥수수 761 ha
26	루마니아	< 0.1	옥수수 588 ha
27	스웨덴	< 0.1	감자 15 ha
28	코스타리카	< 0.1	면화, 콩 : 3.1 ha
29	독일	< 0.1	감자 2 ha

마. 국가의 대표적인 연구기관인 농촌진흥청에서도 현재 식물체에 유용 유전자를 도입하여 GMO 관련 연구가 활발히 이루어지고 있으며 가시적인 성과도 나타나고 있다. 따라서 국내외적으로 많은 연구가 진행되고 있지 않는 **버섯을 이용한 유용단백질 생산에 관한 연구**가 조속히 이루어져 기술적 우위를 선점해야할 필요성이 있다.

바. 형질전환체 생산을 위하여 산업적으로 유용한 유전자나 프로모터를 이용해야하는데, 이들은 대부분 국제특허로 묶여 있어서, 비싼 로열티를 주고 이용해야 하는 실정이며, 버섯 재배농가 및 버섯 종균 생산업체에서 재배과정 중에 생성되는 물방울 정도로만 생각하고 있는 원기 (primordium)에 대한 분자생물학적 연구를 통하여 **발현 및 분비 시스템 개발이** 필요한 실정이다(원기내 단백질 생산시스템 개발).

사. 저렴한 배지를 사용하여 새송이버섯 원기내 (또는 균사체)로 유용 단백질을 생산하고

쉽고 간단한 정제 과정에 의한 공정의 단순화를 통하여 **단백질의 생산 단가를 낮출 필요가 있다.**

아. 생명공학 기술에 의한 작물 개발이 몇몇 다국적 기업에 의해 주도되고 있는 현실에서 미래 종자 및 종균 전쟁에 대비하여 **우리의 독자적인 생명공학 기술 경쟁력 확보**가 절실하다.

자. 국내에서는 형질전환 및 재분화를 통하여 버섯을 숙주로 기능성 단백질 생산 연구가 거의 없는 실정이므로 **식물에서 일반적인 생명공학기술을 버섯으로 도입할 필요가 있다.**

차. 또한 버섯은 식물처럼 형질전환 후 재분화가 가능하기 때문에 버섯 발현 시스템은 **재조합 단백질의 생산을 위한 산업화의 응용연구 분야** 뿐 아니라 관련 분야의 기초 연구를 위해서도 기술개발 필요성이 높은 연구개발 분야이다.

카. 식물과 버섯은 식량자원 및 에너지원으로 널리 이용되어 왔으며 식물이 가지는 일차 대사산물인 탄수화물 및 단백질의 주요 공급원으로써 중요성 이외에 천연색소, 향료, 의약품 등 이차대사산물의 급원으로써 가치가 점차 중요시되고 있으며, **기능성물질을 함유한 농작물의 개발에 의해 국제 경쟁력의 우위를 확보할 필요가 있다.**

타. 인구의 팽창, 산업화, 환경오염 등 여러 요인으로 농경지가 축소되어 가고 있는 현 상황에서 일차대사산물을 얻기 위한 공간 확보도 어려운 실정이고, 농업분야의 치열한 국제 경쟁 속에 국내 농업의 경쟁력을 향상시키고, 국내 유전자원의 유출을 막고 **국제적으로 유전자원의 권익을 보호받아야 한다.**

파. 유전자원의 효율적인 관리를 통하여, 품질 및 기능성이 향상된 버섯 신제품 생산의 기초를 마련함으로써 **국내 버섯 생산 및 수요 증대를 통해 농가소득 증대의 필요성**이 있다.

하. 버섯은 다양한 형태의 전통 치료제 및 음식 재료로 쓰이고 있는 국민의 건강과 직접 연관된 중요작물로서 항암, 항산화, 항균, 항궤양, 노화 억제 등 **부가적 기능성이 강화된 품종개발을 통하여 식생활은 물론, 국민 건강 증진에 기여해야 할 필요가 있다.**

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

1. 국외 버섯 연구동향

버섯을 이용한 연구논문 및 특허를 통하여 GM 작물 관련 국외 기술개발 동향은 다음과 같다.

가. 연구논문 동향

(1) 재떡물버섯 (*Coprinus cinereus*)의 trp1 promoter와 양송이버섯 (*Agaricus bisporus*) 유래 trp2 및 gpdIII promoter를 사용 : 재떡물버섯 및 양송이에서 GFP 단백질 발현 및 프로모터의 중요성 기술 (*Fungal Genetics and Biology*. vol 42, 191-199, 2005)

(2) 재떡물버섯 (*Coprinus cinereus*)의 cgII promoter 조절하에 GFP 단백질을 균근균 (*Hebeloma cylindrosporum*)에서 발현: Promoter의 중요성 기술 (*FEMS Microbiol. Lett.* vol 268, 67-72, 2007)

(3) 식용 버섯인 임금 굴버섯(*Pleurotus nebrodensis*)에 PEG-protoplasts 법으로 2 vector (항생제 marker 및 GFP 단백질)를 동시에 형질전환, 염색체에 integration 및 GFP 발현 : 형질전환법 기술 (*Progress in Natural Science*. vol 18, 819-824, 2008)

(4) 표고버섯(*Lentinula edodes*)에서 gpd promoter와 알파-glucuronidase 유전자를 사용하여 전기 천공법으로 형질전환체 구성 : 발현을 증가를 위해 promoter에 intron을 포함하도록 설계 (*J. Microbiological Methods*. vol 72, 111-115, 2008)

(5) 초고버섯 (주머니털버섯, *Volvariella volvacea*) 에서 gpd (표고유래) promoter와 cold stress resistance 유전자를 사용하여 Agrobacterium법에 의해 형질전환체 구성 (*Bioresource Technology*. vol 99, 8524-8527, 2008)

(6) 여러 버섯 유래 gpd promoter를 사용하여 Endo- β -1,4-glucanase 유전자를 재떡물버섯에서 발현 하였을 때 표고유래의 gpd promoter 사용 시 높게 발현. Promoter의

중요성 기술 (*Bioresource Technology*. vol 100, 4475-4480, 2009)

(7) 팽나무버섯 (*Flammulina velutipes*)에서 trp1 promoter 조절 하에 Fv-1유전자 발현 시 promoter에 따라 발현양의 변화. Promoter의 중요성 강조 (*Bioscience Biotechnol. Biochem.* vol 74, 2523-2525, 2010)

(8) 팽나무버섯 (*Flammulina velutipes*) 균사체에서 hygromycin을 selection marker 로 하여 urogen III methyltransferase (cob)을 Agrobacterium 법을 이용하여 형질전환. 형질전환기술 (*Bioscience Biotechnol. Biochem.* vol 74, 2327-2329, 2010)

(9) 재떡물버섯 (*Coprinus cinereus*) foreign gene 발현을 위한 vector 구축. Promoter의 교환이 쉽도록, 발현할 gene cloning 이 용이하도록 multiple cloning sites (MCS) 및 terminator elements 를 갖도록 design (*J. Microbiological Methods* vol 82, 156-162, 2010)

(9) 표고버섯 (*Lentinula edodes*)에서 chitin synthase gene promoter 를 갖고 선택마커로 하이그로마이신 및 bar를 갖는 noble vectors (pLCHS-hph 및 pChG-bar)를 구축하여 형질전환체 구성 (*J. Bioscience & Bioengineering.* vol 111, 117-120, 2011)

(11) 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)에서 gpd promoter 의 조절하에서 enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) gene 발현을 위한 pAN7-1 벡터 구축. REMI법에 의해 형질전환 (*J. Microbiol.* vol 48, 253-256, 2010)

(12) 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)에서 Cauliflower mosaic virus (CaMV) 유래 35S promoter와 nos terminator를 갖는 pCambia1304 발현벡터에 인체 유래 platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB)를 도입하여 Agrobacterium법에 의해 형질전환 후 발현 시켰을 때 전체 수용성 단백질의 1.98% 수준으로 PDGF 생성 (*Appl. Biochem. Biotechnol.* vol 165, 611-623, 2011)

(13) 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)에서 Cauliflower mosaic virus (CaMV) 유래 35S promoter와 nos terminator를 갖는 pCambia1304 발현벡터에 인체 유래 interleukin-32 (hIL-32)를 도입하여 Agrobacterium법에 의해 형질전환 후 발현 시켰을 때 전체 수용성 단백질의 1.9% 수준으로 hIL-32 생성 (*Ann Microbiol.* vol 61 331-338, 2011)

(14) 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)에서 Cauliflower mosaic virus (CaMV) 유래 35S

promoter와 신호서열을 도입한 벡터를 구성하여 소성장호르몬 유전자를 클로닝하여 발현 및 분비에 미치는 영향을 분석. 전체 수용성 단백질의 약 20-25% 정도 균사체 내 발현 (*Biotechnology & Bioprocess Engineering*. vol 19, 33-42, 2014)

여러 버섯 (재떡물, 양송이, 임금굴, 표고, 초고, 팽나무, 새송이 등)을 숙주로 하여 여러 가지 promoter (trp, gpd, cgII, chitin synthase, 35S 등)하에서 여러 유전자 (gfp, 알파-glucuronidase, cold stress resistance, Fv-1유전자, urogen III methyltransferase, ECFP, bGH)를 REMI, Agrobacterium, electroporation, protoplast 법 등을 이용하여 형질전환체를 구축하여 형질전환법 개발 및 promoter의 중요성을 강조, 대상유전자의 발현을 조사하였다.

나. 특허 동향

(1) DNA fragments having basidiomycete-derived promoter activity and expression of foreign genes under control of the promoter activity (등록 US006387688) : 담자균 유래 ras 및 priA gene 의 promoter region 을 갖는 vector 로 *Coriolus hirsutus* (흰구름 버섯)를 형질전환하여, 특히 ligan 분해효소를 발현하는 목적으로 제조. 양질의 종이 제조에 이용 ; 일본, Oji Paper Co., Ltd.

(2) Methods and compositions for highly efficient transformation of filamentous fungi (등록: US006964866, US007700349) : *Agaricus bisporus* (양송이버섯) 와 같은 사상균 (filamentous fungi) 에서 Agrobacterium-mediated 신속한 형질전환법에 대한 특허; 미국, Penn state Research Foundation

(3) Method for the introduction of a heterologous polynucleotide into a mushroom (등록: US20090260102) : *Lentinula edodes* (표고버섯)에 전기천공법에 의한 형질전환 방법 및 세포 내 발현 방법 ; 대만, Mycomagic Biotechnology Co., Ltd.

(4) Production of provitamin a carotenoids in mushrooms and uses thereof (등록 : US20100275329) : α -carotene 을 포함하는 provitamin A 전구체를 생산하는 식용 버섯을 만들어 Vit A 결여 질환에 이용 ; 미국, Medicine in Need Co.

(5) Method for transformation of *Agaricus bisporus* (EP 1 409 693) : *Agaricus bisporus* (양송이버섯) 과 같은 사상균(filamentous fungi) 의 신속한 형질전환법에 대한 특허로 Agrobacterium-mediated 형질전환법 ; 미국, Penn state Research Foundation.

(6) Transformation of *Lentinus edodes* (JP 11155568) : polyethylene glycol (PEG) 를 이용한 *Lentinula edodes* (표고버섯) 에 vector 형질전환 방법 및 세포 내 발현 방법 ; 일본, IWATE PREFECTURE

(7) Production of provitamin a carotenoids in mushrooms and uses (WO 2010/123868) : *Agrobacterium* 매개 형질전환법으로 α -carotene, β -carotene, γ -carotene 및 β -cryptoxanthin 을 포함하는 provitamin A 전구체를 생산하는 버섯 형질전환체 및 제조한 형질전환 버섯으로 vitamin A 결여 (VAD) 와 관련된 질환 개선 및 치료에 이용 ; 미국, Medicine in Need Co.

미국의 Medicine in Need Co. 회사는 carotene, β -cryptoxanthin을 포함하는 provitamin A 전구체를 생산하는 버섯 형질전환체 및 제조한 형질전환 버섯으로 vitamin A 결여 (VAD) 관련된 질환 개선 및 치료에 건강보조식품 판매중임.

2. 국외 GM 작물현황

GM 작물의 재배 현황 : 세계적으로 식량, 에너지, 환경 문제가 인류의 생존을 위협하고 있어 환경 친화적이며 높은 생산성을 주는 대체기술의 개발이 필연적으로 요구되며, 1990년대 중반부터 미국 등을 중심으로 GM작물의 재배가 시작된 이래로 그 규모가 해마다 급진적인 증가 추세를 보이고 있다.

세계 GM작물 생산 현황은 2013년 현재 27개국 1억7500만ha에서 (2012년 보다 500만 ha 증가) 1800만명의 농업인들이 GM작물을 재배하고 있으며, 35개국에서 수입 승인을 하였으며 사료용이나 식품용으로 GM농산물의 수입을 승인한 국가까지 포함하면 모두 62개국에 달한다 (ISAAA Brief 46, 2013). 우리나라도 2012년에 식품가공용 및 사료용으로 GM농산물 887만6000 ton (28억6188만달러)을 수입했다.

전체 재배 국가 중 19개국이 개발도상국이며, 8개국이 산업국이며, 상위 10개국 중 8개국이 인구밀도가 높은 개발도상국으로 향후 GM작물의 재배면적이 지속적으로 증가할 것으로 보이며, 지난해에 이어 2013년에도 전체 GM작물 재배면적에서 개발도상국 (54%)이 차지하는 비중이 산업국을 넘어섰다.

복합형질 작물이 전체 재배면적의 27%를 차지하여 약 4,700만 ha에서 재배되었으며, 이는 2012년에 차지했던 비중(26%, 4,370만 ha)과 비슷한 수준이지만 복합형질 작

물의 성장세는 지속될 것으로 예상된다.

미국은 여전히 GM작물의 확대에 중요한 역할을 하고 있으며, 세계 2위의 브라질에서 GM작물 재배면적이 크게 증가함에 따라 새로운 리더로서 급부상하고 있다. 또한 남미의 브라질과 아르헨티나, 아시아의 인도와 중국, 아프리카의 남아프리카공화국 5개국이 GM작물 재배면적의 47%, 세계인구의 41%를 보유하고 있어 이들 지역에서 GM작물이 식량안보 문제의 실마리가 될 수 있다 (Table 4). 특히 중국의 경우 최근 자체 개발한 해충저항성 벼를 포함해 지금까지 8개의 GM작물을 승인했으며 2015년 GM벼 품종 출시를 앞두고 있다.

Table 4. 전 세계 GM 작물 재배 현황 (2013년)

(백만 ha)

Rank	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
1	USA*	70.1	Maize, soybean, cotton, canola, sugar beet, alfalfa, papaya, squash
2	Brazil*	40.3	Soybean, maize, cotton
3	Argentina*	24.4	Soybean, maize, cotton
4	India*	11.0	Cotton
5	Canada*	10.8	Canola, maize, soybean, sugar beet
6	China*	4.2	Cotton, papaya, poplar, tomato, sweet pepper
7	Paraguay*	3.6	Soybean, maize, cotton
8	South Africa*	2.9	Maize, soybean, cotton
9	Pakistan*	2.8	Cotton
10	Uruguay*	1.5	Soybean, maize
11	Bolivia*	1.0	Soybean
12	Philippines*	0.8	Maize
13	Australia*	0.6	Cotton, canola
14	Burkina Faso*	0.5	Cotton
15	Myanmar*	0.3	Cotton
16	Spain*	0.1	Maize
17	Mexico*	0.1	Cotton, soybean
18	Colombia*	0.1	Cotton, maize
19	Sudan*	0.1	Cotton
20	Chile	<0.1	Maize, soybean, canola
21	Honduras	<0.1	Maize
22	Portugal	<0.1	Maize
23	Cuba	<0.1	Maize
24	Czech Republic	<0.1	Maize
25	Costa Rica	<0.1	Cotton, soybean
26	Romania	<0.1	Maize
27	Slovakia	<0.1	Maize
Total		175.2	

(출처 : Clive James, 2013)

현재 상용화된 GM작물은 제초제나 해충에 저항성을 가진 콩·옥수수·면화·유채 등이 대부분을 차지한다. 최근에는 GM작물 개발 및 이용이 농업생산력 증진을 위한 목

적형질 중심에서 영양가치 증진과 의료산업용 소재 생산 등으로 다양화되고 있다.

GM 식물은 전환된 형질에 따라 제1 세대 GM 식물 (성장 및 생리에 대하여 새로운 특성을 부여한 것으로서, 제초제 및 병해충 저항성 작물 등, 종자회사, 농약회사 및 농민 등 생산자에게 유리한 특성), 제2 세대 GM 식물 (지방산 조성이 변화된 대두, 유채, 유통기간이 연장된 토마토 등 가공특성을 향상시킨 경우로 유통 혹은 식품 가공업자들에게 유리한 특성), 제3 세대 GM 식물 (영양가가 향상되었거나, 식용백신, 항암 성분, 혈압강하제 등 **의약품 성분이 강화된 소위 기능성 건강식품으로 이용할 수 있는 경우**, 소비자들이 자발적으로 찾는 것으로 차세대에 크게 각광 받을 수 있는 GM 식물)로 분류한다. 따라서 본 연구에서도 시도하는 **새송이버섯을 이용한 유용 단백질 생산 시스템 개발은 제3 세대 GM 작물 개발로 분류될 수가 있다.**

GM 작물은 수명주기 단계로 보면 초기 개발기로 현재까지 제1 세대의 수확량 증대에 주로 관심이 집중되었으나 소비자들의 인식 개선과 더불어 향후에는 영양성분의 개선 및 공업제품생산을 위한 제2 세대 제품, **의약품 생산 등 제3세대 고부가가치 산업으로 발전할 것으로 전망된다.**

GM 작물의 이점이 부각되고 재배면적이 늘면서 소비자들의 이해도 개선되는 경향을 보이며, GM 작물의 수입을 금지하던 유럽도 2005년부터 적극적으로 수용 자세를 갖추어가고 있고, 기업은 제품개발에 박차를 가하고 있다. 호주의 경제학자들은 2015년까지 곡물, 채소, 과일 등 GM 작물의 세계시장 규모가 2,100억 달러에 이를 것으로 예측하고 있으며, 제3 세대 GM 작물의 기능성 건강식품으로서, 현재 650억 달러 (비 GM) 규모의 시장에서 2027년에 15조 달러 (년 22.5% 증가)의 시장으로 확대될 것으로 예상하고 있다. 또한 GM종자 시장도 확장일로에 있으며, 2003년 44억 달러에서 2013년 156억 달러로 확대돼 전체 종자시장의 35%를 차지하고 있다. 2015년엔 200억 달러 규모로 증가할 전망이어서, 이를 겨냥해 세계 각국이 치열한 경쟁 중에 있다.

GMO 안전성 논란 : GM작물 재배가 확산되면서 안전성 논란도 끊이지 않고 있다. 미국의 환경보호청은 해충저항성 옥수수에 포함된 특정 단백질이 소화엔 문제가 있는데다 알레르기를 유발할 가능성이 있다는 이유로 식용이 아닌 사료용으로 허가했으며, 멕시코의 토종 옥수수에서 수입된 GM옥수수에 도입된 유전자가 발견됐다는 논문이 네이처(Nature)지에 발표돼 논란이 되기도 했다. 또한 영국 BBC방송은 영국 정부가 GM옥수수를 승인하면서 GM옥수수 사료를 먹은 닭이 그렇지 않은 닭에 비해 2배나 많이 폐사율이 증가한다는 사례도 보도되었으며, 독일 농림부는 환경에 대한 위험성을 근거로 한 종자회사의 GM옥수수 재배를 금지시켰고, 이에 대해 해당 종자를 생산한

종자회사가 소송을 제기하기도 했다.

그와 같은 안정성 논란에도 불구하고 GM 작물에서 환경파괴 및 생태계 교란 등의 문제를 일으킬 수 있는 선택마커를 항생제에서 안정성 증진을 위한 식물대사와 관련된 bialaphos, glyphosate, sulfonyleurea 저항성 마커로 바뀌고 있으므로 GM 작물 재배, 생산국가들이 더욱 늘어날 전망이다 (Table 5).

Table 5. GM 작물에 사용되고 있는 선택마커 (AGBIOS, 2003)

Marker genes listed in US field test notifications and release permits for the years 2001 and 2002 (data extracted from ISB, 2003)		Some of selectable markers in genetically modified crops with approvals for commercial use (information extracted from AGBIOS, 2003)		
Selection marker	Number of records in 2001 and 2002	Crop	Phenotypic trait	Selectable marker (gene-enzyme)
Neomycin phosphotransferase II (kanamycin-resistant)	949	<i>Beta vulgaris</i> (sugar beet)	Glyphosate herbicide resistance Phosphinothricin herbicide resistance, specifically glufosinate ammonium	uidA-GUS neo-NPTII
Hygromycin B phosphotransferase (hygromycin-resistant)	65	<i>Brassica napus</i> (canola)	High laurate and myristate canola Glyphosate herbicide resistance Phosphinothricin herbicide resistance	neo-NPTII CP4 epsps-EPSPS, pat-PAT neo-NPTII, bar-PAT
Phosphinothricin N-acetyltransferase (bialaphos-resistant: Bar)	327	<i>Cichorium intybus</i> (chicory)	phosphinothricin herbicide tolerance specifically glufosinate ammonium	neo-NPTII, bar-PAT
5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (glyphosate-resistant)	507	<i>Dianthus caryophyllus</i> (carnation)	Modified flower colour, sulfonyleurea herbicide resistance	surB-ALS
Acetolactate synthase (sulfonyleurea-resistant)	5	<i>Glycine max</i> (soybean)	phosphinothricin herbicide tolerance	pat-PAT bar-PAT

3. 국외 바이오시밀러 동향

가. 국외 바이오산업 동향

2013년도 국외 바이오산업 생산규모는 총 2,100억 달러 (2008년(1,250억 달러) 대비 68% 증가하였으며, 최근 5년간(2009년-2013년) 1.7배 수준으로 증가(연평균 증가율 27%) 했다. 2013년도 바이오산업 분야별 생산규모는 바이오의약 분야가 전체의 55%를 차지한다. 바이오의약 분야에서는 혈액제제(21.6%)와 백신(19.9%)의 비중이 높았으며, 또한 바이오식품 (전체의 6%) 분야에서는 사료첨가제(63.6%)와 식품첨가물(17.7%) 비중이 높았으며, 생산 증가율로는 바이오에너지자원 (36.4%)과 바이오식품 및 바이오농업해양 (11.8%) 분야가 가장 크게 증가한 것으로 분석되었다 (Table 6).

Table 6. 세계 바이오산업 시장규모(2000-2013년)

(단위: 억달러, %)

분야별	2000	2003	2008	2013	연평균증가율 (2000~2013년)
바이오의약	325	444	688	1,155	19.7
바이오화학	38	52	100	168	26.3
바이오환경	32	44	87	147	27.6
바이오식품	27	37	75	126	28.2
바이오에너지자원	11	15	37	63	36.4
바이오농업 해양	27	37	75	126	28.2
생물공정 측정시스템	81	111	188	315	22.2
계	540	740	1,250	2,100	26.9

(자료 : OECD 및 Consulting Resources Corporation)

나. 국외 바이오시밀러 동향

(1) 바이오시밀러 정의

바이오의약품은 사람이나 다른 생물체에서 유래하는 세포, 단백질, 유전자 등을 원료 또는 재료로 하여 제조하는 백신, 생물학적 제제, 유전자 재조합 의약품, 세포 배양 의약품, 세포치료제, 유전자 치료제 등을 말한다. 또한 바이오의약품은 바이오 신약(합성신약, 단백질신약, 천연물신약, Drug delivery system 신약) 바이오 시밀러, 바이오 베타 세 가지로 나눌 수 있다 (Table 7).

바이오시밀러는 오리지널 의약품의 특허가 만료되면 출시할 수 있는 복제약(제네릭)이며 최근 각광 받고 있는 분야가 바이오 시밀러이다. 기존 합성 신약의 복제약과는 차원이 다르며, 품질 및 비임상·임상적 측면에서 오리지널과 거의 유사하거나 동등함을 입증해야 시밀러로 인정받고 성분은 오리지널과 동일하지만 독자적인 기법을 통해 개발하는 것이어서 단순한 모방제품이 아니다. 바이오시밀러는 바이오의약품에 비해 비교적 짧은 개발기간과 비용이 소요되며, 제조공정이나 임상범위를 비교하면 다음과 같다.

Table 7. 바이오의약품, 바이오시밀러, 제네릭의 특성 비교

구분	제네릭(Generics)	바이오시밀러(Biosimilars)	바이오의약품(Biologics)
생산공정			
프로세스	기존 공정 이용	높은 비용을 요구하는 특별한 생산시설이 필요	높은 비용을 요구하는 특별한 생산시설이 필요
민감도	환경 변화에 민감하지 않음	생산환경 변화에 매우 민감	생산환경 변화에 매우 민감
재현성	쉬움	어려움	어려움
임상시험			
임상 범위	일부 범위 : Phase 1 까지	Phase 1에서 3까지	Phase 1에서 3까지
개발기간	매우 짧음	6년-10년	6년-15년
개발비용	\$5million	\$100-\$200million	\$350-\$800million
피험자 참가	20-100	100-500	>1,000

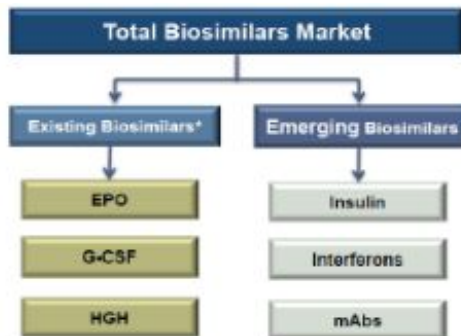
(출처 : Analysis of the Global Biosimilars Market, Frost & Sullivan, 2014)

(2) 바이오시밀러 시장동향

500대 제약회사 및 바이오회사 기준 2020년 세계 의약품 시장은 2013년부터 연평균 5.1%로 성장해 1조 174억 달러 규모에 이를 전망이다. 제네릭 비중은 2013년 9.6%에서 2020년 10.5%로 확대될 것으로 예상된다. 2020년 세계 바이오의약품 시장 규모는 2천 910억 달러로 세계 의약품 시장에서 27%의 비중을 나타내고, 100대 의약품 중 52%를 차지해 주력으로 부상할 전망이다 (Table 8 & 9).

2012년을 기준으로 바이오시밀러 시장은 기존시장(Existing Biosimilars)과 신규시장(Emerging Biosimilars)으로 구분될 수 있으며, 기존 바이오시밀러 시장은 각각의 국가에서 승인된 제품들로서 조혈호르몬(EPO), 조혈촉진인자(G-CSF) 및 성장호르몬(HGH)로 분류할 수 있다. 신규 바이오시밀러 시장은 개발이 진행되고 있거나 승인을 기다리고 있는 제품들로서 인슐린(Insulin), 단일클론항체(mAbs), 인터페론(Interferons Alpha & Beta)들이 있다.

<Total Biosimilars Market: Market Sementation, Global, 2012>



(출처 : Analysis of the Global Biosimilars Market, Frost & Sullivan, 2014)

Table 8. 세계 단백질 의약품 제품별 시장 현황

Item	매출액 (백만 \$)				연평균 성장률 (%)
	2004	2006	2008	2010	
Erythropoietin	9,478	10,212	11,581	12,908	7.4
Insulin	5,207	6,436	7,360	8,050	8.0
Interferon alpha	2,714	3,715	4,573	5,518	13.0
Interferon beta	3,052	3,567	3,656	3,721	6.6
Growth hormone	1,902	2,043	2,110	2,122	2.5
Growth factor	243	349	428	502	17.8
Interleukin	242	256	251	245	3.2
Colony stimulating factor	2,739	3,205	3,486	3,877	6.6
Therapeutic vaccine	186	527	944	1,442	45.3
Blood clotting factor	3,406	3,813	4,133	4,323	5.9
Plasminogen activator	678	701	696	684	0.7
other	2,510	3,163	3,380	3,539	6.5

(자료 출처 : 생명공학백서)

Table 9. 주요 바이오제네릭 기업의 판매제품 현황

회사명	국가	판매중인 바이오제네릭 제품					
		Insulins	CSF	GH	EPO	IFN	PA
Bio-Technology General	US	O					
Cangene	Canada		O	O			
Merck KGaA	Europe			O		O	
GeneMedix	UK		O			O	
IVAX	US		O			O	
LG Life Sciences	Korea		O	O	O	O	
Mirobix Bostystems	Canada						O
SICOR	US		O	O	O	O	
Stada	Israel			O			
Donga Pharm	Korea		O	O	O	O	

주: CSF : colony stimulating factors, GH : growth hormones, IFN : interferons,

EPO : erythropoietins, PA : Plasminogen activators

(자료: Datamonitor, 보건산업진흥원 등 자료를 근거로 대우증권 리서치센터 작성)

시장조사 회사인 얼라이드 마켓 리서치(Allied Market Research, AMR)에 의하면 세계 바이오시밀러 시장이 2013년 기준 13억 달러에서 2020년까지 약 350억 달러로 시장규모가 커질 것이라는 연구결과가 나왔다. 이런 가능성은 유럽과 미국에서 매년 총 600억 달러의 매출을 기록하고 있는 10개 이상의 주요 생물의약품이 수년 내에 특허권이 만료된다는 점을 근거로 삼고 있다. 2013년 미국 FDA 승인을 취득한 신약은 합성 신약 25개 및 바이오 신약 10개를 포함해 35개로 집계됐다. 2013년 출시 신약의 시판 5년차 2018년 예상 매출 규모는 244억달러로 추산됐다.

글로벌 제약회사의 블록버스터 항체의약품 특허만료가 2013년을 시작으로 2014년 본격적으로 진행된 가운데 2015년은 ‘블록버스터’ 바이오의약품 중 8개의 미국 특허가 만료되며 항체 바이오시밀러 시장의 전환점이 될 것으로 전망된다. IMS Health에 따르면 2020년까지 또 다른 바이오의약품 8개도 특허만료 예정으로, 시장을 선점하기 위한 제약업계의 경쟁이 치열해지며, 전 세계적으로 바이오시밀러 시장의 경쟁이 예상된다 (Table 10).

Table 10. 주요 바이오의약품 특허 만료 현황

Biologics	Type	Class	Disease Area	Patent Expiry
Enbrel	Fusion Protein	TNF Inhibitor	Rheumatic Diseases	October 2012
Epogen	Recombinant Protein	Erythropoietin	Anemia	August 2015
Neulasta	PEGylated Recombinant Protein	G-CSF analog	Cancer(Chemotherapy Support)	October 2015
Humira	Monoclonal Antibody	TNF Inhibitor	Rheumatic And Inflammatory Disease	December 2016
Avastin	Monoclonal Antibody	Anti-angiogenesis	Cancer	February 2018
Rituxan	Monoclonal Antibody	Anti-CD20	Hematological Cancers, Rheumatoid Arthritis	December 2018
Remicade	Monoclonal Antibody	TNF Inhibitor	Rheumatic, Inflammatory Disease	December 2018
Herceptin	Monoclonal Antibody	Anti-HER2	Breast Cancer	December 2019

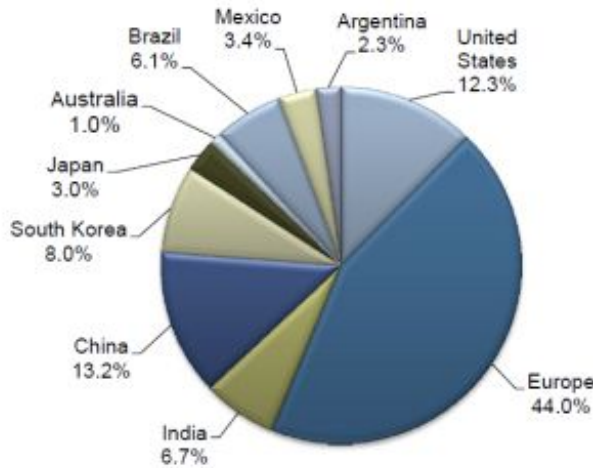
(출처 : Frost & Sullivan, 2012)

연간 5,000 달러에서 300,000 달러에 이르는 일반 바이오의약품의 높은 비용 절감을 위해 이에 비해 20-30% 저렴한 바이오시밀러 의약품에 대한 관심이 커지고 있으며, 따라서 향후 4-5년 동안 시장 내에서 바이오시밀러 수는 지속적으로 증가할 것이며, 새로운 바이오시밀러 경쟁자들의 출현으로 시장의 지속적인 확대가 예상된다. 대형 제약사, 바이오텍, 제네릭기업 등이 바이오시밀러 시장으로 새롭게 진출할 것으로 예상되고 있고, 바이오시밀러 분야의 제한된 경험으로 유럽시장에서 기업들이 수익을 창출하는데는 시간이 걸릴 수 있으나, 5-7년 후에는 그 주기가 짧아질 것으로 보인다.

얼라이드 마켓 리서치(AMR)에 의하면, 바이오시밀러의 상업화를 이끄는 요인에는 면역질환의 광범위성과 비용 효율적인 의약품에 대한 수요가 있고 그 중에 단일클론 항체와 에리스로포에틴(erythropoietin) 등 잠재성이 높은 분야는 관련 시장의 성장을 견인할 것으로 예상되고 있으며, 폴리트로핀, 인터페론, 인슐린 바이오시밀러가 수익성 있는 분야로 떠오를 것이라 예상하였다. 또한 2020년까지 가장 높은 수익을 올릴 가능성이 있는 약물로 에리스로포에틴 계열 바이오시밀러를 꼽았으며 그 뒤로 과립구집락 자극인자(G-CSF) 계열 바이오시밀러가 차지할 것으로 내다봤다.

글로벌 바이오시밀러 시장 현황은 2012년을 기준으로 글로벌 바이오시밀러 시장을 지역별로 보았을 때, 유럽이 44%로 가장 큰 비중을 차지하고 있으며, 유럽은 규제당국(EMA)의 바이오시밀러 승인증가로 가장 큰 시장을 형성하는데 반해, 미국은 한동안 FDA의 명확한 가이드라인의 부재로 제한된 제품들만이 판매되고 있다. APAC 국가들 중에는 중국, 인도, 한국이 중요한 역할을 하고 있으며, 라틴아메리카 국가들 중에는 브라질, 멕시코, 아르헨티나가 주요 시장으로 부상하고 있다.

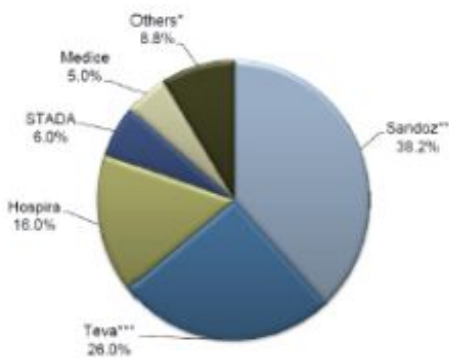
<주요 국가별 바이오시밀러 마켓>



(출처 : Frost & Sullivan, 2014)

기업별로는 Top 3 제약사(Sandoz, Teva, Hospira)의 매출이 전체의 80.2%를 차지하고 있으며, Sandoz는 R&D와 생산능력에 대규모 투자를 바탕으로 글로벌 시장을 리드하고 있고, Teva는 G-CSF 분야에서, Hospira는 EPO 분야에서 높은 매출을 기록하고 있다.

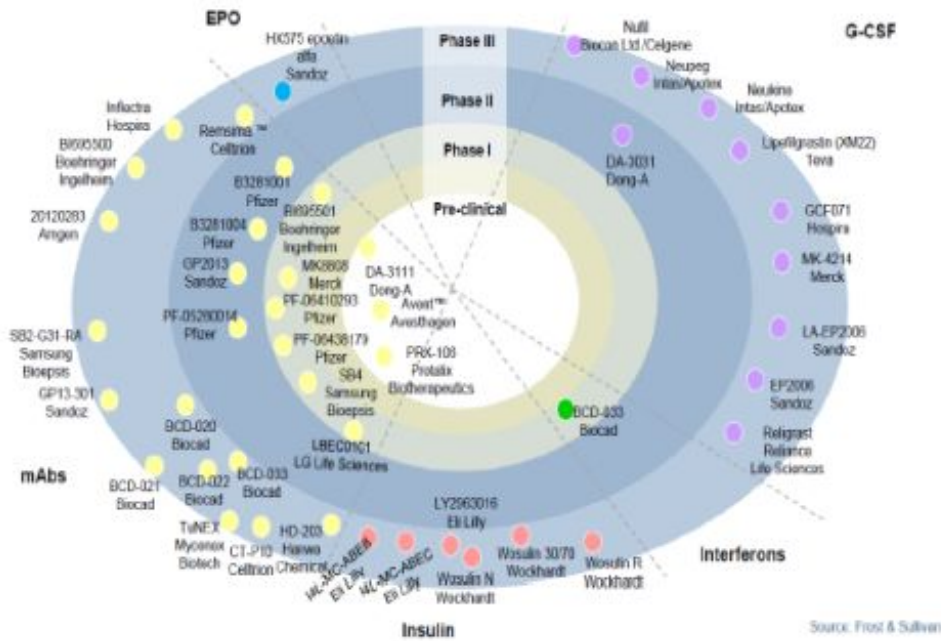
<기업별 바이오시밀러 마켓>



기업명	매출(백만 달러)
Sandoz*	335.0
Teva Pharmaceutical**	227.7
Hospira	140.2
STADA	52.6
Medice	43.8
Others***	76.8
Total	876.1

(출처 : Frost & Sullivan, 2014)

<개발 중인 바이오시밀러 파이프라인 분석>



(출처 : Frost & Sullivan, 2014)

글로벌 바이오시밀러 시장 전망: 글로벌 바이오시밀러 시장은 시장 제약 요인에도 불구하고 2012년 8.8억 달러에서 CAGR 60.4%의 고성장으로 2019년에는 240억 달러에 이를 것으로 전망되며, 미국, 인도, 일본, 한국 및 신흥국들의 관련 정책 변화로 2013년-2014년 사이에는 시장 규모가 눈에 띄게 증가할 것으로 보이고, 2015년 유럽시장에서는 단일클론항체 바이오시밀러 블록버스터가 출현할 것으로 예측 된다 (Table 11).

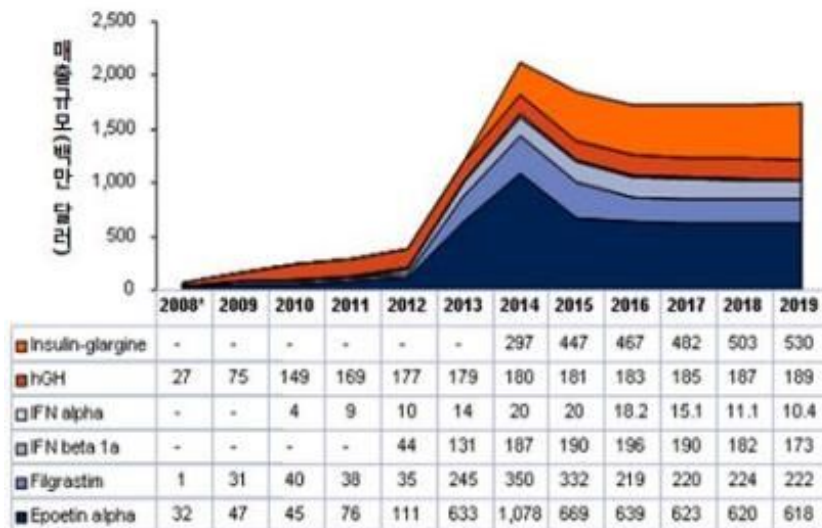
Table 11. 글로벌 바이오시밀러 시장전망

Year	United States (\$ Million)	Europe (\$ Million)	APAC (\$ Million)	LATAM (\$ Million)	Total (\$ Million)
2009	9.3	113.9	78.1	41.0	242.3
2010	31.6	172.0	122.2	56.4	382.2
2011	64.7	257.0	176.7	72.7	571.1
2012	107.6	385.5	279.5	103.5	876.1
2013	138.2	595.5	341.1	123.1	1,197.9
2014	152.1	933.5	428.0	150.2	1,663.8
2015	2,775.5	1,485.0	560.5	187.7	5,008.7
2016	4,486.4	2,405.0	778.8	242.2	7,912.4
2017	6,845.5	3,987.0	1,155.5	324.5	12,312.5
2018	8,315.3	6,612.7	1,816.6	447.8	17,192.4
2019	9,313.1	10,974.1	3,026.9	631.5	23,945.6
CAGR (%)	89.1	61.3	40.5	29.5	60.4

(출처 : Frost & Sullivan, 2014)

2012년 기준 G-CSF의 오리지널 바이오의약품 가격은 mg당 368-372 달러 사이이며, 바이오시밀러 가격은 292-296달러 사이이나, 블록버스터 신약의 특허 만료 여파로 2019년까지 mg당 평균 232 달러 선으로 하락이 예상되며, HGH의 오리지널 바이오의약품 가격은 mg당 36-40 달러 사이고 바이오시밀러 가격은 36-40달러 사이로 형성되고 있으며, 향후 경쟁약품의 부재로 가격에 큰 변동이 없을 것으로 보인다. 또한 EPO의 mg당 오리지널 바이오의약품 가격은 131-135 달러 사이이며, 바이오시밀러 가격은 54-56달러 사이이나, 2019년까지 mg당 평균 57 달러 선으로 소폭 상승이 예상된다.

<바이오시밀러 의약품별 매출규모 현황 및 전망>

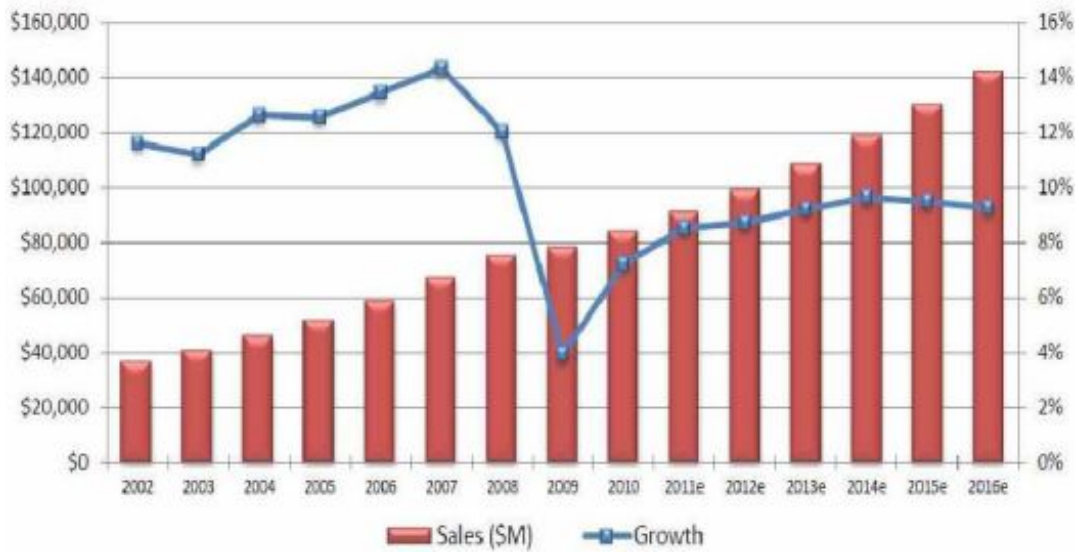


원출처 : IMS Health, MIDAS sales data, 2009.3; Datamonitor 생명공학정책연구센터 재가공

4. 국외 기능성 건강식품 동향

웰빙트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가 및 가속화되는 고령화 등의 이유로 기능성 식품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 성장 잠재력이 풍부한 시장으로 인식되어지고 있다. 건강기능식품의 분류기준에 따라 세계시장규모의 추정에는 차이가 있지만, Nutrition Business Journal (2012)의 자료에 따르면 2010년 건강기능식품 세계시장 규모는 약845억 달러로 추정된다. 세계건강기능식품 시장규모는 2009년 대비 802억달러) 5.4%의 성장을 기록하고 있다 (Fig. 1 & Table 12).

(단위: 백만달러)



(출처: Global Supplement & Nutrition Industry Report, 2012)

Fig. 1. 연도별 세계 기능성식품 시장규모

또한 NBJ의 분류기준에 의한 제품유형별 시장규모를 보면 비타민·무기질은 약 348억 달러로 2009년 대비 (331억달러) 5.1% 증가하였으며 허브/식물류 225억 달러 (2009년 대비 4.2% 증가), 스포츠류 특수식 272억달러(2009년대비 6.7% 증가)로 나타났다.

Table 12. 세계 건강기능식품 규모

(단위: 백만달러)

제품유형	2007	2008	2009	2010
비타민&무기질	29,618	31,593	33,092	34,838
허브/식물류	20,218	20,871	21,624	22,459
스포츠류&특수식	22,462	24,027	25,469	27,204
총 판매액	72,297	76,491	80,185	84,500

(출처: Global Supplement & Nutrition Industry Report, 2012)

2010년 지역별 건강기능식품 매출액 현황은 미국이 281억달러(33.2%)로 가장 큰 시장 규모이었으며 다음으로 서유럽(153억 달러, 18.1%), 일본 105억 달러, 12.4%), 중국(95억 달러, 11.2%) 순으로 나타났다 (Table 13).

Table 13. 지역별 세계 건강기능식품 규모 (2007~2010)

(단위: 백만달러)

지역	2007	2008	2009	2010
미국	23,281	25,351	26,881	28,066
서유럽	14,144	14,653	14,995	15,290
동유럽/러시아	2,756	3,305	3,432	3,727
일본	10,778	10,423	10,411	10,487
캐나다	1,312	1,385	1,458	1,531
중국	7,379	8,068	8,638	9,540
기타 아시아	5,867	6,263	6,851	7,558
라틴아메리카	3,434	4,034	4,374	4,955
호주/뉴질랜드	1,628	1,735	1,780	1,854
중동	636	711	762	831
아프리카	530	563	603	660
합계	72,297	76,490	80,185	84,500

(출처: Global Supplement & Nutrition Industry Report, 2012)

미국 : 소아비만 및 성인병에 대한 경각심이 부각되면서 미국 소비자의 식품 소비 경향이 변화됨에 따라 미국의 기능성식품 시장은 2000년 519억불에서 2008년 1,040억 불로 급격히 성장하는 등 꾸준한 매출 증가를 보이고 있다. 2008년 미국 기능성식품 시장은 전년 대비 8.8% 성장한 1,040억불로 집계되었으며, 소아비만, 체중과다, 성인병 등에 대한 경각심과 인구의 고령화 및 건강보험료에 대한 부담 등으로 인하여 질병의 예방에 대한 관심이 높아지고 있는 점 등을 미루어 볼 때 미국 기능성식품 시장은 향후에도 지속적으로 성장할 것이며, 이에 따라 미국 Nutrition Business Journal은 2008년 대비 63.5% 성장한 1,700억 달러를 형성할 것으로 전망하고 있다. Supplements 세부품목별로는 멀티비타민의 매출이 47억불로 가장 높았으며, Fish/Animal Oil이 18.0%로 가장 높은 성장률을 보였다. 프로바이오틱스와 비타민B도 각각 16.3%와 9.4%로 전년 대비 높은 성장을 했다.

일본 : 단일국가로는 미국 다음으로 큰 시장을 형성하고 있는 일본 건강식품 시장은 건강식품에 대한 법 규제 및 행정 감시 강화(2004년 4월부터 2005년 6월 보건기능식품 관리제도와 법규를 제정비 함), 부정 상법 적발 등에 의한 소비자 심리의 악화 등으로 2006년부터 2009년까지 4년 연속 하락을 지속하다 2010년에는 고령화 사회의 확대, 경제 환경의 악화로 인한 의료, 복지, 건강정책 불안, 건강식품에 대한 소비자의 기대치 상승 등의 원인으로 전년 대비 6.0% 성장을 하며 1조 1800억엔(약 146억불) 시장을 형성하였다. 미용, 관절이 시장의 키워드로 자리매김하면서 콜라겐, 히알루론산, 글루코사민 등의 인기가 특히 높아지고 있다.

제 2 절 국내 기술개발 현황

1. 국내 버섯 연구동향

가. 국내 연구논문 동향

: 국내 연구 논문의 대부분은 새송이버섯의 재배/균사체 배양 조건, 영양학적 가치와 식품으로서의 활용성, 추출물의 생리활성 효과 (항암, 항산화, 항당뇨 등) 및 이화학적 특성, 칼슘 강화 버섯의 프로테옴 분석, biomass 생산 조건 등에 관한 논문들이 대부분이고 버섯 및 식물 특이 프로모터하에 외래 유전자 도입에 의한 발현 및 분비, 단백질 대량생산 등에 관한 논문들은 거의 전무한 상태이다.

(1) 표고와 새송이버섯이 대장암 세포 증식 및 세포사멸에 미치는 영향 (Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* Extracts on Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines) : 일반적으로 여러 종류의 질병에 약리 효과가 있다고 알려진 버섯류 중 표고버섯과 새송이버섯을 택하여 열수추출하고 그 추출물의 세포사멸 및 항암 효과를 연구 (한국식품영양과학회지 vol 32, 217-222, 2003)

(2) 새송이버섯이 고지방 식이를 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향 ((Effects of *Pleurotus eryngii* on Lipid Metabolism in Rats Fed High Fat Diet : 새송이버섯이 고지방식이를 섭취한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향을 조사하고자, 성숙한(생후 21주령) 숫쥐에 표준식 이에 20% 든지를 첨가한 식이를 급여한 대조군과 비교하여 효과 검정 (한국식품영양과학회지 vol 34, 626-631, 2005)

(3) 새송이버섯 부위별 추출물의 이화학적 특성 (Physicochemical Characteristics of Ethanol Extracts from Each Part of the *Pleurotus eryngii*) : 연구 결과 동결건조한 새송이 버섯 분말의 수분함량은 9.0%였고 당질이 63.06%로 가장 높았으며 조단백질 20.70%, 조회분 5.20% 및 조지방 2.0%의 순의 결과 도출 (한국식품생활문화학회지. vol 21, 297-302, 2006)

(4) 새송이 버섯을 첨가한 증편의 관능적, 물리화학적 품질 특성 변화 (Sensory and Physicochemical Characteristics of Jeungpyun with *Pleurotus eryngii* Powder) : 진통 증편에 새송이 버섯을 첨가하여 증편의 이화학적, 기계적, 관능적 품질 특성을 조사 (한국식품과학회지. vol 39, 194-199, 2007)

(5) 새송이버섯 biomass를 위한 최적배양 조건 (Culture Condition for Biomass of *Pleurotus eryngii*) : 새송이버섯의 biomass를 위한 최적조건을 규명한 결과, 균사체 spot 배양을 위한 최적 조건은 PDA배지를 사용하여 24°C에서 18일 배양 시 최적 조건인 것으로 확립하여 균사체 biomass 생산 (*한국응용생명화학회지*. vol 50, 1-5, 2007)

(6) 새송이 버섯과 그 부산물의 항산화성 (Antioxidative Effects of *Pleurotus eryngii* and Its By-products) : 새송이 버섯과 그 부산물인 버섯파치, 균체파치 및 버섯파치 발효액의 기능성을 알아보기 위하여 이화학적인 특성, 항산화능 및 아질산염 소거능을 분석 비교 (*한국생명과학회지*. vol 18, 1360-1368, 2008)

(8) 새송이버섯 분말을 첨가한 쿠키의 품질 및 항산화활성 (Quality Characteristics and Antioxidant Activities of Cookies Added with *Pleurotus eryngii* Powder) : 새송이버섯 분말을 첨가하여 제조한 쿠키의 품질 및 항산화능을 평가. (*한국식품과학회지*. vol 42, 183-189, 2010)

(9) 글루탐산나트륨 첨가배지에서 재배된 새송이버섯의 특성 및 생리활성 연구 (Characteristics and Biological Properties of *Pleurotus eryngii* grown on Monosodium Glutamate-enriched Media) : 새송이 버섯 재배배지에 글루탐산나트륨 (monosodium glutamate, MSG)을 혼합 첨가하여 재배한 자실체의 아미노산 및 γ -aminobutyric acid (GABA)의 조성변화 및 생리활성 규명 (*한국생물공학회지*. vol 25, 277-282, 2010)

(10) 새송이 버섯의 배양공정 확립 및 식물성 에스트로젠 활성성분 탐색 (Establishment of Mass Culture Process and Isolation of Phytoestrogenic Components from *Pleurotus eryngii*) : 새송이버섯의 생육특성조절에 의한 대량배양의 세부공정을 확립하였으며 특히 대두박 액체종균배양과 버드나무-포플러 톱밥 고체 배양의 공정 개발 (*경북대학교 교육대학원*, 한국교육학술정보원, 2011)

(11) 칼슘함량이 강화된 새송이 버섯의 프로테옴 분석 (Proteomic Characteristics of Calcium Enriched King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii*) : 본 연구에서는 프로테오믹스 기술을 활용하여 칼슘함량이 증가된 새송이버섯과 일반 새송이 버섯에서 단백질 발현의 변화를 조사. (*한국식품과학회지*. vol 43, 12-16, 2010)

(12) LED광의 파장을 달리하여 재배한 새송이버섯의 품질특성 (Quality

Characteristics of *Pleurotus eryngii* Cultivated with Different Wavelength of LED Lights) : 새송이버섯 재배에 효과적인 LED 광질을 구명하기 위하여, 청색광(450 nm), 적색광(650 nm), 녹색광(525 nm), UV-A(365 nm) 및 혼합광 등을 사용하여 품질에 미치는 영향을 조사 (한국식품저장유통학회지. vol 19, 354-360, 2012)

(13) 커피박 첨가에 의한 새송이버섯 균사체의 생육 및 생리활성 증가 (Enhancement of growth and bioactivity of *Pleurotus eryngii* mycelia by spent coffee ground) : 새송이버섯에 커피박을 농도별로 처리하여 균사체 성장에 미치는 영향 및 생리활성레 미치는 영향을 조사 (농업생명과학연구. vol 46, 157-163, 2012)

나. 국내 특허 동향

(1) 분비 백터를 이용하여 버섯으로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법 (출원 10-2007-0082453) : 분비 백터를 도입시켜 형질전환된 버섯으로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법 (세포내 발현) ; 한국, 조선대학교

(2) 라카아제 활성이 강화된 겨울우산버섯의 형질전환체 (출원 10-2009-0026511) : 겨울우산버섯에 리그닌 분해 효소 유전자의 발현이 증가된 형질전환체 (세포외 발현) ; 한국, 산림청 국립산림과학원

(3) 버섯형질전환을 이용한 재조합단백질 (출원 10-2009-0034803) : 아그로박테리움을 이용한 큰느타리버섯 균사체의 형질전환 (세포내 발현) ; 한국, 조선대학교, (주) 캐러스

(4) 표고버섯 유전육종법을 이용한 유용단백질 생산 방법 (출원 10-2009-0097852) : 형질전환된 표고버섯에서 유용 단백질을 생산하는 발현백터를 구축하여 유용 단백질의 생산 방법 (세포내 발현) ; 재단법인 장흥균버섯연구소

(5) 겨울우산버섯의 망간에이즈 퍼옥시다아제 유전자 및 이를 함유하는 재조합 벡터 (출원 10-2010-0036694) : 겨울우산버섯에 manganese peroxidase 유전자에 의한 리그닌 분해 가능성이 강화된 식용버섯을 포함한 진균류의 생산 및 이용 (세포내 발현); 한국, 산림청 국립산림과학원

(6) 버섯 형질전환용 재조합 벡터 및 이를 이용한 목적 단백질 제조방법 (A

Recombinant Vector for Transformation of Mushroom and Methods for Preparation of Target Protein Using the Same (등록 : 1014062840000, 2014.06.03.) : 대한민국, 씨엔제이바이오텍(주)

2. 국내 GM 작물현황

현재 GMO의 안전성에 논란이 지속되고 있는 실정이지만, 10년 이상 넘게 이용해온 GM 식품으로 인한 위해성이 발견되지 않았다는 것이 생명공학계 및 관련 산업업계의 입장인 반면, 인위적으로 유전자를 조작한 식품이 인체에 좋을 리 없다는 일부 소비자 단체의 반대 주장이 팽팽한 가운데 식품공업협회가 대국민 이해도 증진을 위해 홍보 활동에 나서고 있어 GMO 논란은 쉽게 사그라지지 않을 전망이다, 2000년부터 우리나라에서도 수입이 허가되었다.

국내에서는 GM작물이 상업화를 위해 승인된 예는 현재까지 하나도 없지만, 최근 국제적 추세에 맞추어 식물 유전체 연구를 본격적으로 수행하고 있으며, 농촌진흥청을 중심으로 한국생명공학연구원 및 전국의 많은 대학 연구실에서 제초제, 병 혹은 각종 재해에 대한 저항성을 높이거나 기능성을 강화한 벼, 토마토, 감자, 콩, 고추, 배추, 마늘, 들깨, 담배, 페튜니아, 국화, 장미 등 다양한 GM 작물을 개발하고 있으며, GM작물이 기존의 육종기술로는 해결이 어려운 농업현장의 문제를 극복해 줄 수 있는 최첨단기술이므로 국가경쟁력 차원에서도 확보해야 한다는 판단에서 개발이 증가하는 추세다.

현재까지 농진청이 그동안 개발한 GM작물은 19개 작물에 128개 품종. 품목별로는 벼가 63종으로 가장 많고, 누에(14종), 배추(10종), 유채(9종), 감자(7종), 콩(6종) 등이다. 이 중 안전성 평가단계에 와 있는 GM작물은 벼(3종), 고추 (1종), 배추(1종) 등이며 또한 기능검정단계는 16개 작물 70종이고, 유전자 검정단계는 9개 작물 30종이 있으며, 쌀에 부족한 비타민A를 강화한 GM황금쌀은 2016년 상업화가 예고돼 있다.

우리나라의 GMO 수입액도 늘고 있다. 2010년에 수입승인을 받은 GMO는 식용과 사료용을 포함해 848만2,000톤 (21억3,688만9,000달러)으로 2009년의 728만톤(17억7,439만 달러)에 비해 16.5%가 늘었다. 특히 2010년에 식용으로 수입된 옥수수도 99만 3,000톤에 달해 2009년의 수입량 47만1,000t보다 110%나 증가했다.

우리나라가 GM작물 육성과 안전성 평가 및 관리기술에 대한 국제수준의 기술력을

확보해 놓는다면, GM작물 상용화시대가 왔을 때 국제기술 우위를 선점할 수 있고, 세계 GM종자 시장 진출로 경제적 이익 창출도 가능하다고 보고 있다. 농진청은 세계 GM종자 시장이 2015년에는 20조원 이상으로 예상되고, 유전자 1건이 글로벌 GM종자 시장에 진입해 상품화될 경우 로열티 등 기술료 수입만도 연간 1,500억원에 달하는데다 GM기술을 이용한 신기능성 추가 등으로 농가소득 증대는 물론 농산업의 시장규모도 확대될 것으로 기대하고 있다.

한 다국적 기업의 분석에 따르면, GM작물 한 품목 개발에 최소 10년이 걸리고 비용도 1,000억원 이상 소요된다고 예상한다. 또한 세계 종자시장의 흐름이 GM종자로 바뀌고 있어 우리나라도 GM작물에 대한 투자가 매우 절실하며 이에 대한 대비가 중요하다. 하지만 우리나라는 소비자와 농가들의 GM작물에 대한 부정적인 정서 등의 영향으로 현재 재배가 승인돼 상업화된 GM작물은 단 한건도 없다. 따라서 우선 소비자와 농가들이 신뢰할 수 있는 안전성 확보가 관건이다. GM작물을 상업화하려면 환경과 인체 유해성 평가를 거친 후 농진청과 식품의약품안전청의 심사·승인을 받아 국립종자원에 품종등록을 해야 하는데다 부정적인 정서가 높은 소비자와 농가들도 설득해야 하기 때문이다.

3. 국내 바이오시밀러 동향

가. 국내 바이오산업 동향

2013년도 국내 바이오산업 생산규모는 총 7조 5,238억 원으로 2012년(7조 1,445억원) 대비 5.3% 증가하였으며, 최근 5년간(2009년-2013년) 1.4배 수준으로 증가(5.3조원→7.5조원, 연평균 증가율 8.9%) 했다. 2013년도 바이오산업 분야별 생산규모는 바이오식품(40.2%)과 바이오의약(36.9%)이 전체의 77.1%를 차지한다. 또한 바이오식품 분야에서는 사료첨가제(63.6%)와 식품첨가물(17.7%) 비중이, 바이오의약 분야에서는 혈액제제(21.6%)와 백신(19.9%) 비중이 높았으며, 생산 증가율로는 바이오전자(22.5%)와 바이오화학(11.8%)이 가장 크게 증가하였고 바이오센서의 국내판매 및 수출 증가에 따라 바이오전자산업의 전년 대비 증가율이 가장 큰 폭으로 나타났다. 바이오화장품 및 생활화학제품 국내판매량 증가와 바이오고분자 수출 증가로 바이오화학 생산규모 증가했다 (Table 14 & 16).

Table 14. 바이오산업 분야별 생산규모 변화 추이(2012년-2013년)

(단위 : 억원, %)

구분	2012년	비중	2013년	비중	증감률
바이오의약	27,087	37.9	27,754	36.9	2.5
바이오화학	5,030	7.0	5,622	7.5	11.8
바이오식품	28,579	40.0	30,211	40.2	5.7
바이오전자	1,238	1.7	1,517	2.0	22.5
기타	9,511	13.3	10,135	13.5	6.6
전체	71,445	100.0	75,238	100.0	5.3

(산업통상자원부)

수출규모는 2013년 3조 1,664억 원으로 2012년(3조 475억 원) 대비 3.9% 증가하였으며, 2009년-2013년 연평균 6.7% 증가하여 동 기간 연평균 수입증가율 2.1%보다 높은 수치를 보였다 (2013년 수입규모는 1조 5,095억 원). 분야별로는 바이오식품 1조 6,821억 원(53.1%), 바이오의약 1조 1,386억 원(36.0%), 바이오전자 1,159억 원(3.6%) 순서를 보였다. 전년대비 수출증가율은 식품첨가물(69.5%), 기타바이오의약품(36.8%), 건강기능식품(31.6%), 백신(21.7%), 바이오센서(15.5%) 순서다. 바이오산업 내수규모는 2013년 5조 8,669억 원으로 2012년(5조 5,281억 원) 대비 6.1% 증가하였으며, 2009년(4조 2,367억 원) 대비 38.5% 성장했다 (Table 15 & Fig. 2).

Table 15. 바이오산업 분야별 수급 규모 및 투자 현황

(단위 : 백만달러)

구분	생산	내수	국내 판매	수출	수입	연구 개발	시설 투자
전체	6,870.8	5,357.7	3,979.2	2,891.6	1,378.4	1,064.0	202.4
바이오의약산업	2,534.5	2,704.5	1,494.9	1,039.7	1,209.7	782.9	158.4
바이오화학산업	513.4	470.5	411.9	101.5	58.5	87.5	13.9
바이오식품산업	2,758.9	1,265.3	1,222.7	1,536.1	42.6	98.8	14.1
바이오환경산업	27.5	27.7	27.5	0.0	0.2	9.8	1.7
바이오전자산업	138.5	34.0	32.7	105.8	1.3	19.0	1.6
바이오공정 및 기기산업	112.1	119.2	67.1	45.0	52.1	17.0	1.4
바이오에너지 및 자원산업	608.1	593.9	581.9	26.2	12.0	19.0	1.9
바이오검정, 정보서비스, 연구개발산업	177.8	142.5	140.4	37.3	2.0	30.1	9.4

(2013년 기준 연평균 환율 1,095.04원/달러 적용)

2009년~2013년 바이오산업 수급 변화 추이



Fig. 2. 바이오산업 수급 변화 추이

국내 바이오산업 생산규모를 보면 그동안 바이오산업의 주력분야인 바이오의약품과 바이오식품분야는 소폭 상승하였으나, 융합분야인 바이오전자와 바이오화학분야는 각각 두 자리 수의 성장세를 보였다. 산업통상자원부는 이러한 기업 및 시장상황에 맞춰 헬스케어, 유헬스 등 바이오융합분야의 지원 확대와 더불어, 바이오화학 산업화 촉진기술개발 사업 지원과 산학연 협의체 운영 등을 통해 신성장분야에 대한 지원도 적극 추진한다고 한다.

Table 16. 바이오산업 주요 국내판매 제품 (2013년)

(단위: 백만원, %)

순위	코드명	제품명	국내판매액	구성비
1	3050	사료첨가제	695,739	16.0
2	1060	혈액제제	502,966	11.5
3	1000	기타바이오의약품	445,291	10.2
4	7010	바이오연료	424,150	9.7
5	3010	건강기능식품	336,795	7.7
6	2040	바이오화장품및생활화학제품	323,189	7.4
7	1030	백신	310,089	7.1
8	7020	인공종자및묘목	166,066	3.8
9	3030	식품첨가물	146,856	3.4
10	1040	호르몬제	112,457	2.6
11	1100	동물약품	87,439	2.0
12	3040	발효식품	83,023	1.9
13	8050	바이오안전성및생리활성평가서비스	78,421	1.8
14	1080	신개념치료제	56,917	1.3
15	1050	면역제제	49,570	1.1
16	3020	아미노산	44,761	1.0
17	7000	기타바이오에너지및자원	42,136	1.0

나. 국내 바이오시밀러 동향

신약개발은 1980년대 전통의약품으로 시작되어 합성(화합물)신약에서 바이오신약으로 빠르게 전환하고 있는 추세이다. 특히 최근 성숙기에 접어든 전통적 합성의약품의 대안으로 높은 치료율과 낮은 부작용을 보이는 치료용 단백질, 항체, 백신 등 바이오의약품이 높은 성장률을 보이며 전체 의약품 시장에서 영역을 확대해 나갈 전망이다. 그러나 바이오신약은 제품 출시까지 막대한 연구비용이 소요되어 유사한 약효를 나타낼 수 있는 바이오시밀러 분야에 대한 관심이 고조되고 있다. 특히 블록버스터 의약품의 특허만료에 따라 국내 바이오시밀러 연구 및 시장진출이 확대되는 추세이며, 국내 기업들의 바이오시밀러 시장 진출과 함께 정부의 허가 관련 가이드라인 및 정책적 지원이 활발하게 이루어지고 있다.

시기	정책	내용
2009.03	정부의 '신성장동력 스마트 프로젝트' 중 바이오 산업 4개 과제 선정	글로벌시장 진출을 위한 바이오 시밀러 제품군 개발 등에 정부 300억원 투자(주관기관:삼성전자, 셀트리온, LG생명과학)
2009.07	바이오시밀러 허가심사 규정 및 평가 가이드라인 마련	바이오시밀러 승인시 평가 기준 등 마련
2010.01	바이오시밀러 허가 제도 내실화	신속 허가, 단위별 심사 대상 확대 등
2010.06	품목 허가 신청 전 단위별 심사제도 도입	품질, 비임상, 임상 등 단위별로 우선 심사하여 검토 소요기간 단축
2010.09	바이오 의약품산업 발전 전략 기획단 발족	산업지원을 위한 컨트롤 타워 및 업계와의 상시 소통채널 구축
2010.09	임상 시험용 생물의약품 품질 평가 가이드라인	바이오시밀러 개발지원
2010.12	바이오 시밀러 업체 해외 진출 적극 지원	WHO가이드라인 제정 참여 등 국제기준에 부합한 허가제도 운용(허가·심사 규정, 평가 가이드라인 영문판 발간)
2011.01	바이오 의약품 표준화를 위한 WHO 협력센터 지정	미FDA, 영국NIBSC, 일본NID, 독일 PEI에 이어 5번째 (국제 가이드라인 마련, 국제교육 등 국제 기준 조화선도)

바이오시밀러는 (이미 제조판매·수입품목 허가를 받은 품목과 품질 및 비임상·임상적 비교동등성이 입증된 생물의약품으로 정의) 바이오신약 중 하나로, 바이오신약(단백질 의약품)의 특허만료에 따라 유사한 성분 및 효능을 가지도록 하는 복제 의약품으로서 화학적 합성의약품의 복제약인 제네릭 의약품과는 달리 단순한 모방제품이 아닌 오리지널 의약품과의 동등한 성분을 이용하여 독자적인 기법을 통해 생산하는 것이 특징이다. 미국 FDA의 첫 바이오시밀러 승인이 임박한 것으로 알려지며 세계 최대 시장 진입을 통한 바이오시밀러 시장 활성화가 기대되고 있으며, 특히 바이오시밀러 시장 확대에 따라 현재 임상 3상 단계의 품목이 많은 국내 업체의 연구개발 경쟁력이 올해 세계적으로 한층 더 부각될 것이란 분석이다 (Table 17).

아시아-태평양 국가들 중에는 중국, 인도, 한국이 높은 비중을 차지하고 있으며, 한국은 조사 대상 국가 중 4번째, 아시아에서는 중국 다음으로 높은 점유율을 나타내고

있다 (바이오시밀러 시장 점유율 : 유럽 44.0%, 중국 13.2%, 미국 12.3%, 한국 8.0%). 한국 바이오시밀러 시장은 2012년 7,000만 달러에서 연평균 7.8%의 성장률을 보이며 2019년까지 1.2억달러 규모로 성장할 것으로 예측된다. 특히 단일클론항체 분야를 중심으로 바이오시밀러 시장이 형성될 것으로 보이며 국내 제약회사들은 항체 바이오의약품 개발에 지속적으로 투자해 오고 있고, 특히 특허가 만료되는 항체 치료제의 바이오시밀러 및 바이오베터에 R&D를 집중하고 있다.

Table 17. 특허 만료가 예상되는 바이오의약품

성분	적용증	브랜드명	개발기업	특허만료 시점
인간 인슐린	당뇨병	Humulin	Eli Lilly	2002
인간 인슐린	당뇨병	Novolin	Novo Nordisk	2002
인간 성장호르몬	성장호르몬결핍	Nuytopin	Genentech	2002
인간 성장호르몬	성장호르몬결핍	Humatrope	Eli Lilly	2002
인터페론 알파-2b	백혈병	Intron-A	Schering-Plough	2002
EPO	빈혈	Epogen	Amgen	2004
EPO	빈혈	Procrit	Johnson&Johnson	2004
TPA	심부전, 심장발작	Activase	Genentech	2005
인간 성장호르몬	성장호르몬결핍	Protropin	Amgen	2005
G-CSF	항암치료 보조	Neupogen	Genzyme	2006
Imiglucerase	Gaucher병	Cerezyme	Biogen Idec	2010
인터페론 베타-1b	다발성 경화증	Avonex		2011

(자료 : ABN, AMRO, WSJ, ADL 종합)

주요 블록버스터 바이오의약품 특허만료 현황			
제품명	개발사	적용증	특허만료
엔브렐	암젠	류머티스 관절염	2012년
에포젠	암젠	빈혈	2013년
레미케이드	존슨앤존슨	류머티스 관절염	
아보넥스	바이오젠아이맥	다발성경화증	
레비프	세로노	다발성경화증	
휴마로그	릴리	당뇨병	
뉴프젠	암젠	호중구감소증	
세레자임	젠자임	고셔병	
리톡산	제넨텍	비호지킨림프종	2015년
뉴라스타	암젠	백혈구 개선 촉진	
란투스	사노피아벤티스	당뇨병	
휴미라	에보트	류머티스 관절염	2016년
허셉틴	제넨텍	유방암	2019년
아바스틴	제넨텍	대장암	
루센티스	노바티스	황반변성	

자료: Evaluate Pharma, 고보증권 리서치센터, 주: 미국특허만료일, 특수 특허가 존재하는 경우 최종 만료 연도 기재

국내 기업들도, 삼성전자를 비롯해 동아제약, 셀트리온, LG생명과학, 녹십자, 한화, 한올바이오파마 등이 이미 참여하여 이 시장에 뛰어든 상태이다. 셀트리온에서 판매될 예정인 Johnson & Johnson의 레이케이드(Remicade) 바이오시밀러 램시마와 Roche의 허셉틴(Herceptin) 바이오시밀러 허쥬마 등이 대표적인 제품이며, 동아제약의 Viteron - A INJ와, LG 생명과학(인도)의 Intermax Alpha, Intermax- Gamma가 개발되어 판매되고 있다. 2011년 삼성바이오로직스는 Biogen Idec과 3억 달러 합작 회사를 설립하고 바이오시밀러 제품개발에 들어갔고, 한화케미칼은 Amgen의 류마티스 관절염 치료제 엔브렐(Enbrel)의 바이오시밀러 HD-203 개발하고 사용화하기 위해 Merck & Co.와 전략적 제휴를 구축하였다 (Table 18).

<국내 바이오 시밀러 임상 승인 현황>

대조약 (오리지널)	성분명	회사명	임상단계	승인일
허셉틴	트라스투주맙	셀트리온	1/2b상	2009.08
엔브렐	에타너셉트	한화케미칼	1상	2009.12
엔브렐	에타너셉트	LG생명과학	1상	2010.05
레이케이드	인플리시맙	셀트리온	1상	2010.10
맙테라	리툭산	삼성전자	1상	2011.03

Table 18. 국내에서 개발중인 바이오시밀러 현황

Product	Component	Indications	Company	Strategic Alliance	Stage
Remsima	Infliximab	Rheumatic arthritis	Celltrion	Hospira	Approved by EMA
Valtropin	Somatropin	GHD; Turner syndrome	LGLS	Sioparthen GmbH	Approved by US FDA/EMA
Eutropin	Somatropin	GHD; Turner syndrome	LGLS	Sioparthen GmbH	Marketed in South Korea
Leucostim	Rilgrastim	Neutropenia after chemotherapy of solid cancer	Dong-A Pharma	N/A	Marketed
Viteron-AIU	Interferon Alpha-2a	Myeloma, malignant melanoma, pseudo-Kaposi sarcoma, hairy cell leukemia, renal cancer	Dong-A Pharma	N/A	Marketed
Intermax Alpha	Interferon Alpha-2a	Chronic HCV, Improvement of viremia in chronic HBV	LGLS	N/A	Manufactured LGLS India
Intermax Gamma	Interferon Gamma	Vaccine against influenza virus type A and type B	LGLS	N/A	Marketed in South Korea
CT-P6	Trastuzumab	Breast Cancer	Celltrion	Hospira	Filed for MDS approval
CT-P10	Rituzimab	Non-Hodgkin lymphoma	Celltrion	Hospira	Phase 3
N/A	N/A	N/A	Celltrion	Epi Pharmaceuticals	N/A
LSFC0101	Adalimumab	Rheumatic arthritis	LGLS	N/A	Phase 1
TNFcept	Etanercept	Rheumatic arthritis	LGLS	N/A	Phase 1
SAIT101	Rituzimab	Non-Hodgkin lymphoma	Samsung Biologics	Biogen Idec	Started in 2011
N/A	Trastuzumab Rituzimab	N/A	Aprogen	Nichi-Iko	Pre-clinical
HD-203	Etanercept	Rheumatic arthritis	Hanwha Chemical	Merck & Co.	Phase 3
N/A	EPO	Kidney Failure	PanGen Biotech	Chemical Company of Malaysia	Started in 2012
DA-3031	G-CSF	Neutropenia	Dong-A Pharma	N/A	Phase 2
DA-3111	Trastuzumab	Breast Cancer	Dong-A Pharma	N/A	Pre-clinical

(출처 : Frost & Sullivan, 2014)

역대 가장 큰 규모의 특허판료 의약품의 등장에 제약업계에서도 높은 관심을 나타

내고 있다. 주목되는 의약품은 국내 매출액 1위인 BMS의 B형간염 치료제 바라크루드이다. 바라크루드는 2015년 10월 특허만료를 앞두고 있으며, 지난해 1,626억원의 매출액을 기록하며 초대형 품목으로 자리매김하고 있다. 현재까지 30개 제약사의 58품목의 제네릭이 허가를 받고 특허만료 시기를 기다리고 있으며 향후 더 많은 품목의 허가가 이어질 전망이다.

바이오시장 분석을 통해 특허만료로 바이오 시뮬러 시장 형성은 필연적이며, 경쟁이 치열한 바이오 시뮬러보다 오리지널 및 바이오 시뮬러와의 경쟁에서 벗어날 수 있는 바이오 베타가 대세가 될 것으로 전망했다. 바이오 베타는 오리지널 바이오의약품의 효능과 부작용을 개선한 것으로 오리지널 약처럼 20년간 특허가 인정 된다. 오리지널 바이오 신약으로부터 유래한다는 점은 바이오 시뮬러와 같으나 새로운 기술을 적용하여 오리지널 바이오 의약품에 비해 개량된 품질이나 약효를 나타낼 수 있는 것이 특징이다. 즉, 바이오 베타는 바이오 신약의 2세대 개량신약 개념으로서 기존 1세대 바이오 의약품의 효과가 지속되는 기간을 늘리거나 효과를 극대화한 제품을 말한다.

식품의약품안전청은 바이오 베타를 개량생물의약품이라 정식으로 명명하고, 바이오 베타의 개념을 정립하는 정의, 범위, 허가 기준, 자료 제출 범위 구체화 등의 내용을 담은 가이드라인을 마련하였고, 이에 따라 현재 바이오 베타 혹은 슈퍼바이오시뮬러로 불리며 개발되고 있는 품목들이 개량생물의약품이라는 명칭으로 정식 허가 과정을 진행할 전망이다.

국내 주요 바이오 베타 임상 진행 현황			
회사명	제품명	적응증	진행 상황
LG생명과학	SR-hGH	서방형 인성장 호르몬	미국 FDA 품목 허가 신청
LG생명과학	디크라제	서방형 인성장 호르몬	국내 출시
녹십자	헨터라제	헨터중후군	한국 식약청 품목 허가 신청
한미약품	LAPS-Eserdin1	지속형 당뇨병 치료제	미국, 유럽 임상 2상 진행
한울바이오피마	HL-143	C형 간염치료제	미국 임상 2상 진행

자료: 신한금융투자

2013년부터 2015년 사이는 특허만료와 새로운 바이오시뮬러의 출시로 바이오시뮬러 시장이 크게 성장할 것으로 예상되므로 국내기업들이 성공하기 위해서는 진입장벽이 높은 산업의 특성상 초기에 시장에서 자리 잡는 것이 중요하며, 협소한 국내시장을 넘어 향후 높은 성장이 예상되는 미국 등 글로벌 시장에 진출하기 위해서는 해외기업들과의 전략적 협력 및 제휴가 필요하다. 이는 바이오시뮬러 관련 기술개발 및 생산공정 관리가 어렵고, 제품화 되기 까지 승인기간이 길고 복잡해 많은 자본과 마케팅 능력이 필요하기 때문에 기술개발과 동시에 마케팅 능력을 극대화 할 수 있는 전략 구축이 필요하다.

4. 국내 기능성 건강식품 동향

21세기 생명공학의 발달, 건강에 대한 욕구 증대 등으로 식품에 대한 건강과 안정성 지향이 급속히 강조되면서 인식이 바뀌고 있다. 과거 식품의 양적인 면을 강조하던 시대에는 식품 수급과 식량 확보가 대상이었지만 현재는 식품 기능성, 즉 식품의 생체조절 기능에 주목하며 식품 안정성이 강조되고 있다.

건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조, 가공한 식품으로 정의하고 있는데 건강기능식품은 의약품과 달리 질병상태의 치료가 목적이 아니라 생체기능의 활성화를 통해 질병 발생 위험을 감소시키거나 건강유지·증진을 목적으로 하고 있다.

2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 2012년(1조 4,091억원)에 비해 5% 정도 증가한 것으로 나타났다(식품의약품안전처). 지난해 성장은 새로운 기능성 원료를 사용한 개별인정형 제품(전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스 제품(전년대비 55% 증가)이 주도한 것으로 나타났다(Table 19).

※ 개별인정형: 고시된 품목 이외에 안전성, 기능성을 개별로 인정받은 원료로 제조한 건강기능식품(백수오등복합추출물, 당귀혼합추출물 등)

※ 프로바이오틱스: 유산균을 주원료로 사용하여 배변활동에 도움을 주는 기능성을 가진 건강기능식품

2013년 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 7,920억원으로 조사되어 2009년 이후 지속적인 성장세를 유지하였으며, 수출은 754억원으로 2012년(584억원)보다 29% 증가했으며, 수입도 3,854억원으로 2012년(3,532억원)보다 9% 증가하였다(Table 20).

※ 국내 시장규모(억원): 11,600('09) → 12,804('10) → 16,855('11) → 17,039('12) → 17,920('13)

※ 국내 시장규모: 생산+수입-수출

제품별로는 홍삼제품이 5,869 억원으로 전체(1조 4,820억원)의 40%를 차지하여 여전히 가장 높은 점유율을 보였으며, 그 다음으로 개별인정형 16%(2,324억원), 비타민·무기질 12%(1,747억원), 프로바이오틱스 5%(804억원), 알로에 4%(628억원) 제품 순으로 나타났다. 기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강(5%) 제품 순이었다(Fig. 3).

건강기능식품은 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 층의 소비자 욕구, 고령화와 소득수준 향상으로 건강기능식품의 꾸준한 성장세가 이어질 것이라 전망되며, 따라서 기능성 원료 개발 등을 통하여 신규 기능성 평가 체계 확립에 의해 건강기능식품 안전성과 기능성 관리에 주력을 해야 할 것으로 분석되었다.

Table 19. 건강기능식품 생산실적 현황

구분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)*	생산량(톤)
'09년	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592
'10년	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
'11년	13,682	40,258	13,126	39,611	556	647
'12년	14,091	34,599	13,507	33,735	584	864
'13년	14,820	31,446	14,066	30,490	754	956
증감률 ('13/'12, %)	5.2	△9.1	4.1	△9.6	29.1	10.6

[1\$ = 1,095원(2013년), 출처: 식약처, 2013]

Table 20. 건강기능식품 국내 시장규모

구분	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년
생산액(억원)	9,598	10,671	13,682	14,091	14,820
수입액(억원)	2,417	2,593	3,729	3,532	3,854
수출액(억원)	415	460	556	584	754
국내 시장규모(억원)	11,600	12,804	16,855	17,039	17,920

[1\$ = 1,095원(2013년), 출처: 식약처, 2013]

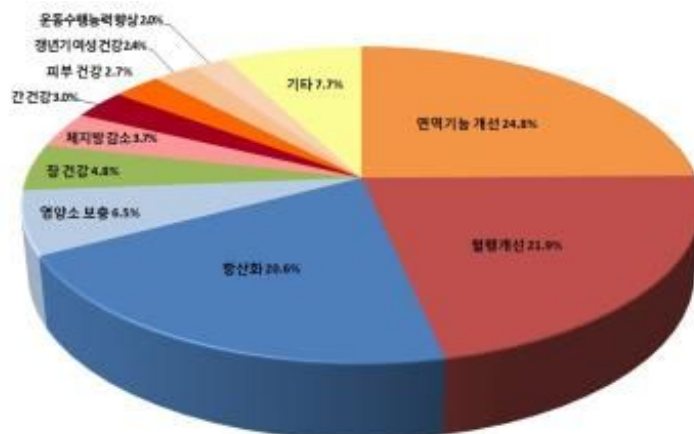


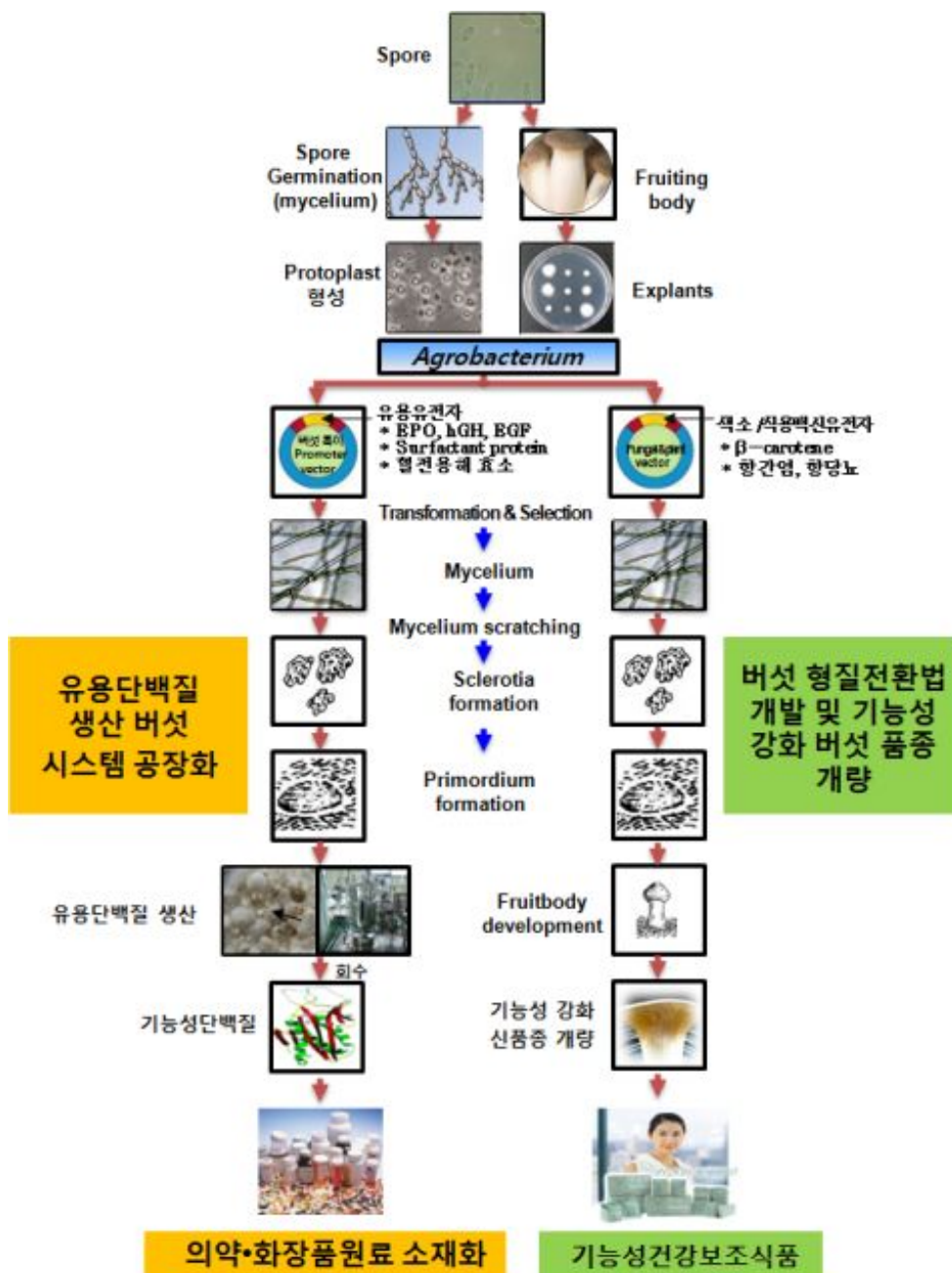
Fig. 3. 기능성별 건강기능식품 점유율

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

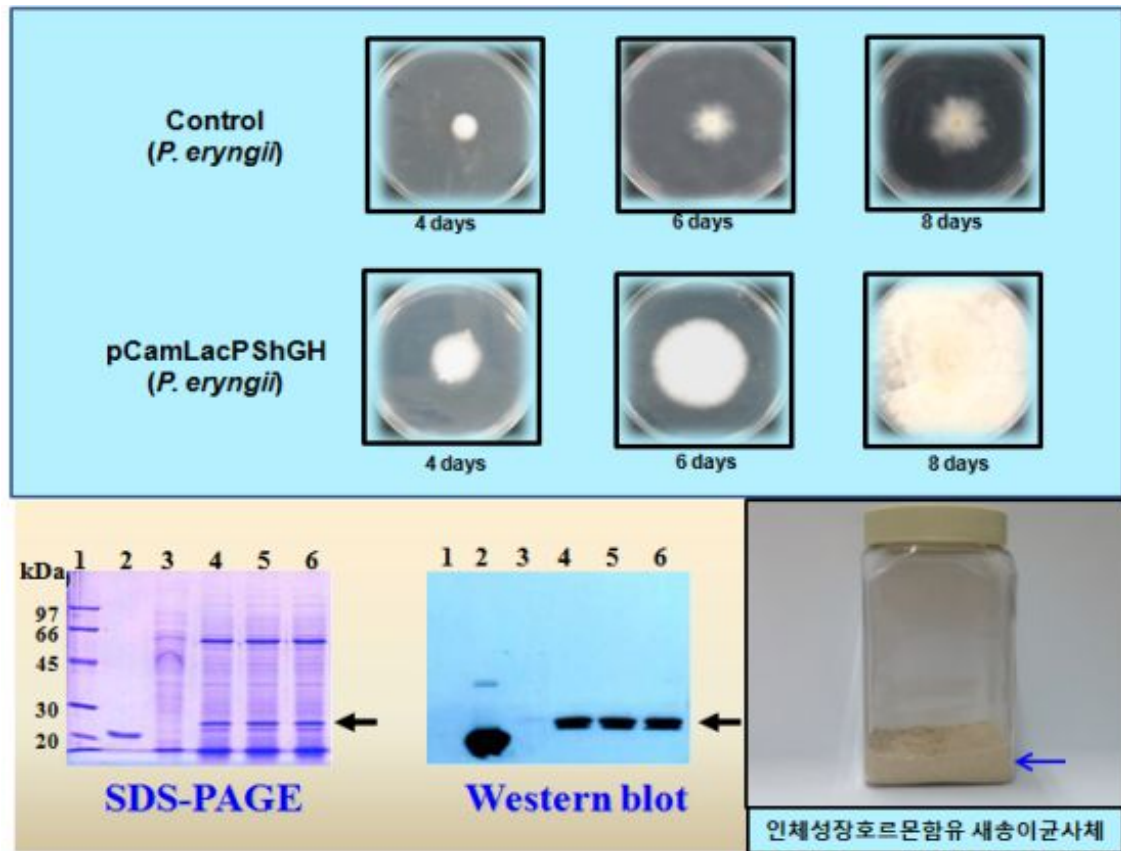
제 1 절 제 1세부 : 버섯 원기형성 관련 단백질 분비서열을 이용한 유용단백질 생산 시스템 개발

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 연구개발 추진전략 및 방법



나. 연구수행 방법 및 내용



연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>○ 새송이버섯 균사체 및 자실체 배양</p>	<p>○ 균사체 배양 조건 확립 - <i>P. eryngii</i> (KNR2312균주) - PDB, PDA 또는 MCM - 25°C, 120 rpm, 8 days</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 새송이버섯 (<i>Pleurotus eryngii</i>) 균사체를 경상남도 농업기술센터국립농업 유전자원센터 (KNR 2312 균주)에서 분양 받아 사용함. • 균사 배양 기본배지로서 potato dextrose broth (pH 5.4) 및 potato dextrose agar (PDA)를 사용. • 25°C 암조건에서 균사체 배양을 실시. 액체배양을 위하여 PDA배지에서 배양한 균사체를 cork borer를 이용하여 직경 5 mm pellet으로 제조하고, pellet 10개를 250 ml flask 내 100 ml potato dextrose Broth (PDB)에 접종하여 25°C 암조건에서 8일간 120 rpm에서 진탕배양 하여 이를 중균으로 사용. • 탄소원에 따른 균사체 생육 변화 • 질소원에 따른 균사체 생육 변화 • Yeast extract농도별 처리에 따른 균사체 생육 변화

	<p>o 자실체 형성 조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 (moisture content of 65%) 	<ul style="list-style-type: none"> • 톱밥과 미강을 2:1의 비율로 섞은 후 함수율 65%로 맞춰 톱밥배지 제조. 배양한 새송이버섯 균사체를 멸균 톱밥배지에 접종한 후 25℃ 항온기에 15-18일 정도 배양한 후 균긋기 한 다음, 18℃ 항온기에서 뒤집어서 배양하면 7일 정도 후 원기 형성. 다시 배양병을 뒤집어 자실체를 생육함. • 자실체 배양에 LED light (blue) 사용 • 새송이버섯 life cycle에 따른 각 단계별 조건 확립
<p>o 새송이버섯 균사체 형질전환법 확립</p>	<p>o 균사체 형질전환법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원형질체 형성에 의한 REMI법 - Agrobacterium을 이용한 형질전환법 - 상해를 이용한 Agrobacterium 형질전환법 	<ul style="list-style-type: none"> • 사용벡터 : pBARGPE1, pPEV, pCAMBIA1300 • 새송이버섯 항생제 내성 시험 : • Phosphinothricin (100 ug/ml)에 sensitive • REMI 형질전환법 : mushroom complete medium 사용 원형질체 제조 (10^7-10^8사용). pBARGPE1 사용 제한효소 처리 후 형질전환시 낮은 재생률 (0.016%). 성장률저해 및 plasmid 불안정성을 없음 • 일반적인 Agrobacterium 형질전환법(Fig. 16) • Aluminum oxide 이용 Agrobacterium 법 (Fig. 18) : 15-40% 형질전환 효율
<p>o 새송이버섯 cDNA library 구축 & genomic DNA library 확립</p>	<p>o 새송이버섯 cDNA library 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 새송이버섯 RNA 추출 - cDNA 합성 - λZap vector 이용 cDNA library 제조 <p>o 새송이버섯 genomic DNA library 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 새송이버섯 genomic DNA 추출 - λFixII vector 이용 genomic library 제조 	<ul style="list-style-type: none"> • 새송이버섯 균사체로부터 total RNA 추출 • poly(A)+ RNA 추출 • 1st cDNA 합성 • 2nd cDNA 합성, fractionation 및 정량 • λZap vector로 cloning/in vitro packaging • <i>E. coli</i> XL1Blue-MRF 균주로 infection • cDNA library size 결정 (2.3×10^6) 및 증폭 (1×10^8 pfu/ul), 보관 (7% DMSO) • Size distribution : in vivo excision • 새송이버섯으로부터 genomic DNA 추출 alc 정량 (CTAB방법) • <i>Bam</i>HI digestion, elution, filling in • λFixII vector로 클로닝/packaging • <i>E. coli</i> XL1Blue-MRF 균주로 infection • gDNA library size 결정 (0.5×10^6) 및 증폭, 보관, insert DNA size 결정
<p>o 원기형성 분비물 단백질 분석</p>	<p>o 단백질 분석을 위한 원기형성 분비물 수집 및 시료 준비</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 톱밥배지에서 자실체 유도하기 위해 균긋기를 하여 뒤집어 배양하면 원기가 형성됨. 이때 원기에서 분비되는 분비물을 주사기를 이용해 수집함 (~1-2 ml/400 g bottle) • 단백질 분석을 위해 trichloroacetic acid (TCA) 이용하여 단백질만 침전시킨 후 bradford법으로 정량하여 50 ug 단백질을 사용하여 단백질 분석

	<ul style="list-style-type: none"> o SDS-PAGE 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • SDS-PAGE 분석을 위해 단백질 시료에 sample buffer 용액 (50 mM Tris-Cl(pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)을 처리함. • 15% polyacrylamide gel을 사용하여 단백질을 분리 한 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 분석함.
	<ul style="list-style-type: none"> o 2-D gel 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 2-D gel 분석을 위해 단백질 시료에 rehydration buffer 용액 (8M urea, 2% CHAPS, 65 mM DTE, 2%(v/v) isocratic pH gradient (IPG) buffer (pH 3-10 NL, non-linear), trace bromophenol blue)을 처리함. • pH 3-10 NL용 immobilized pH gradient strip을 사용하여 IEF 하여 등전점으로 분리하고 15% polyacrylamide gel을 사용하여 분자량으로 분리한 gel을 solver staining하여 분석함.
	<ul style="list-style-type: none"> o 아미노산 서열 분석 및 단백질 동정 <ul style="list-style-type: none"> - CAF-MALDI sequencing - MALDI-TOF MASS 분석 - N-terminal amino acid sequencing - 단백질 동정 	<ul style="list-style-type: none"> • SDS-PAGE와 2-D gel 상에 나타난 특정 밴드 또는 spot을 잘라내어 CAF-MALDI sequencing, MALDI-TOF MASS 분석, N-terminal amino acid sequencing을 수행하여 특이 단백질 자료를 획득한 다음, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 검색하여 단백질을 동정함.
<ul style="list-style-type: none"> o 원기형성 분비물 단백질에 대한 유전자 확보 	<ul style="list-style-type: none"> o Laccase gene <ul style="list-style-type: none"> Promoter : 317 bp Signal Peptide : 69 bp - PCR Amplification - Nucleotide sequence analysis 	<ul style="list-style-type: none"> • 원기형성 분비물 단백질 분석결과 Laccase 유전자가 동정되었음. 염기서열 분석을 통해 317 bp의 Promter와 69 bp의 Signal Peptide를 찾아 PCR 증폭을 하여 유전자를 분리하였고 이를 염기서열 분석을 통해 확인하였음. • PCR Primer <ul style="list-style-type: none"> Lac_Pro-F : AAGAAGCACTTCGAGTC TATTTT Lac_Sig-F : ATGTTTCCAGGCGCACGG Lac_Pro-F : GGCAGCGTGAGTGCCATG
<ul style="list-style-type: none"> o Secretion vector 구성 (Fungal & Plant Vector) 	<ul style="list-style-type: none"> o Fungal vector(pBARGPE1) <ul style="list-style-type: none"> - Laccase Promoter + Signal Peptide - Laccase Signal Peptide (<i>gpdA</i> promoter) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fungal vector인 pBARGPE1 vector에 Laccase Promoter와 Signal Peptide를 클로닝하여 새로운 pBARGPE1LacPS vector (5.89 kb)를 재조합하였으며 pBARGPE1 vector에 Laccase Signal Peptide 만을 클로닝하여 새로운 pBARGPE1LacS vector (5.57 kb)를 재조합 하였음. 차후에 유용유전자 도입을 위한 secretion vector를 구성
	<ul style="list-style-type: none"> o Plant vector (pPEV) <ul style="list-style-type: none"> - pR1b signal Peptide o pPEVpR1bhGH <ul style="list-style-type: none"> - hGH gene expression (SDS-PAGE, Western blot) 	<ul style="list-style-type: none"> • Plant vector인 pPEV vector에 pR1b signal Peptide를 클로닝하여 새로운 pPEVpR1b vector (10.7 kb)를 재조합하였음. • pPEVpR1b vector에 human Groeth Hormone (hGH) 유전자를 도입하여

		<p>pPEVpR1bhGH vector (11.35 kb)를 재조합하였음. 이를 새송이버섯으로 형질전환하여 균사체에서 발현된 hGH 단백질 분석하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 균사체 1 g에 sonication buffer 용액 (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol) 3 ml을 넣고 균질화 하여 단백질 시료를 얻음. 이를 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 하였음 • hGH 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 분석하는 Western blotting을 실시하여 단백질의 발현량을 검증 하였음
o 형질전환 벡터 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합 단백질을 생산하는 벡터 제조 - GFP 발현벡터 구축 - 고발현 숙주 특이 프로모터 및 신호서열 도입 	<ul style="list-style-type: none"> • 표지시스템으로 해파리의 녹색형광단백질 (GFP) 유전자를 삽입한 벡터 구축을 위해서 pBARGPE1, pPEV, pCAMBIA1302 벡터를 사용. • CaMV 35S promoter, laccase promoter (자실체 형성 초기의 분비물에 많은 양 분비되는 laccase 단백질), PR1b (pathogen related protein) signal sequence, 및 laccase signal sequence 등을 사용하여 여러 종류 재조합 벡터를 구성
o 아그로박테리움 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 에 의한 새송이버섯의 형질전환 - 형질전환체 선별 (항생제) 	<ul style="list-style-type: none"> • 아그로박테리움 형질전환체 확보 및 분석 • GFP 유전자를 이용한 형질전환 재생을 분석 • 형질전환체 분석
o 형질전환된 새송이버섯의 염색체 DNA 분석	<ul style="list-style-type: none"> - Genomic DNA 추출 	<ul style="list-style-type: none"> • 형질전환된 균사체 genomic DNA 추출 • PCR 기법으로 형질전환체 확인
o 형질전환된 새송이버섯 균사체에서 GFP 유전자의 발현 확인	<ul style="list-style-type: none"> - GFP 유전자 발현에 영향을 주는 인자 분석 - 균사체 배양 및 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 광, 습도, 온도, 영양, 유전적조건 분석 • GFP fluorescence 확인
o 유용 유전자 도입 Secretion vector 구성	<ul style="list-style-type: none"> o Fungal vector (pCambia1302) - Laccase Promoter - Laccase Promoter + Laccase Signal Peptide - Laccase Promoter + pR1b signal Peptide 	<ul style="list-style-type: none"> • Fungal vector인 pCambia1302 vector에 Laccase Promoter를 클로닝하여 새로운 pCamLacP vector (10.88 kb)를 재조합하였음 • Fungal vector인 pCambia1302 vector에 Laccase Promoter와 Laccase Signal Peptide를 클로닝하여 새로운 pCamLacPS vector (10.95 kb)를 재조합하였음. • Fungal vector인 pCambia1302 vector에 Laccase Promoter와 pR1b Signal Peptide를 클로닝하여 새로운 pCamLacPpR1b vector (10.95 kb)를 재조합하였음.

	<ul style="list-style-type: none"> o Plant vector (pPEV) <ul style="list-style-type: none"> - pR1b signal Peptide o pPEVpR1bhGH <ul style="list-style-type: none"> - hGH gene expression (SDS-PAGE, Western blot) 	<ul style="list-style-type: none"> • pCamLacP vector (10.88 kb)를 재조합 하였음 • Plant vector인 pPEV vector에 pR1b signal Peptide를 클로닝하여 새로운 pPEVpR1b vector (10.7 kb)를 재조합 하였음. • pPEVpR1b vector에 human Groeth Hormone (hGH) 유전자를 도입하여 pPEVpR1bhGH vector (11.35 kb)를 재조합하였음. 이를 새송이버섯으로 형질전환 하여 균사체에서 발현된 hGH 단백질 분석하였음. • 균사체 1 g에 sonication buffer 용액 (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol) 3 ml을 넣고 균 질화 하여 단백질 시료를 얻음. 이를 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 하였음 • hGH 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 분석하는 Western blotting을 실시하여 단백질의 발현량을 검증 하였음
<ul style="list-style-type: none"> o Secretion vector 로 유용 유전자들의 도입 	<ul style="list-style-type: none"> - 유용 단백질 재조합 발현 벡터 구축, 확인, 증폭 - 버섯의 target 서열을 이용한 분비 vector에 유용유전자 도입 	<ul style="list-style-type: none"> • 유용 유전자 Primer 제작 • 숙주 특이 laccase 프로모터 및 신호서열로 구성된 버섯 형질전환 vector를 이용한 유용 유전자 (hGH, PLSP3, CSF, SBP, EGF, EPO 등) 도입 • pCamLacP vector <ul style="list-style-type: none"> pCamLacPhGH, pCamLacPPLSP3 pCamLacPCSF, pCamLacPSBP pCamLacPEG, pCamLacPEPO • pCamLacPS vector <ul style="list-style-type: none"> pCamLacPhGH, pCamLacPPLSP3 pCamLacPCSF, pCamLacPSBP pCamLacPEGF, pCamLacPEPO • pCamLacPpR1b vector <ul style="list-style-type: none"> pCamLacPhGH, pCamLacPPLSP3 pCamLacPCSF, pCamLacPSBP pCamLacPEGF, pCamLacPEPO • 새송이버섯으로 형질전환하여 균사체에서 발현된 단백질 분석하였음. • 균사체 1 g에 sonication buffer 용액 (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM

		<p>NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol) 3 ml 을 넣고 균질화 하여 단백질 시료를 얻음. 이를 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 분석하는 Western blotting을 실시하여 단백질의 발현량을 검증 하였음
o 항생제 내성 검증	<p>- Ampicillin, Rifampicine, phosphinothricin, hygromycin</p>	<ul style="list-style-type: none"> 새송이버섯 균사체를 이용하여 항생제 내성 검증을 하였다. 항생제 내성 검증을 위한 항생제로 ampicillin, Rifampicine 50, PPT, hygromycin을 사용하여 항생제에 대한 내성을 검증하였다. 새송이버섯 균사체를 각각의 항생제가 첨가된 MCM plate에 계대 배양 후, 10일간 배양으로 항생제에 대한 내성을 검증하였다.
o <i>In vitro</i> 에서 세포 활성 측정	<p>- Insulinoma cell - EGF & hGH 단백질 - MTT assay - 세포배양</p>	<ul style="list-style-type: none"> 96 well microplate에 cell (2X10⁴/well)을 plating하고 cytokine 처리한다. 이 후 media를 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 가한다 (50 ul/well). 37 °C incubator에서 2시간 동안 incubation하고 MTT 용액을 제거한다. 이후 DMSO 용액을 가하여 (100 ul/ml) insoluble crystal을 완전히 용해시키고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정함. 인슐린을 분비하는 흰쥐 인슐린종세포 (RINm5F; rat insulinoma cell)의 배양은 10% fetal bovine serum, penicillin (100U/mL), streptomycin (100U/mL) 및 nystatin (25μg/mL) 등을 함유한 RPMI1640 배지에서 CO₂ 배양기로 37 °C, 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기 내에서 배양하고, 3일마다 배양액을 교환해주며 trypsin-EDTA을 이용하여 계대 배양함.
o EGF 화장품 원료	<p>- 안정성 측정 - 안전성 test</p>	<ul style="list-style-type: none"> PH, 점도변화, 온도, 자외선에 안정도 Patch test : 사람의 팔과 등 부위에 철폘 시험
o Enzyme Assay	<p>- PLSP3 : 단백질 분해 분비능</p>	<ul style="list-style-type: none"> protease assay plate (1% skim milk, 0.1% yeast extract, 1.5% agar)에 살균된 paper disc를 올려놓고 추출한 PLSP3 단백질을 점적하여 37°C에서 overnight 배양하여 형성된 clear zone을 확인

o <i>In vivo</i> 에서 hGH의 성장효과 분석	- 실험 동물 및 그룹설정		<ul style="list-style-type: none"> • 실험동물은 4주령의 음성 Sprague-Dawley • (SD) 계열 흰쥐(80 ± 10 g를 이용하여 사육케이지(42 × 28 cm)에서 온도 22-24℃, 습도 60±5%가 유지되며 밤낮 주기(12시간 light/ 12시간 dark)가 자동 조절되는 동물실에서 2주 동안 본 연구를 위해 사육. • 연구 그룹은 음성 대조군(negative control, NC), 섭취군1(p-hGH1 & 2과 섭취군2 (Mycelia 1 & 2)로 분류하고 무작위 추출에 의해 군당 7마리씩 배정하였다. 시료는 음용수에 섞거나 사료에 첨가하여 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였고 식이는 AIN-93 기본 식이(Samyang Co., Seoul, Korea)를 이용하였고, 체중, 식이 섭취량 및 음용수 섭취량은 주 회 측정하였다.
	- 생물학적 활성 검증	생화학적 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 실험 종료 시점에서 12시간 절식시킨 실험 쥐를 ethyl ether로 마취시켜 희생시킨 후 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취. 혈액 채취 후 실험 쥐를 해부하고 간, 신장, 비장을 적출하여 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 heparin으로 처리된 시험관에 넣어 4℃, 3,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 상등액인 혈장을 취하였다. 혈장은 혈액 자동 분기인 FUJI DRI-CHEM 3500(Fuju Photo Film Co., Osaka, Japan)을 이용해 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, alkaline phosphatase(ALP) 및 칼슘을 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 측정된 혈중 지질 성분으로부터 Friedwald 등 (1972)의 계산식에 의해 계산하였다.
		경골 및 경골 성장판 길이 측정	<ul style="list-style-type: none"> • 실험전과 실험 종료 직후의 경골 및 경골 성장판의 길이는 ethyl ether로 마취시켜 X-ray mammography system(GE Senographe 500t, GE Medical Systems, France)로 증감지(minR-2, Kodak, USA)와 필름(CM-H for mammography, Konica, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 촬영시 관전압은 32 kVp, 관전류는 32 mAs으로 하였으며 platform과의 거리는

			<p>25 cm였고 15초간 노출하여 촬영하였다. 촬영된 필름은 현상기(QX-130 II, Konica)로 현상액 31°C, 정착액 29°C에서 현상하고 필름을 Vidar VXR-12 film digitizer(Vidar Systems Co., USA; Resolution 570 dpi, Depth 12)로 스캔하였다. 스캔된 영상은 Image J 프로그램(National Institute of Health, MD, USA)을 이용하여 경골과 경골 성장판의 중앙좌, 우 세 부위의 profile curve를 구하고 반치폭의 픽셀수로부터 길이를 계산하였다.</p>
		호르몬 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 혈장내 Insulin-like growth factor-1(IGF-1), 성장 호르몬(growth hormone, GH) 및 성장 호르몬 분비 호르몬(growth hormone releasing factor, GHRF)은 ELISA법을 이용하여 각각 mouse/rat IGF-1 Elisa kit(R&D Systems Inc., MN, USA), rat growth hormone Elisa kit(Usen Life Science & Technology Co., Beijing, China)과 growth hormone releasing factor Rat Elisa kit(Phoenix pharmaceuticals, Inc., CA, USA)로 측정하였다.
	- 통계분석		<ul style="list-style-type: none"> • 실험 결과는 SPSS ver 12.0(SPSS Inc., IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 평균의 표준오차(standard error of the mean, SEM)를 산출하였다. 실험군간의 유의성은 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.
o Field 실험	- 육계농장 투여 실험		<ul style="list-style-type: none"> • 지역 육계 사육농장의 시설을 이용하여 제조한 파우더 (1.5 ug of p-hGH/g powder)를 본 사료에 0.1% 투여하여 사육기간 (35일)동안 투여 후 육성률, 출하체중, 수당체중, 일당증체량, 사료량, 사료 요구율, 생산지수 등을 측정하였다

2. 연구결과

가. 새송이버섯 일반 현황

(1) 새송이버섯

- 분 류 : 균계, 담자균문, 담자균강, 주름버섯목, 느타리과, 느타리속, 새송이
- 영문명 : *Pleurotus eryngii* (King Oyster mushroom, 왕 큰굴버섯, 또는 초원버섯)
- 느타리버섯 품종개량 : 큰느타리버섯으로 품종등록 및 상품명은 새송이버섯
- 분포 : 아열대지방 대초원에서 발생, 유럽남부, 중앙아시아, 아프리카북부, 러시아 남부
- 특성 : 자실체 균사조직이 치밀하여 맛과 향이 좋고 다른 버섯에 비해 수분 함량이 낮아 수출 상품으로써 가치가 매우 높아 농가의 소득원으로 기대가 큰 버섯.
- 생리물질 : 고함량 Vit C, 칼슘, 각종 미네랄, 필수아미노산, 식이섬유, Vit B₆, Vit B₁₂ (악성빈혈치유인자), tyrosinase 등
- 효과 : 건강웰빙식품, 해독작용, 면역증강, 항암효과, 장기능 및 위 보호 효과, 고혈압, 항산화, 노화방지, 다이어트 효과 등
- 1997년 경남농업기술원에서 국내 최초 재배기술개발 농가보급
- 버섯 생산량은 매년 3-4% 증가, 소비증가와 더불어 재배면적 및 재배농가 증가



(2) 새송이버섯 실험현황

본 실험에 사용한 새송이버섯은 (주)월드바이오텍 (경상남도 농업기술센터에서 보존중인 큰느타리버섯 *Pleurotus eryngii* KNR 2312 균주)으로부터 분양받아 실험에 사용하였고 기본적인 성장 조건은 이미 알려진 조건들을 활용하여 본 실험실에서 균사체 및 자실체 배양에 적합한 조건으로 최적화하여 실험을 수행하였다. 일반적으로 새송이버섯 인공재배를 위한 다수의 연구가 진행되어 왔으며 구체적인 기술기반이 확립되어 현재까지 사용되고 있고, 균사배양 및 생육에 있어 환경제어를 통한 최적조건과 다양한 첨가원을 이용한 버섯수량성 증대 그리고 배지자원의 다양화에 대한 연구보고가 되어있다. 즉, 균사생장의 최적 배지는 Lilly배지에서, 최적온도는 25-30℃, pH는 6.0이 가장 좋았고, 최적 탄소원은 단당류의 경우 glucose, 다당류에서는 dextrin

이었으며, 최적농도는 glucose 3-4%, dextrin 5% 수준에서 균체량이 가장 많았고, 최적 질소원은 유기태 질소원인 casamino acid 0.12% 수준으로 밝혀졌고, 자실체 형성 조건은 참나무 톱밥에 미강과 밀기울 30% 혼합한 배지와 배지 함수율 60-65%가 균사밀도와 자실체 발생이 좋은 것으로 보고되고 있으며, 느타리 병재배시 배지조성은 톱밥 : 미강 = 80 : 20(V/V)이, 발이 유기방법은 온도 16°C, 습도 95%, CO₂ 800 ppm, 피복 발이가 발이와 수확량에 양호한 것으로 보고되어 있다 (자료출처 : 이현욱 ‘버섯’ 제 3권 1호, 137-165, 1999). 그러나 새송이버섯 균사체 및 자실체 성장 조건은 환경적인 요인에 의해 재배 농가마다 약간씩 차이가 있으며 재배 시스템에 적합한 조건을 찾아 배지 조성을 변화시키는 것이 합리적이라 판단된다.

따라서 본 연구에서는 새송이버섯 재배조건의 우선적 개발 보다는 균사체 성장 촉진 및 형질전환 효율 증진, 원기형성 및 분석, 원기내로 유용단백질 생산을 위한 분비 벡터 개발, 재조합 형질전환체 개발 (유용단백질 분비 및 품종개량) 등에 주안점을 두고 연구를 수행하였다.

나. 새송이버섯 균사체 배양 조건 확립

(1) 새송이버섯 균사체 배양 조건

본 연구에 사용된 새송이버섯 (*Pleurotus eryngii*) 배양을 위한 기본배지로서 potato dextrose broth (pH 5.4) 및 potato dextrose agar (PDA)를 사용하였으며 25°C 암조건에서 균사체 배양을 실시하였다. 액체배양을 위하여 PDA배지에서 배양한 균사체를 cork borer를 이용하여 직경 5 mm pellet으로 제조하고, pellet 10개를 250 ml flask 내 100 ml potato dextrose Broth (PDB)에 접종하여 25°C 암조건에서 8일간 120 rpm에서 진탕배양 하여 이를 종균으로 사용하였다. 균주 보관은 potato dextrose agar (PDA) 배지를 사용하여 2주마다 계대배양을 하여 4°C에서 보관하였고 이를 실험에 사용하였다. 필요에 따라서 원형질체 형성을 위하여 복합배지인 Mushroom Complete Medium (MCM)을 사용하였다.

(가) 탄소원에 따른 균사체 생육 변화

균사체 생장을 위한 최적 탄소원을 규명하기 위하여 arabinose, cellobiose, fructose, glucose, lactose, maltose, sucrose 등을 첨가한 배양액에서의 균사체 생육 실시 후 균사체를 원심분리 (6,000 rpm, 20 min) 후 filter paper에 수집하고 건조 (50°C, 24 hr)시켜 건조중량 (dry cell weight)을 비교 측정하였다. 그 결과 여러 종류의 탄소원들 중에서 sucrose가 상대적으로 가장 효과적임을 알 수 있었다. 당밀 (molasses)은 사탕수수, 포도 또는 사탕무우를 이용하여 sugar를 제조하는 과정에서 생기는 부산물로서 고농도의 sucrose 및 glucose가 포함되어 있다. 특히, 그 가격이 저렴하여 사료첨가물이나 배지성분으로 종종 이용된다. 따라서 sucrose 성분이 풍부한 당밀을 탄소원으로 이용하여 그 성장결과를 비교하였으며 2% sucrose 농도의 당밀을 처리 시 최대 균사체 생산 (5.8 g/L)을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

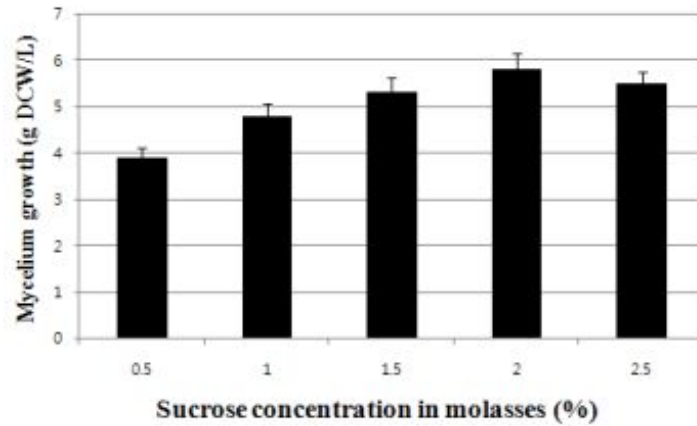


Fig. 4. Effect of sucrose concentration in molasses on mycelial growth of *Pleurotus eryngii*.

(나) 질소원에 따른 균사체 생육 변화

Yeast extract, bacto peptone, soy bean meal, protease peptone, malt peptone, industrial yeast extract 등을 질소원으로 하여 균사체 생육을 비교하였으며 그 결과 yeast extract가 상대적으로 우수하였다(Fig. 5).

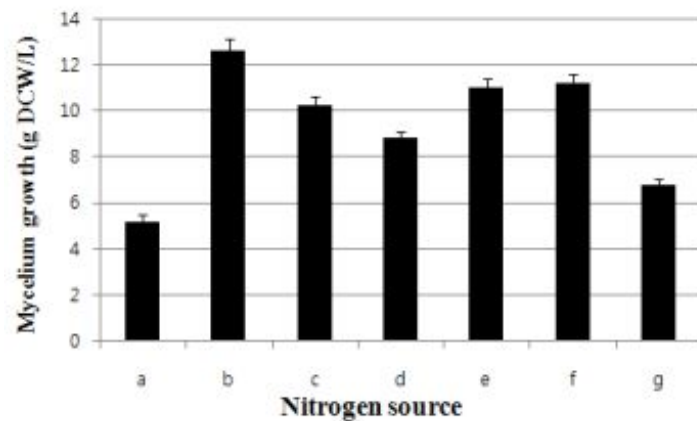


Fig. 5. Effect of nitrogen source containing a concentration of 0.1% on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii*. (a) none, (b) yeast extract, (c), industrial yeast extract, (d) bacto peptone, (e) soy bean meal, (f) protease peptone and (g) malt peptone.

(다) Yeast extract 농도별 처리에 따른 균사체 생육 변화

질소원들 중 yeast extract가 균사체 생육에 가장 적합한 것으로 나타남에 따라 농도별 처리에 의한 균사체 생육을 비교하였다. 그 결과 농도를 높일수록 그 효과가 비례적으로 높아지는 경향을 보였으며 0.9%에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 6).

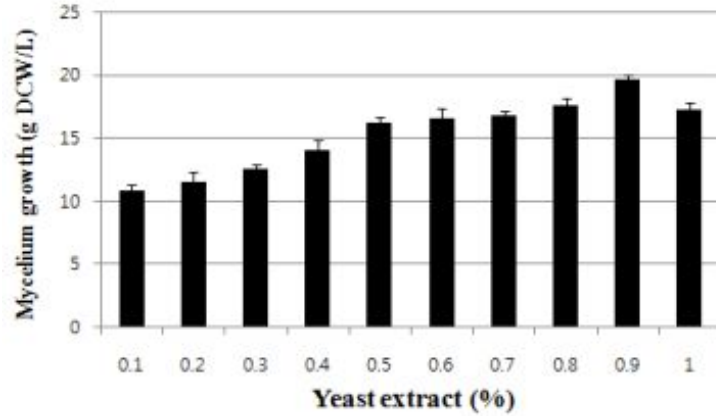


Fig. 6. Effect of yeast extract concentration on mycelial growth of *Pleurotus eryngii*.

다. 새송이버섯 원기 및 자실체 형성 조건 확립

(1) 새송이버섯 자실체 유도 과정

균사가 가지를 치고 균사끼리 융합이 일어나면 균사격자 (hyphallattices) 같은 것이 형성되고, 이 균사격자는 기중균사 (aerial hyphase)를 형성한다. 이 때 기중균사는 2핵끼리 서로 접합하여 직경이 0.1~0.2 mm 정도되는 접합체를 형성한다.

원기의 성장에는 바깥쪽으로 자라는 것으로 밖에서 관찰이 가능한 외적성장 (gymnocarpic)과 내부로 자라는 것으로 감싸여져 있고 보통 버섯의 버턴단계와 유사한 내적성장 (angiocarpic)의 두가지로 나눌 수 있다. 버섯 자실체의 발생은 빛에 의해 유기되거나 촉진되고, 자실체의 분화 생육에도 빛이 있어야 한다. 따라서 자실체 발생에 적당한 광량은 80~120 Lux 이지만 이보다 낮은 광량에서도 발생이 가능하며 대부분의 담자균은 근자외선부터 청색 영역의 빛이 유효하고, 원기 형성이나 자실체의 갓이 분화하는 데는 330~520 nm 파장이 효과가 높다. 버섯의 원기 형성에는 적은 양의 빛이 필요하지만, 버섯이 생육할 때 광량이 부족하면 색깔이 나타나지 않고 대가 길어진다. 이와 반대로 광량이 많으면 버섯의 대가 짧아지고 색깔이 진해져 품질이 불량하므로 알맞은 광량을 유지하여야 한다. 발이유기 후 7~8일이 지나면 배지표면에 낱알 모양의 원기가 덩어리로 형성되고, 계속해서 원기덩어리가 솟아오름과 동시에 원기 선단부가 갓으로 분화되기 위해 흑갈색으로 착색되어 작은 구슬모양을 하면서 9~10일 째에 어린 자실체가 형성된다. 이때부터 자실체의 생육단계로 들어가게 된다 (Fig. 7).

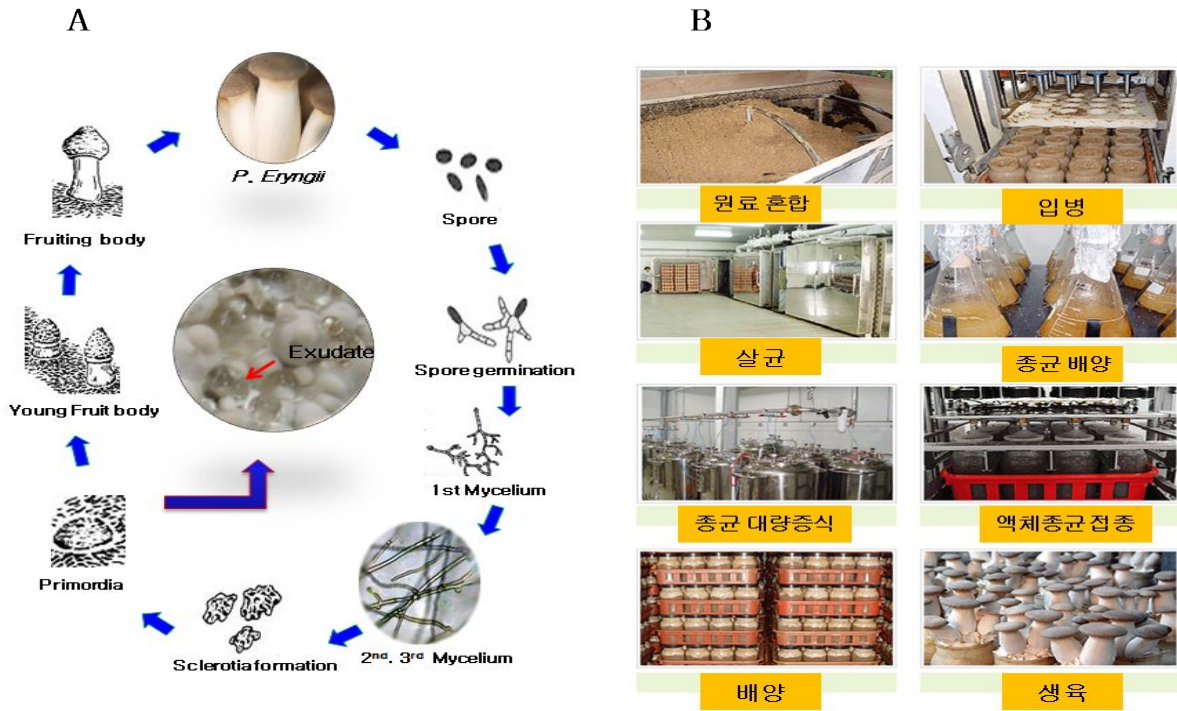


Fig. 7. Life cycle of *Pleurotus eryngii* (A) and Cultivation procedure of fruiting body formation(B)

새송이버섯의 원기 및 자실체 형성을 위하여 톱밥배지에 접종하여 자실체를 유도하였다. 톱밥배지는 미송톱밥과 미강을 2:1 비율로 혼합하고 수분함량을 65%로 맞춰주고 30분간 가반죽 한다. 500 ml 병에 배지를 85% 정도 채우고 121℃에서 90분간 멸균한 후 4℃에서 4시간 동안 냉각한 다음 종균을 10 ml 접종하여 25℃ 암조건에서 약 25일 정도 배양하였다. 오염된 잡균이나 노화 접종원을 제거하기 위해 배지 표면을 1-2 mm 정도 긁어내는 균 긁기 작업을 한 후 습도 80-85%, 온도 15-18℃ incubator에서 뒤집기 작업을 하여 자실체를 유도 시켰다. 원기가 생성되기까지는 약 7일정도 걸렸으며, 발아가 되면 병을 다시 뒤집어 자실체를 생육을 유도하였으며 자세한 과정은 Fig. 8에 나타내었다. 그 결과 실험실 수준에서 완전한 자실체를 형성할 수 있었다.

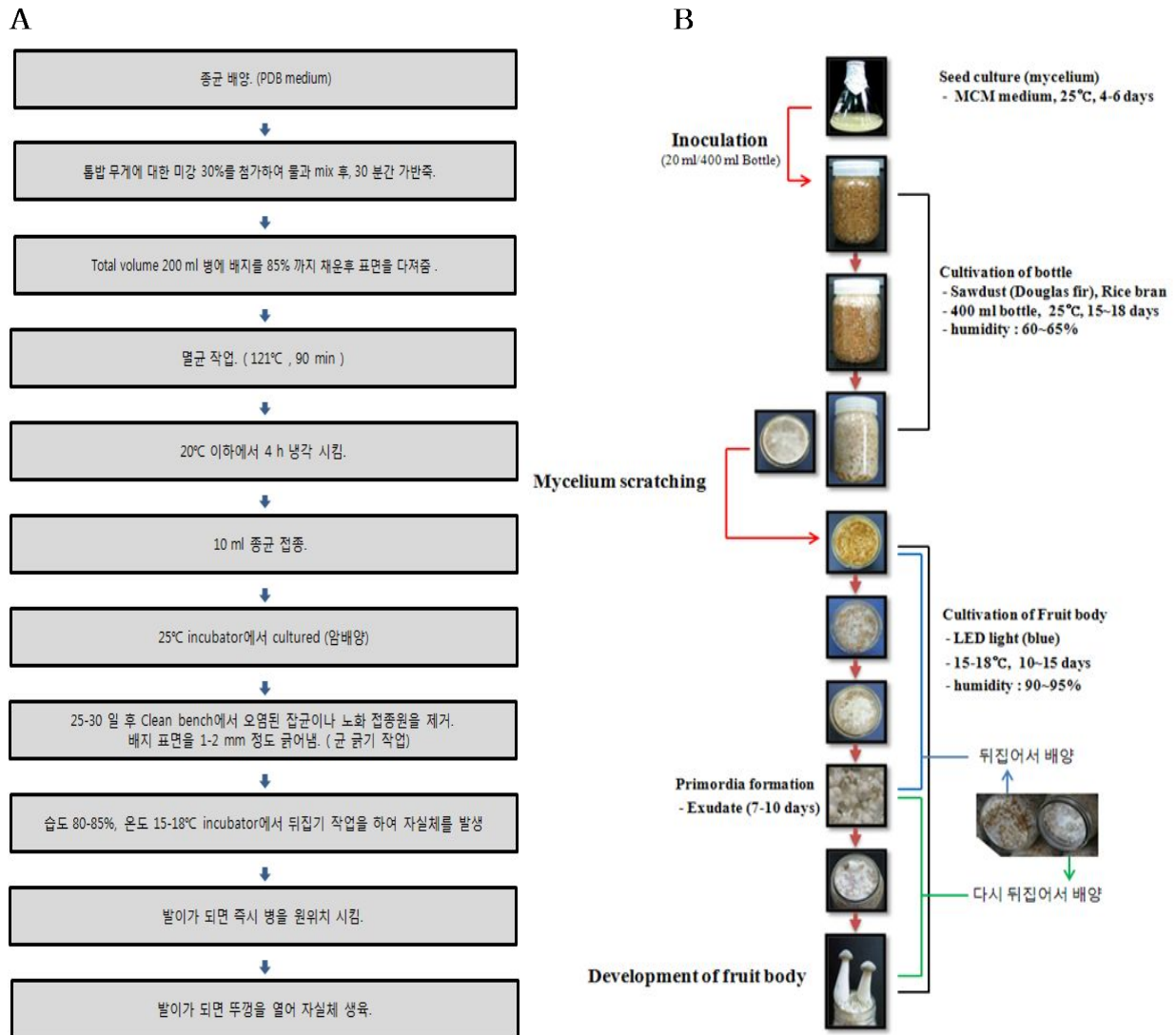


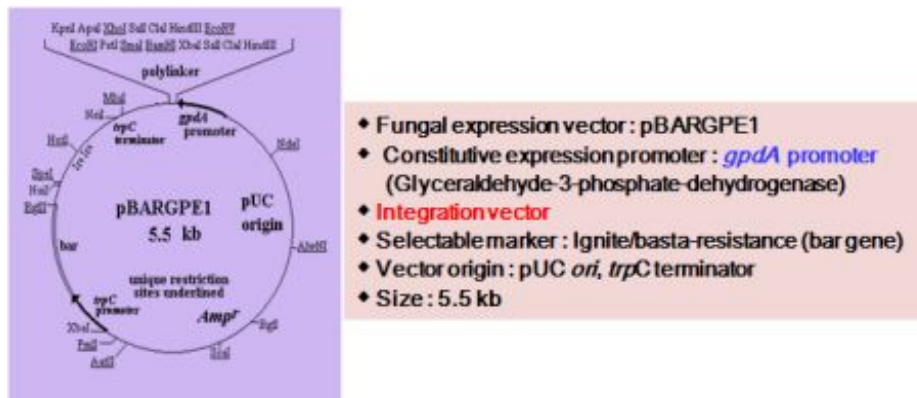
Fig. 8. Procedure of fruiting body formation (A) and Its schematic pictures (B).

라. 새송이버섯 균사체 형질전환법 확립

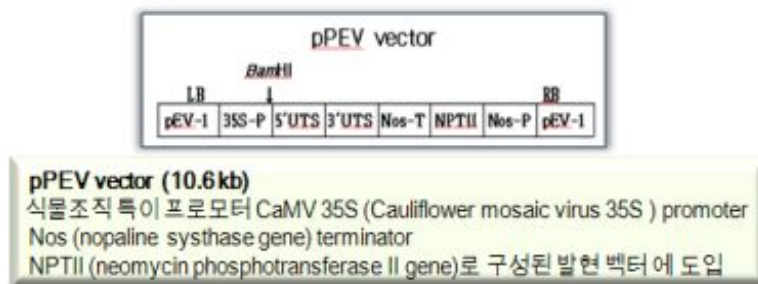
버섯 생명공학에서의 필수적 요건은 유전자 도입 수단의 확보이다. 유전자 도입을 위한 형질전환수단으로서 protoplast 방법 (REMI법), biolistic bombardment 방법, electroporation 방법, *Agrobacterium* 방법 등이 개발되었으나 가장 큰 문제점은 그 효율성 및 재생률이 매우 낮은데 있으며 보편화된 간편한 방법은 존재하지 않는다. Protoplast 방법은 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에 처음 성공적으로 도입된 후 사상균류 형질전환에 대표적으로 이용되어 왔다. 그러나 낮은 효율과 원형질체 제조나 재분화의 번거로움이 상당한 단점으로 지목되고 있다. 대체적 방법으로 electroporation, biolistic bombardment, *Agrobacterium* 방법 등이 개발되었는데 이들

방법들도 최적 조건 마련이 그렇게 용이하지는 않는 것으로 알려져 있다. 형질전환 및 재조합 발현벡터 제조를 위하여 fungus 특이 프로모터를 사용하는 발현 벡터 pBARGPE1 vector (A), 식물조직 특이 프로모터인 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter를 갖는 pPEV vector (B), hygromycin 선택마커를 갖는 pCAMBIA1300 vector (C) 등을 실험 목적에 맞게 사용하였다 (Fig. 9).

A. pBARGPE1 vector



B. pPEV vector



C. pCAMBIA1300 vector

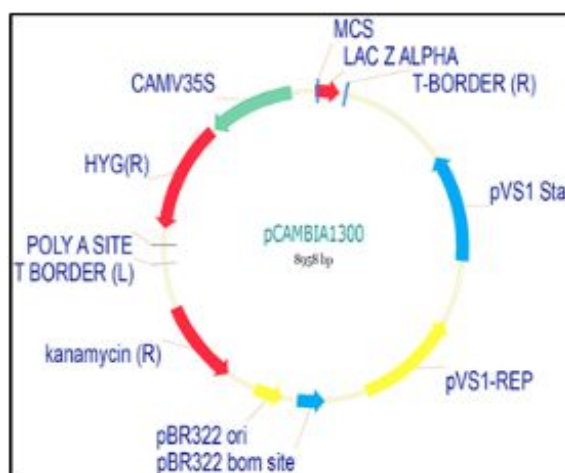


Fig. 9. Representative maps of various vectors used in this study. (A) pBARGPE1 vector, (B) pPEV vector, and (C) pCAMBIA1300 vector.

(1) 원형질체를 이용한 형질전환법 (Restriction Enzyme-Mediated Integration법)

(가) 새송이버섯 항생제 내성 시험

새송이버섯 균사체 자체의 항생제 내성을 조사하기 위하여 Ampicillin (50 ug/ml), Rifampicine 50 ug/ml, Phosphinothricin (PPT : 100 ug/ml)를 사용하여 항생제에 대한 내성을 검증하였다. 새송이버섯 균사체를 각각의 항생제가 첨가된 MCM plate (0.2% Peptone, 0.2% Yeast extract, 2% Glucose, 0.05% MgSO₄ 7H₂O, 0.046% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 1.5% Agar)에 계대 배양 후, 6일간 배양하여 내성을 검정한 결과, Fig. 10에서 보는 바와 같이 항생제가 포함되지 않은 대조군과 비교 시 ampicillin이 첨가된 MCM 배지에서는 대조군과 같은 성향을 보였으며, rifampicine의 경우 처음에는 잘 자랐지만 일정크기 이상 자라지 않았다. PPT가 첨가된 MCM plate 에서는 균사체가 거의 자라지 않았다. 따라서 pBARGPE1 vector를 실험에 사용할 때 선택 마커는 Phosphinothricin을 사용하기로 하였다.

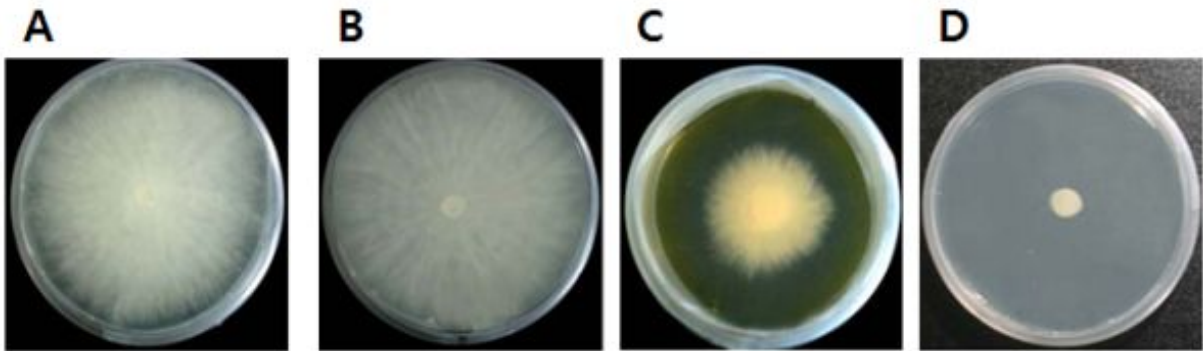


Fig. 10. Antibiotics resistance of *P. eryngii* mycelium after antibiotics treatment. (A) Control, (B) 50 ug/ml Ampicillin, (C) 50 ug/ml Rifampicine, and (D) 100 ug/ml PPT.

(나) 균사체 배양 및 원형질체 형성

균사체 배양은 25℃에서 약 7일 동안 confluent 하게 배양 후, 배양된 균사체 3 ml 을 100 ml MCM (0.2% Peptone, 0.2% Yeast extract, 2% Glucose, 0.05% MgSO₄ 7H₂O, 0.046% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄) 액체배지에서 약 7일 동안 매일 2회 shaking (submerged) 하면서 정지배양 하였다. 균사가 배지를 채울 정도로 자라면 glass beads를 포함하는 MCM 액체배지 50 ml에 15 ml씩 접종하여 25℃에서 약 7일 동안 암실배양 하여 원형질체 형성을 위한 균사체로 배양하였다. 배양된 균사체는 철망을 사용하여 균사체를 분리 하였으며, 0.6 M sucrose로 2회 세척하였다. 균사량의 2배 volume에 해당하는 lysing buffer (5 mg/ml Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* , 5 mg/ml Macerozyme R-10, 20 mg/ml Cellulase in 0.6 M sucrose)를

첨가하여, 25°C에서 100 rpm으로 4시간 동안 암실배양 하여 원형질체와 균사를 분리하였다. 형성된 원형질체는 먼저 깔때기형 휠타(P1 : 100~160 μm)를 이용하여 원형질체와 균사체를 1차 분리하였고, 다른 크기의 깔때기형 휠타 (P2 : 40~100 μm)로 원형질체와 균사체를 다시 분리한 다음, 원형질체 수 측정은 hemacytometer를 이용하여 측정하였다. E-tube에 1 ml씩 분주 한 뒤 원심분리 (14,000 rpm, 10 min at 4°C)하여 상층액 제거 후, 0.6 M sucrose 1 ml을 다시 첨가하여 원심분리(14,000 rpm, 10 min at 4°C) 하였다. 상층액을 제거 후, STC slon (0.6 M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM CaCl₂) 0.5 ml을 첨가하여 원심분리 (14,000 rpm, 10 min at 4°C)하여 상층액을 제거한 다음 STC 용액을 사용하여 원형질체 수를 10⁷~10⁸/200 ul 농도로 재현탁 하여 형질전환에 사용하였다 (Fig. 11 - Fig. 13).

Reagent	Composition
Mushroom complete medium (MCM)	0.2% Peptone 0.2% Yeast extract 2% Glucose 0.05% MgSO ₄ 7H ₂ O 0.046% KH ₂ PO ₄ 0.1% K ₂ HPO ₄ 1.5% Agar
Lysing buffer	Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i> (5 mg/ml) Macerozyme R-10 (5 mg/ml) Cellulase (20 mg/ml)
Osmotic stabilizer	0.6 M sucrose
STC solution	0.6 M sucrose 10 mM Tris-HCl pH7.5 10 mM CaCl ₂
PEG solution	25% polyethylene glycol (MW : 6,000) 10 mM Tris-HCl (pH7.5) 10 mM CaCl ₂

Fig. 11. Reagents used for preparation of protoplast from mycelium of *P. eryngii*.

Preparation of protoplasts from mycelium

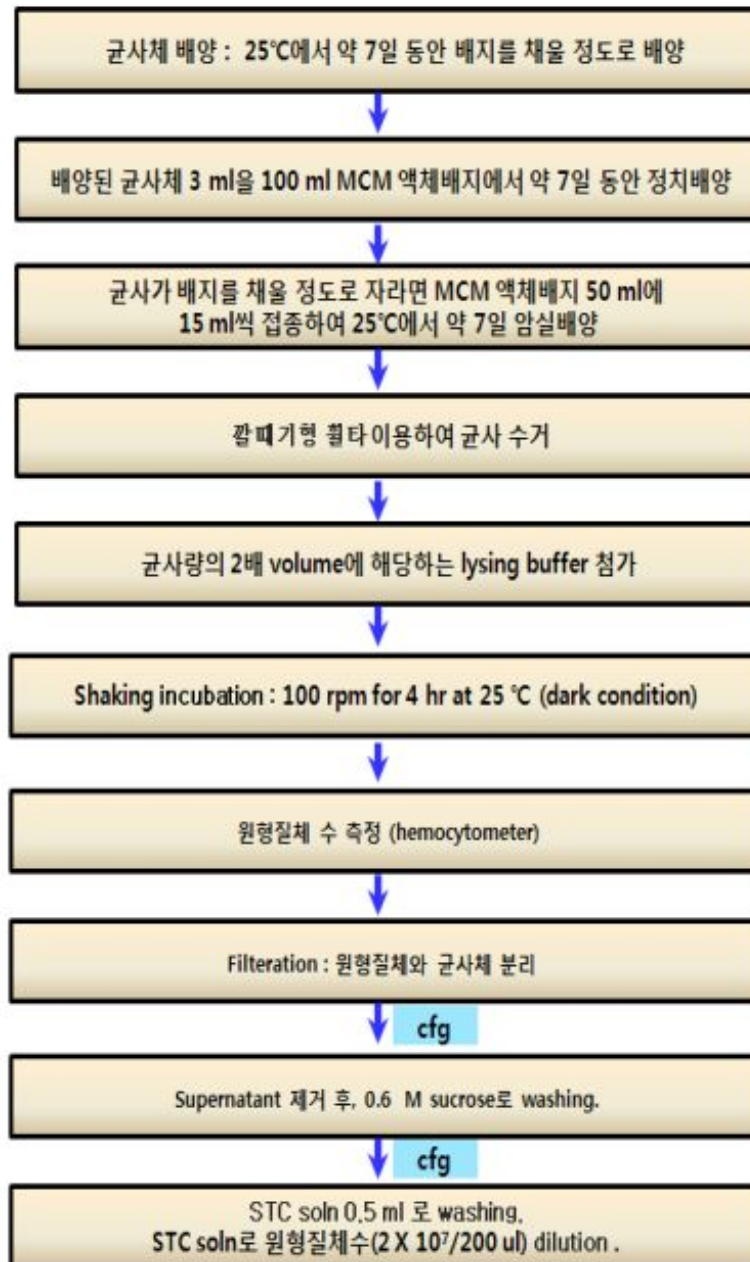


Fig. 12. Procedure for protoplast preparation of mycelium of *P. eryngii*.

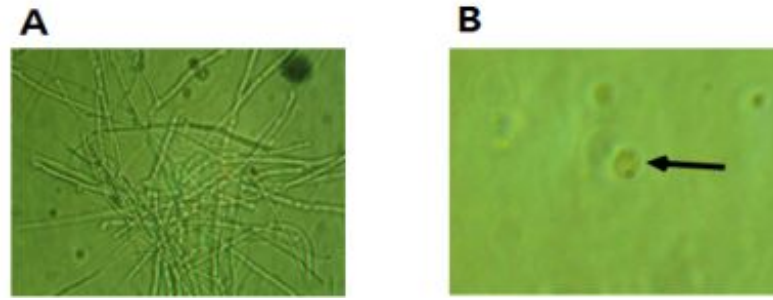


Fig. 13. Formation of protoplast from mycelium of *P. eryngii* after treatment with lytic enzyme. Mycelium before (A) and after (B) lytic digestion.

(다) 원형질체를 이용한 REMI 형질전환 (Kuspa & Loomis, 1992; *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 89, 8803-8807) : 새송이버섯 원형질체 수를 각 반응 당 $1 \times 10^7/200$ ul를 사용하였고 형질전환을 위한 vector로는 pBARGPE1을 사용하여 REMI (Restriction enzyme-mediated intergration) 형질전환 방법을 수행하였다. 즉, plasmid DNA (5-10 ug)와 원형질체를 잘 섞은 다음, 적당량의 제한효소 (*EcoRI*, *SalI*)을 첨가하여 얼음 하에서 20분 동안 반응 시킨 후, PEG soln (60% polyethylene glycol (MW : 3,350), 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM CaCl_2) 50 ul를 첨가하여 잘 섞어 20분 동안 얼음 속에서 더 반응 시켰다. 그 후, PEG soln. 600 ul를 첨가하여 상온에서 20분 동안 반응 후, 항생제 phosphinothricin (100 ug/ml)와 삼투압 안정제 0.6 M sucrose를 포함하는 MCM (0.2% Peptone, 0.2% Yeast extract, 2% Glucose, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.046% KH_2PO_4 , 0.1% K_2HPO_4 , 1.5% agar)배지에 pouring 하여 새송이버섯의 원형질체를 재분화 하였다.

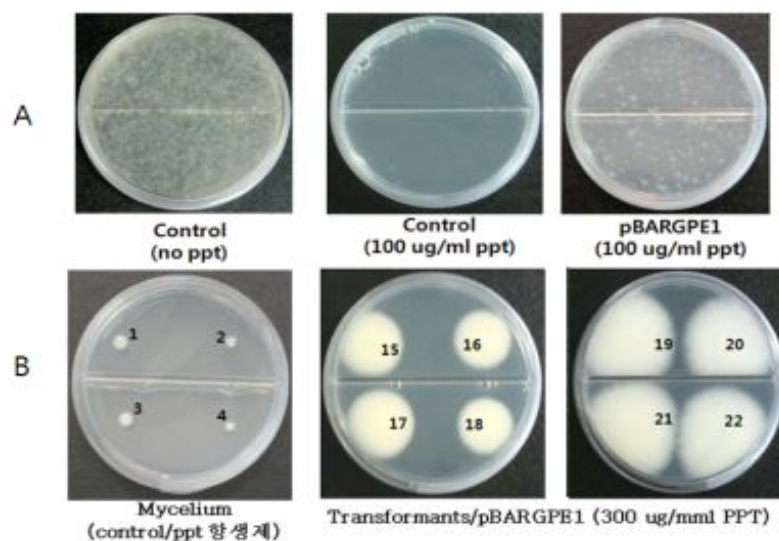


Fig. 14. Transformants of *P. eryngii* with pBARGPE1 using protoplast by REMI method (A) and Transformants of *P. eryngii* on MCM plate containing 300 ug/ml of PPT (B).

Fig. 14. 에서 보는 바와 같이 plasmid vector가 도입되지 않은 control의 경우 PPT 항생제가 도입되지 않은 배지에서는 재생률이 적어도 60% 이상 되는 것으로 판단되었으나, PPT 첨가 배지에서는 예상한대로 전혀 균사체가 형성되지 않았다. 또한 pBARGPE1 vector가 도입된 경우에는 형질전환체가 낮은 재생률 (1,554/107 X 100 = 0.016%)을 보였으나, PPT 농도를 300 ug/ml로 높일 경우에도 도입된 plasmid vector는 안정하게 균사체내에 존재하는 것으로 확인되었고(B), 외래유전자 도입에 의한 성장률 저해 및 plasmid 불안정성은 없는 것으로 판단되었으며, 외래유전자가 도입된 경우에는 genomic DNA 추출 후 PCR에 의해 도입 여부를 확인하였다 .

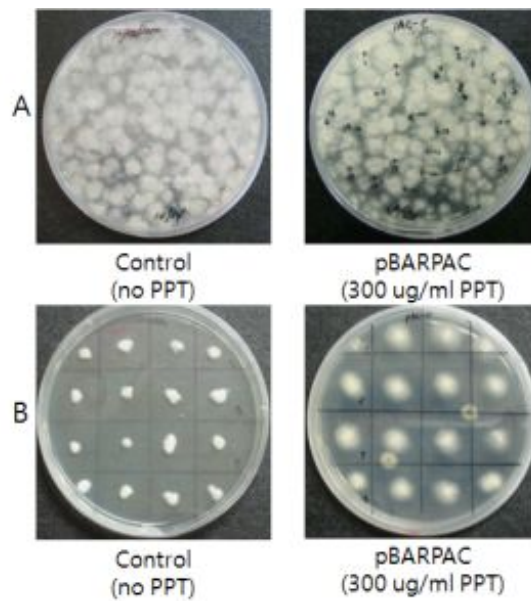


Fig. 15. Regeneration of protoplasts from *P. eryngii*. Protoplasts of *P. eryngii* was incubated on MCM plates without PPT (A) and pBARPAC transformed colonies of *P. eryngii* was incubated on selective MCM plates containing 300 ug/ml PPT (B) at 25°C for 10 day. Screening of the putative *P. eryngii* mycelium containing the recombinant expression vector, pBARPAC. control (C) and (D) pBARPAC transformed colonies(D) of *P. eryngii* was incubated on selective MCM plates containing 300 ug/ml PPT.

Fig. 15. 에서 보는 바와 같이 plasmid vector가 도입되지 않은 control의 경우 PPT 항생제가 도입되지 않은 배지에서 재생 여부를 확인 하였고, plasmid vector가 도입된 형질전환체의 경우 PPT 항생제 첨가 배지에서도 재생되는 것을 확인 하였다. 재생된 균사체는 picking을 통해 MCM 배지(PPT 포함)에서 1차 screening, 한번 더 MCM 배지(PPT 포함)에서 2차 screening(후대검증), 최종적으로 선택된 transformant를 MCM배지(PPT 포함)에서 배양된 균사를 이용하여 genomic DNA 추출 후, target gene의 primer를 이용하여 PCR 방법으로 도입여부를 확인하였다.

(2) General *Agrobacterium*-mediated transformation

아래와 같은 일반적인 *Agrobacterium*에 의한 형질전환법을 약간 변형하여 (Fig. 16), 즉 PEG 분자량 및 농도 변화에 따른 방법과 상해에 의한 형질전환법과 형질전환 효율을 비교 분석하였다 (Fig. 19).

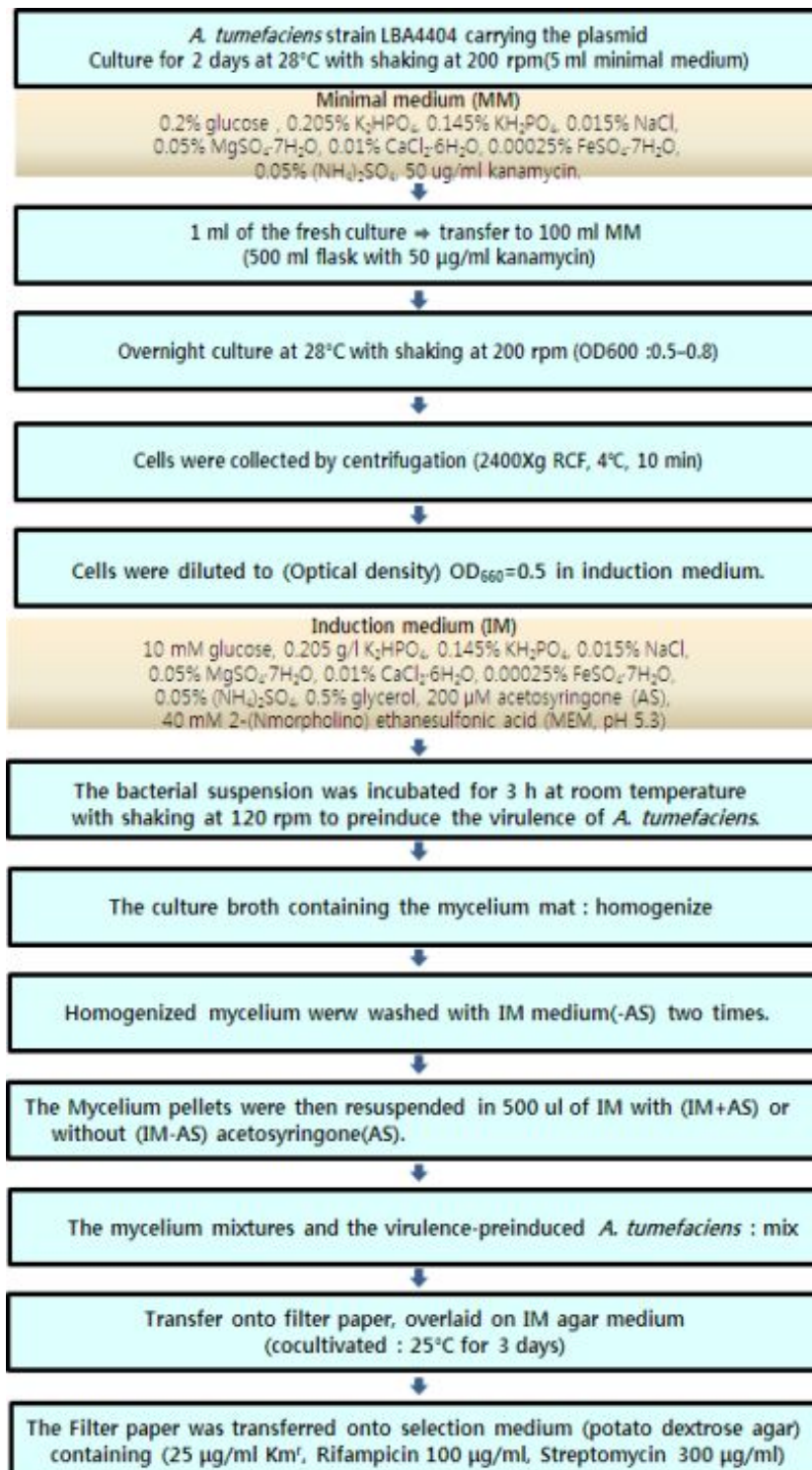


Fig. 16. Procedure of General *Agrobacterium*-mediated transformation with slightly modification.

(3) *Agrobacterium*법을 이용한 새송이 균사체의 형질전환 효율 증진

버섯 형질전환을 위한 *Agrobacterium* 방법의 전제조건은 일상적 형질전환이 가능해야 한다. 따라서 형질전환효율을 높이기 위한 다양한 방법이 식물이나 조직에 따라 다양하게 소개되고 있다. 즉, 페놀화합물 등의 화학물, 계면활성제, 항피사물, 삼투조절 물질 등의 처리나 물리적 인자 적용 또는 생물적 환경적 인자 적용이 그 것이다. 현재 버섯의 형질전환을 위하여 *Agrobacterium* 방법이 이용되고는 있으나 그 효율이 매우 낮아 실용적이지 못한 실정이다. 본 연구에서는 식물형질전환 증대를 위하여 개발되었던 방법을 버섯을 대상으로 시도하였으며 다음의 결과를 얻을 수 있었다.

(가) 일반적인 *Agrobacterium* 형질전환 및 Hygromycin 저항성

Hygromycin 저항성 유전자를 지니는 pCAMBIA1300 vector를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입한 후 *Agrobacterium* 이용 버섯 균사체 형질전환을 실시하고 hygromycin (30~150 ug/ml) 내성 균사체의 출현을 관찰하였다. 그 결과 예비 실험 조건하에서는 형질전환체 발생을 거의 관찰할 수 없었다. 따라서 일반적인 *Agrobacterium* 방법은 버섯의 형질전환을 위하여 실용성이 극히 낮은 것으로 판명되었다 (Fig. 17).

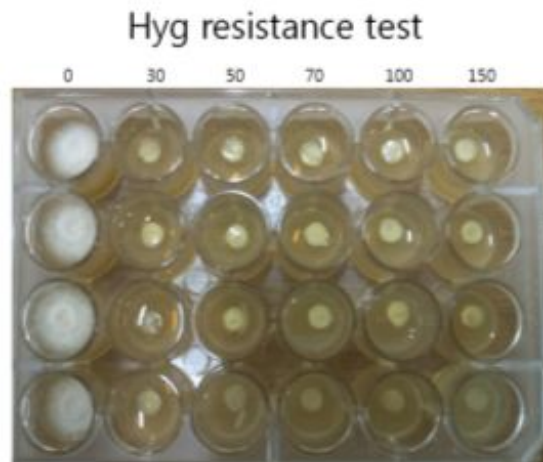


Fig. 17. General *Agrobacterium*-mediated transformation and Hygromycin test.

(나) 상해를 이용한 *Agrobacterium*법

식물의 경우 phenol화합물인 acetosyringone 등을 *Agrobacterium*에 처리하여 *vir* gene 유도 시 형질전환 개선되는 것으로 잘 알려져 있으며 일부 사상균에서도 적용이 되고 있다. 또한 식물조직에 대한 물리적 마찰 또한 형질전환율을 증대시킬 수 있다. 이들을 이용한 *Agrobacterium* 방법의 효율을 평가하였다. 그 결과 일반적인 *Agrobacterium* 방법이나 acetosyringone 처리에서는 형질전환 균사체 출현이 극히 낮

은 반면 상해를 이용한 *Agrobacterium* 방법 (Fig. 18)의 경우 형질전환 균사체의 출현율이 매우 높게 나타남으로써 실용적 형질전환법으로 확인되었다. 즉, 상해를 이용한 형질전환의 경우 *Agrobacterium* 방법 (0%)이나 또는 acetosyringone 처리에서 형질전환 (0-3%) 효율보다 높은 약 15-40% 정도의 효율을 보였다 (Fig. 19A). pCAMBIA1300 vector가 도입된 형질전환체로부터 genomic DNA를 추출하여 hygromycin-specific primer를 이용한 PCR 증폭을 한 결과, Fig. 19B에서 보는 바와 같이 모든 형질전환체에서 약 1.1 kb 크기의 hygromycin 분해효소 유전자를 확인하였다.

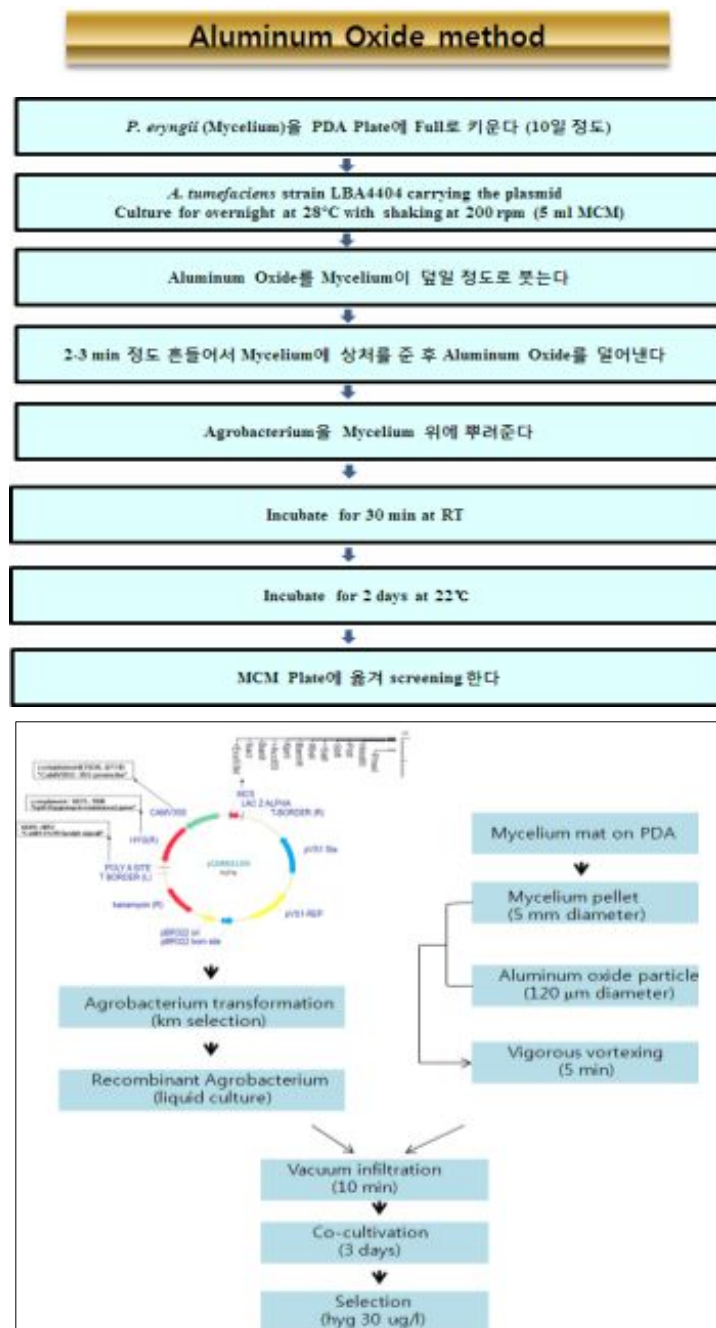
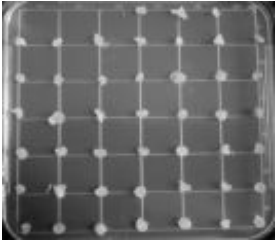
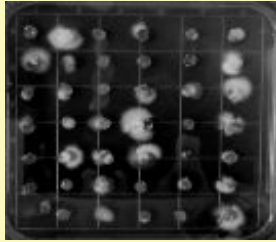
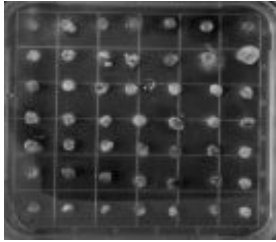


Fig. 18. *Agrobacterium*-mediated transformation using aluminum oxide

A

Agrobacterium이용 형질전환	상해이용 <i>Agrobacterium</i> 방법	Acetosyringone유도 <i>Agrobacterium</i> 방법
		
no transformant	15-40% transformation efficiency	0-3% transformation efficiency

B

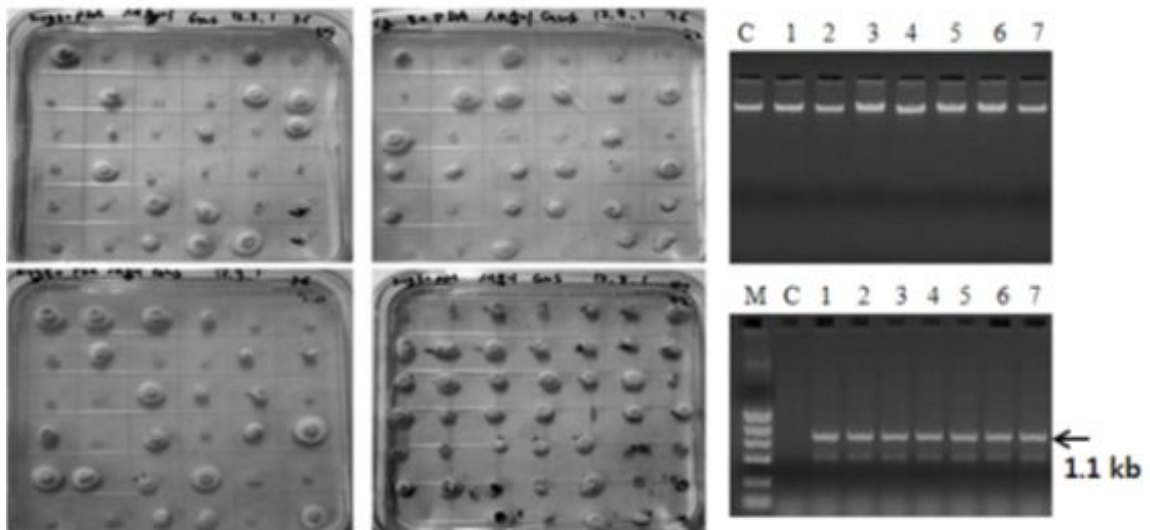


Fig. 19. Transformation efficiencies by different protocols using *Agrobacterium* (A) and Selection of hyg^r mycelial transformants and identification of transgene by PCR using hyg -specific primers (B). C, non-transformed. 1-7, transformed.

마. 새송이버섯 cDNA library 구축

(1) 새송이버섯 total RNA 추출

새송이버섯 균사체로부터 total RNA는 다음과 같은 방법에 의해 추출하였다. 즉, 균사체 1 g을 solution D (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7, 0.5 % sarcosyl, 0.1 M β -mercaptoethanol)에 현탁하고 ULTRA-TURRAX T25 homogenizer를 이용하여 균질화 시킨 다음, 2 M sodium acetate, pH 4.0, 1 ml, phenol (water saturated) 10 ml, chloroform-isomayl alcohol mixture (49:1) 2 ml을 첨가하여 10초 정도 강하게 혼합한 후 얼음에서 15분 정도 방치하면서 냉각하였다. 그 현탁액을 10,000 x g (4°C)에서 20분 정도 원심분리하여 상등액을 얻은 후, isopropanol 10 ml을 첨가하고 -20°C에서 1 시간 정도 방치하였다. 상기 조건으로 원심분리를 반복하여 얻어진 RNA pellet을 solution D 3 ml에 녹인 다음, 1 volume의 isopropanol을 첨가하고 -20°C에서 1 시간 정도 방치하였다. 다시 원심분리하여 얻어진 RNA pellet에 75% ethanol로 넣어 세척하고, 원심분리 후 진공 건조하였다. 최종적으로 얻어진 RNA pellet에 DEPC 함유 물 0.5 ml을 넣어 현탁한 다음 260 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정하고, A260/A280 비율이 1.8 이상 되는 RNA batch를 모아서 poly(A)⁺ RNA 분리에 사용하였다 (Fig. 20).

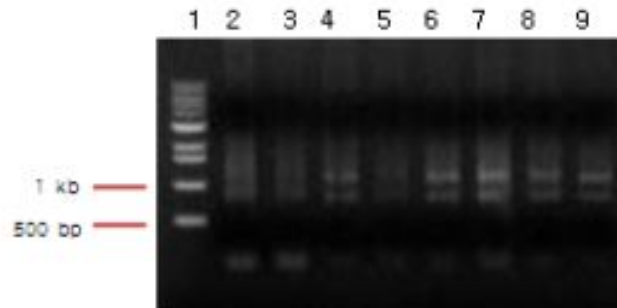


Fig. 20. Isolation of total RNA from *P. eryngii* mycelium. Lane 1 : Size marker, Lane 2-9 : Total RNAs of *P. eryngii* mycelium.

(2) 새송이버섯 cDNA library 제조

(가) Poly(A)⁺ RNA 분리

새송이버섯에서 분리한 약 500 μ g의 total RNA로부터 oligo(dT) cellulose를 사용하여 Molecular cloning 실험 protocol (Maniatis *et al*, Cold Spring Harbor, New York)에 따라 polyadenylated cytoplasmic RNA를 추출하였다. 즉, oligo(dT) powder (Collaborative Biomedical Products) 100 mg을 loading buffer (0.5 M NaCl, 20 mM

Tris-Cl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.2% SDS)에 녹여 10분간 방치하여 equilibration 시킨 후, 원심분리 (1,500 rpm)에 의해 다시 pellet을 회수하여 5 ml의 같은 buffer에 현탁시켰다. Sample RNA가 녹아있는 용액에 5 M NaCl을 첨가하여 최종적으로 0.5 M의 농도로 조절한 후 oligo(dT)가 녹아있는 buffer에 섞고 실온에서 2시간 배양하였다. 그 후 원심분리에 의해 pellet을 회수하여 loading buffer로 1회 washing 한 다음 같은 buffer에 현탁하여 Econo column (Bio-Rad)에 packing하고, nonpolyadenylated RNA를 제거하기 위하여 washing buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% SDS)로 260 nm에서 OD 값이 zero가 될 때까지 washing 한 후, elution buffer (1 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% SDS)를 첨가하여 분획을 받아 ethanol 침전에 의해 poly(A)⁺RNA만을 회수하였다. DEPC (diethylpyrocarbonate)를 처리한 물로 RNA를 녹인 후 spectrophotometer로 260 nm 와 280 nm에서 각각 OD를 측정하여 양 (~ 0.5 ug/ul)과 순도 ($A_{260}/A_{280} = 1.87$)를 결정한 후 다음 단계인 cDNA 합성을 위한 역전사효소의 template로 사용하였다.

(나) First & second cDNA 합성

First cDNA의 제조는 약 5 µg의 poly(A)⁺RNA를 사용하여 oligo(dT) tail에 *Xho*I 제한효소 부위를 갖는 oligo(dT) primer-adapter를 이용하여 50 µl의 reaction volume 하에서 제조하였다. 즉, 5 µg의 poly(A)⁺RNA 와 2.8 µg의 linker-primer, 적당량의 DEPC-treated 물을 섞고 70°C에서 10분간 반응 후 얼음으로 옮겨 RNA의 2차구조를 제거한 다음, 5 µl의 반응 buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 8 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50 µg/ml of RNase free-BSA), 5-methyl dCTP를 함유하는 10 mM dNTPs 3 µl, RNase Block Ribonuclease inhibitor 1 µl (40 U/µl)를 첨가하여 실온에서 10분간 방치하면서 annealing 시켰다. 그 후 Molony murine leukemia virus 역전사효소 2.5 µl (100 U/µl)를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. First cDNA의 합성된 양을 측정하기 위해 0.5 µl의 α-³²P-labelled dATP (800Ci/mmol)가 들어있는 다른 tube로 상기의 반응 mixture (5 µl)를 취하여 옮긴 후 같이 반응하였다. 반응이 끝난 후 합성된 양을 측정하기 위하여 glass microfiber filter를 사용하여 TCA 침전에 의해 표지된 방사성 동위원소의 양을 counting 하여 계산하고 효율성을 측정하고 그 중 일부는 alkaline agarose gel 분석을 위해 사용하였다.

Second strand cDNA의 제조는 좋은 수율로 합성된 first cDNA (약 65%)의 반응 mixture에 second strand buffer (20 mM Tris-HCl, pH 6.9, 90 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂, 0.15 mM β-NAD, 10 mM (NH₄)₂SO₄), 10 mM dNTPs, α-³²P-labelled dATP, RNase H (3 unit), DNA polymerase (100 unit)를 첨가한 후 물로 반응 volume을 400 µl로 맞춘 후 16°C에서 2.5시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 일정량을 취하여 second cDNA 합성효율을 TCA침전에 의해 측정하여 cDNA가 만들어졌음을 확인하고 그 반

응 mixture내의 합성된 cDNA의 5'-말단 부위를 *pfu* polymerase 효소를 사용하여 72°C에서 30분간 blunting 한 다음, cDNA는 phenol/chloroform 추출과 ethanol 침전에 의해 회수하였다. 회수한 2nd strand의 일부는 alkaline agarose gel 분석을 위해 사용하고, 또한 cDNA의 방향성을 부여하기 위하여 *EcoRI* 제한효소 부위를 포함하는 adaptor를 첨가하여 만들어진 cDNA들과 blunt-end ligation을 한 후 polynucleotide kinase로 5'-말단부위를 인산화 시켰다. 3'-말단 linker내에 있는 *XhoI* 제한효소 부위를 sticky end로 만들기 위해 120 unit의 *XhoI*을 처리하고 phage vector내로 cloning 효율을 높이기 위하여 cDNA size fractionation column (GIBCO)을 사용하여 cDNA의 크기별로 분획을 회수한 후 그 중 일부를 취하여 TAE buffer를 사용한 agarose gel에서 cDNA 분포를 확인하였다. 분획중 0.5 kb 이상되는 cDNA만을 모아 phenol/chloroform 추출정제 후 ethanol 침전에 의해 cDNA를 회수한 다음 EtBr agarose plate 상에서 정량하여 그 중 100 ng을 1 μ g의 Uni-ZAP vector와 12°C에서 overnight ligation하여 packaging을 위해 사용하였다 (Fig. 21).

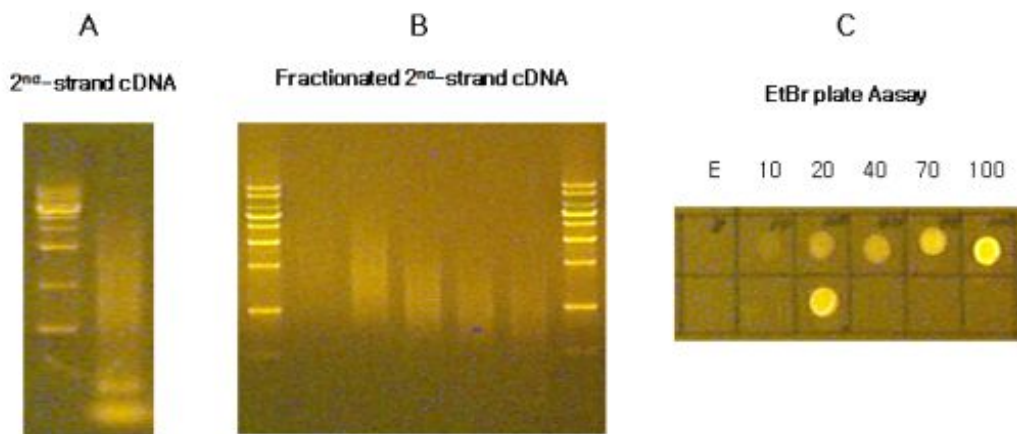


Fig. 21. The synthesized 2nd-strand cDNAs (A) were fractionated (B) in agarose gel and quantified using EtBr plate assay (C).

(다) Phage vector의 packaging 및 library amplification

재조합 phage vector의 packaging은 Gigapack Gold III packaging kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 행하였다. 즉, ligation mixture 1 μ l를 kit에 의해 제공된 packaging extract에 넣어 잘 섞고 22°C에서 2시간 동안 반응한 다음 SM buffer(5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄, 50 ml of 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 ml of 2% gelatin/liter) 500 μ l와 20 μ l의 chloroform을 첨가하여 반응을 중지하고 원심분리에 의해 pellet으로부터 상등액을 분리하여 host cell로 infection을 위해 사용하였다. 재조합된 cDNA의 효율을

측정하기 위하여 XL1-Blue MRF' host cell에 packaged phage를 여러 배로 희석한 후, 각각 1 μ l를 첨가하여 균에 흡착시킨 다음 IPTG와 X-Gal이 포함된 top agarose와 섞어 plating 하였다. 그 결과 재조합 plaques (white color)의 높은 cloning 효율 (95%)을 확인하였고 plaque의 수를 측정하여 cDNA library size를 결정하였다 ($\sim 2.3 \times 10^6$ pfu). 안정하고 높은 titer를 갖는 library를 만들기 위해 packaged phage를 plate (150 mm)당 50,000 plaques 정도가 형성 되도록 host cell에 infection 하여 NZY bottom agar를 포함하는 150 mm plate에 top agar를 도말하여 1회 amplification을 하였다. SM buffer로 재조합 phage들을 추출하여 titer를 결정하고 DMSO를 첨가하여 -80°C 에 보관하였다 (1×10^8 pfu/ul). Phage library내에 도입된 insert DNA size 분포를 알아보기 위해 helper phage를 이용한 plasmid excision 과정을 거쳐 rescue clone들을 확보한 후, 임의로 20개 clones을 선정하여 LB/amp 배지에서 키운 다음 plasmid DNA를 추출하여 적절한 제한효소 (*EcoRI* & *XhoI*)로 잘라 agarose gel 전기영동에 의해 insert DNA 크기를 확인하였다 (Fig. 22). 형성된 재조합 phage library는 원기 분석을 통하여 확인된 단백질들에 대한 유전자 분리를 위하여 screening source 및 PCR 주형으로 사용하였다.

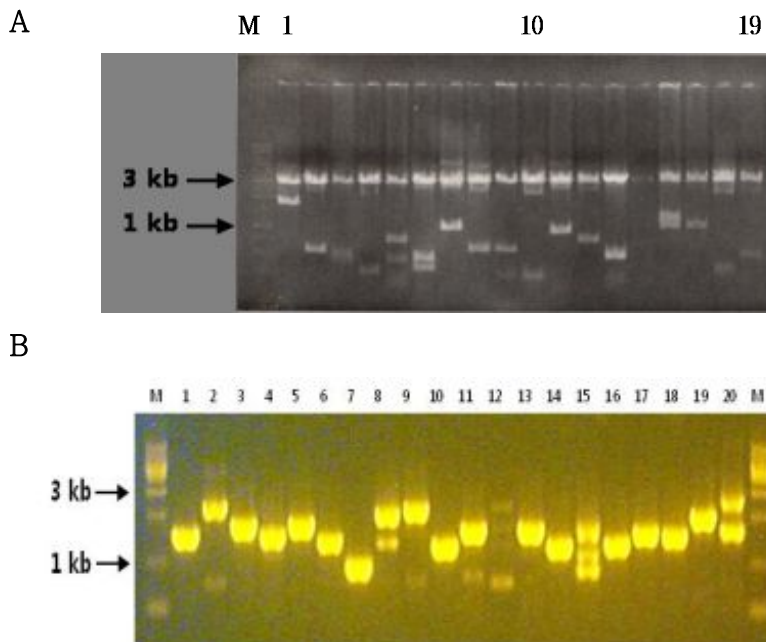


Fig. 22. Determination of insert DNA size. (A) Size distribution of insert DNAs introduced into lambda Zap vector after plasmid excision. (B) Twenty plaques are randomly picked and insert DNA are PCR amplified with T7 and T3 primer. PCR products were electrophoresed on a 1% TAE agarose gel.

바. 새송이버섯 genomic DNA library 구성

(1) 새송이버섯 genomic DNA 추출

새송이버섯 균사체로부터 genomic DNA 추출은 약간 보완된 hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) 방법 (Doyle and Doyle, 1990)에 의해 추출하였다. Genomic DNA 추출을 위하여 균사체는 potato dextrose broth (PDB) 배지에서 배양한 후, 0.1 g 균사체를 extraction buffer (100 mM Tris-Cl (pH 9.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 1% Polyethylene glycol 8000, 0.2% β -mercaptoethanol) 0.5 ml에 넣고 균질화 한 후, 74°C에서 70 분 반응하였다. 그 혼합물에 동량의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)를 넣고 0°C에서 30분간 반응 후 원심 분리 하였다 (2회). 상등액에 0.55 volumes의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음, 4°C에서 15,000 rpm으로 원심분리하여 genomic DNA를 침전시켰다. 침전된 pellet을 건조시킨 후, RNase A (40 μ g/ml)를 함유하는 TE buffer에 녹여 농도를 특정한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다 (Fig. 23).



Fig. 23. Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium. Lane 1 : DNA size marker, Lane 2-11 : Genomic DNAs of *P. eryngii*.

(2) Genomic DNA library 제조

(가) 제한효소 처리 및 size fractionation

분리한 새송이버섯 genomic DNA 50 μ g을 *Bam*HI 효소로 partial digestion 하여 0.6% agarose gel에서 확인한 후, 2 kb에서 8 kb에 이르는 band들을 gel로부터 elution 하여 분리 정제하였다. Lambda FIX vector와 compatible end (*Xho*I digested, filled in with dCTP and dTTP)를 만들기 위해 GATC의 sticky end를 갖는 각 크기별의 genomic DNA를 dATP 와 dGTP 만을 사용하여 klenow 효소에 의해 부분적으로 filling 시켰다. Phenol/chloroform에 의한 정제 후 ethanol 침전에 의해 각 크기별로 분포하는 genomic DNA를 얻고, 이미 탈인산화가 되어 있는 vector DNA 1 μ g과 각 크기별 genomic DNA 1 μ g을 섞고 T_4 DNA ligase 2 weiss unit 을 첨가하여 1

6°C에서 overnight 동안 ligation 반응을 수행하였다. Ligation이 끝난 후 일부를 취하여 agarose gel에서 ligation efficiency를 확인한 다음 1 μ l ligate를 사용하여 *in vitro* packaging 하였다.

(나) Packaging & Amplification

In vitro packaging은 Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene, #200203)를 사용하여 수행하였다. 즉, -80°C에 보관중인 packaging extract를 녹인 후 ligation된 DNA 1 μ l (약 200 ng)를 첨가하고 실온에서 2시간동안 반응시킨 다음, 500 μ l의 SM buffer와 20 μ l의 chloroform을 첨가하여 잘 섞고 원심분리에 의해 debris들을 제거한 다음 titering을 위해 4°C에 보관한다. 0.2% maltose와 10 mM MgSO₄를 포함하는 LB 배지에서 자란 XL1-Blue MRF (P2) 세포들의 밀도를 absorbance 600 nm (A=600)에서 측정하고 10 mM MgSO₄로 흡광도가 0.5가 되도록 희석한 후 숙주세포 200 μ l와 final packaging extract를 연속적으로 희석한 후 섞어 37°C에서 15분간 배양한다. 그 후 48°C로 식힌 NZY top agarose 4 ml을 감염된 세포와 섞은 다음 100 mm NZY agar plate에 붓고 37°C에서 10시간 배양한 후 titer를 결정하여 사용한 원액 1 μ l에 대하여 genomic library의 average size를 측정하였다 (0.5 x 10⁶ pfu/ul). Genomic library의 high titer stock을 안정하게 많은 양 얻기 위하여 lambda FixII vector에 cloning된 genomic DNA를 함유하는 phage를 1 회 증폭하였다. 즉, 상기와 같이 준비된 숙주세포 600 μ l에 150 mm plate에 1 x 10⁵ plaques이 형성되도록 phage를 섞고 37°C에서 15분 배양한 후 10 ml의 top agarose 용액을 넣어 섞은 후 150 mm plate에 부어 37°C에서 confluent lysis가 일어날 때까지 배양하였다. 그 후 lysis가 일어난 plate에 SM buffer 10 ml을 첨가한 후 phage가 스며 나올 수 있도록 shaking 하면서 4°C에서 overnight 배양하였다. 각각의 plate로부터 SM buffer를 회수한 후 chloroform을 5% 되게 넣어 실온에서 15분간 배양한 후 원심분리에 의해 debris를 제거하였다. 그 중 일부는 DMSO가 7% 되게 첨가하여 -80°C에 stock으로 보관하고 나머지는 chloroform을 0.3% 되게 넣은 다음, 원기로부터 확인된 단백질의 genomic DNA 유전자 및 promoter 분리, 또는 필요한 부분을 PCR 증폭하기 위하여 주형으로 사용한다. 도입된 insert DNA는 Fig. 24에서 보는 바와 같이 다양한 크기로 분포하는 것을 확인하였다.

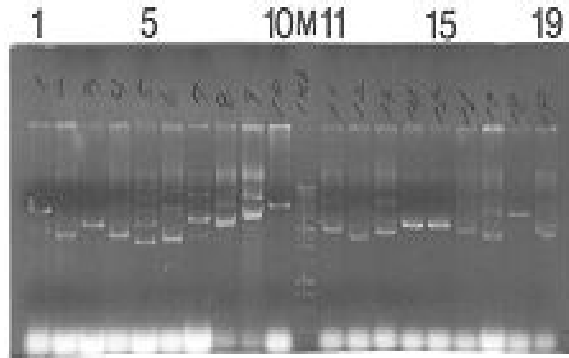


Fig. 24. Size distribution of *P. eryngii* genomic DNAs introduced into Lambda FixII vector. Lane M : DNA size marker, Lane 1-19 : Genomic DNAs of *P. eryngii*.

사. 원기형성 분비물의 단백질 분석

(1) 원기 시스템

- 자실체의 기간 (基幹)이 되며, 원기를 경유하여 자실체 형성.
- 버섯의 원기 형성은 필수적, 그 원기를 자실체로 성장시키는 것이 인공배양에서 진짜 기술력.
- 버섯이 자실체를 형성하는 원리중의 하나가 삼투압과 관련.
- 모든 버섯은 자실체내에 삼투압관련 당성분 (mannitol, trehalose)을 생성하여 그당성분을 자실체 표면으로 방출 (Exudates).
- 자실체 표면에 거주하는 미생물들이 삼투압 관련 당을 먹어 치워야 온전한 자실체로 발달 가능.
- 자실체 표면의 당농도가 낮고 자실체 체내의 당농도가 높아야 버섯은 당성분의 농도 편차로 인하여 외부의 수분을 끌어 들임.
- 버섯 자실체의 부피가 커져서 점차 성숙한 버섯 자실체로 발달 가능.
- 원기 형성 지역의 균사는 외부로 자라지 않고, 곧바로 균사의 막이 두터워지고 균사의 직경이 변화하고 원기가 성장하면서 분비물의 색깔도 투명한 흰색에서 갈색으로 변해감 (Fig. 25).
- 느타리, 새송이, 표고버섯 등의 대표적인 미생물 (*Pseudomonas fluorescens*).
- *priA* 유전자 : 표고버섯의 균사로부터 자실체가 발생하는 초기 단계에 형성되는 자실체 원기에서 현저한 발현을 보이는 유전자.
- 원기분비물 분석결과 기능 및 기작은 밝혀지지 않았지만 단백질들을 함유 (Fig. 25).

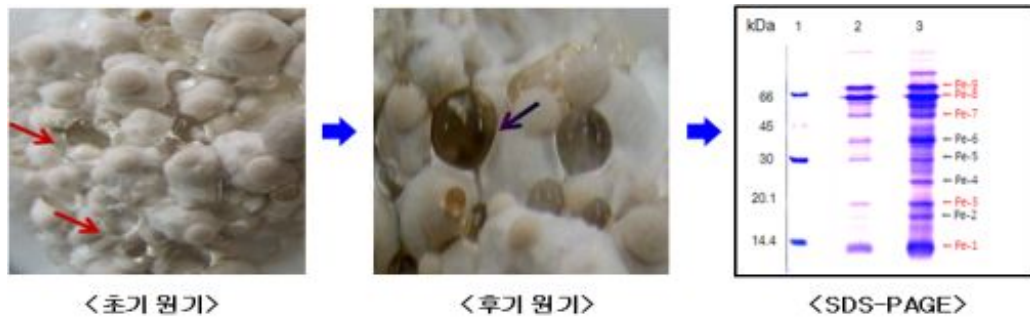


Fig. 25. Morphological change of primordium exudates and SDS-PAGE analysis.

(2) 원기형성 분비물의 수집

원기 (primordium)는 균사체에서 자실체 형성 시 나타나는 분비물로서, 원기발달의 초기단계에서는 균사가 더 이상 가치를 치지 않는 특징을 보이며, 원기가 형성되는 지역의 균사는 외부로 자라지 않고, 곧바로 균사의 막이 두터워지고 균사의 직경이 변화되기 시작한다. 따라서 자실체의 기간 (基幹)이 되는 자실체원기가 발생하며, 원기를 경유하여 비로소 자실체가 형성되는 것이다. 버섯이 자실체를 형성하는 원리중의 하나가 삼투압과 관련되어 있는데 모든 버섯은 자실체내에 삼투압 관련 당 성분을 만들어 내며, 이들 당성분을 자실체 표면으로 방출한다. 그러면 자실체 표면에 거주하는 미생물들이 그 삼투압 관련 당을 먹어 치워야 온전한 자실체로 발달이 가능하게 된다. 자실체 표면의 당 농도가 낮고 자실체 체내의 당 농도가 높아야 버섯은 그 당성분의 농도 편차로 인하여 외부의 수분을 끌어들이고 버섯 자실체의 부피가 커져서 점차 성숙한 버섯 자실체로 발달이 가능하게 되는데, 대표적인 미생물의 예가 *Pseudomonas fluorescens* 이다. 이들이 느타리나 새송이, 표고버섯 등의 표면에 자라서 표면에 존재하는 삼투압관련 당 성분을 먹어 치울 때 버섯은 아주 건강하게 자라게 된다.

새송이버섯의 원기형성 분비물을 수집하기 위해 새송이버섯 종균을 톱밥배지에 접종하여 자실체 형성 초기 단계에서 Fig. 26과 같은 원기 분비물들이 형성되었고, 400 ml bottle 당 약 1.5-2 ml 정도의 원기 분비물들을 수집하여 SDS-PAGE 및 이차원적 전기영동 (2-D)을 위한 시료로 사용하였고 나타난 단백질 band들을 분석하였다.



Fig. 26. Primordium exudates at the early stage of fruiting body formation.

(3) 원기형성 분비물의 단백질 분석, 아미노산 서열 분석 및 단백질 동정

(가) 1차 분석 (SDS-PAGE)

수집한 원기형성 분비물을 이용하여 분자량에 따른 단백질 분리법인 SDS-PAGE를 실시하였다. Laemmli의 SDS-PAGE 방법(1970)에 따라, 원기형성 분비물을 Bradford 단백질 정량법을 이용하여 30 ug 단백질을 15% acrylamide gel에 loading 하여 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하였다. SDS-PAGE 분석결과 Fig. 27와 같이 원기형성 분비물의 단백질이 분자량에 따라 분리된 것을 확인할 수 있었고 뚜렷한 band 8개를 선별하여 CAF (Chemical Association Fragment)-MALDI sequencing 분석을 하였다.

CAF-MALDI sequencing을 위하여 SPITC 반응을 실시하였다. SPITC 반응은 Dongxia *et al* (Rapid Commun. Mass Spectrom. 18: 96 - 102)에 의한 방법에 따라 진행하였다. 즉, 20 mM NaHCO₃ (pH 9.5)에 SPITC(Aldrich)를 10 mg/mL의 농도가 되게 녹인 다음, trypsin digestion한 반응물의 부피에 반이 되는 양을 처리한다. 반응을 유도하기 위해 55°C의 항온기에서 30분 동안 처리한 후, 반응을 종결시키기 위해 1 μ l의 5% trifluoroacetic acid (TFA)를 처리하였다. 반응이 끝난 시료는 C18ZipTips

(Millipore)을 이용하여 1-5 μ l 부피로 탈염 및 농축하였고, 이후 3차례 0.1% TFA로 C18ZipTip을 세척하였다. 이 농축액은 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포화된 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합되었고, target plate 위에 적하하여 질량분석을 하였다. CAF-MALDI sequencing 결과 분석된 서열은 Table 21과 같고 Mascot 검색결과 (Table 22) 알맞은 단백질을 동정하지 못했다. 이는 새송이버섯 유전자들의 분석된 데이터 파일이 없고, 또한 SDS-PAGE에서 보이는 하나의 band에도 여러 가지 단백질이 섞여 있는 것으로 판단되어 2-dimensional 전기영동에 의해 원기 단백질을 재분석하였다.

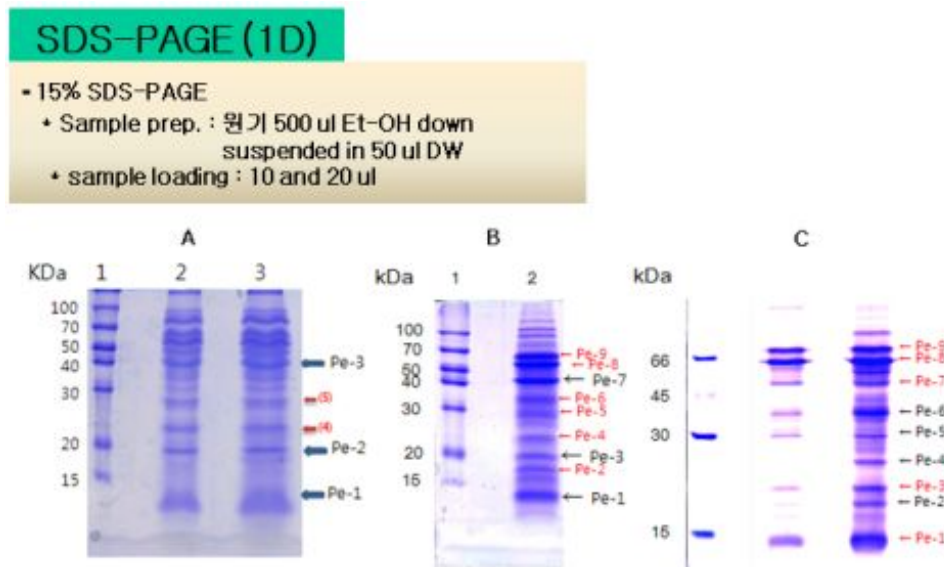


Fig. 27. SDS-PAGE Analysis of primordium exudates.

Table 21. Sequencing result using CAF-MALDI method

Name	Protein sequence
Pe-1	1) PHSTVEKGLVAR
	2) SSAVSNCCDDNPMRSAPSWYA
Pe-2	1) PM*HYTTLPRVAR
	2) AKNM*SKGPDTKSIR
	3) AATTLLYRAAHCLM*M*PK
Pe-3	1) ALVWTNHNR
	2) ATGTKHVSLAR
	3) DIM*TVPDNNGTSIR
	4) KDTLLM*TATALPLEDTR
	5) KDM*HRCLWWLPEHR
Pe-4	1) M*VANAPGR
	2) ANGPHGSGHIR
	3) APFKM*EVKWGALR
	4) PLGPM*LGDLTPPLDPR
	5) ACAEDCLVEVLAM*PVVGTRPD
Pe-5	1) ①ASGGTVAGKSHHTTTTAP ②ASGGTVAGKSHHTTTIR
	2) ①AIAGKTEAGGSSPAM*GP ②ATM*TTMPPKTAVPR
	3) KVSACGLRPLKAEHPPK
	4) APGWDDYRLKANHCLR
Pe-6	1) EM*MPNGAIHTR
	2) LKVVNVHRMHACGMMNSCGYSLCLHVP MMKTTR
Pe-7	1) GLPPM*IGGGNDKIYTR
	2) CAAETDVALPKRTGM*VALNLDAR
	3) GLFNAPGR
	4) DPALGAM*SAHR
Pe-8	1) DMDGWSPPYWAM*PELVAGF
	2) TGGDTPTVYM*LLKLR
	3) ARIYISAM*SNGM*PR
Pe-9	1) ANLVTYAKASSGAGPAHIPR
	2) KVTLYPM*WSSRPPPR
	3) WGMGTPR

Table 22. BLAST search results

spot No.	Protein	Accession No.	kDa	pI	Coverage (%)	Identification
Pe-1	predicted protein	gi 170108314	18.04	9.17	6	No
	hypothetical protein SCHCODRAFT_113215	gi 300101210	72.22	5.62	1	No
	hypothetical protein SNOG_10822	gi 169615330	32.16	6.53	5	No
Pe-2	solid-state culture specific protein	gi 70988577	51.62	6.14	3	No
	hypothetical protein AN8951.2	gi 67903928	39.06	9.39	3	No
	hypothetical protein AFUA_7G08370	gi 70986574	21.5	8.01	7	No
Pe-3	nonribosomal peptide synthetase 6	gi 59896118	224.9	5.04	1	No
	probable GTP-binding protein	gi 18376285	41.33	8.68	3	No
	oxidoreductase	gi 226287674	46.28	5.88	4	No
Pe-4	hypothetical protein	gi 50303931	94.75	9.57	1	No
	conserved hypothetical protein	gi 154273186	11.75	7.44	9	No
Pe-5	hypothetical protein CaO19.8149	gi 68476987	86.26	7.05	1	No
	predicted protein	gi 154277960	33.22	4.76	5	No
	predicted protein	gi 242223056	137.2	5.41	1	No
Pe-6	metallophosphoesterase	gi 170106788	54.4	6.40	3	No
	hypothetical protein	gi 50309927	156.24	8.58	1	No
	hypothetical protein NCU01337	gi 85102930	45.09	6.35	4	No
Pe-7	actin-binding protein Fragmin, putative	gi 212543865	44.31	5.62	4	No
	hypothetical protein AN6880.2	gi 67541420	151.27	7.13	1	No
	sec7 domain belongs to guanine nucleotide exchange factors	gi 170085303	142.70	8.52	1	No
Pe-8	conserved hypothetical protein	gi 238508271	69.41	6.14	2	No
	predicted protein	gi 154300932	145.14	9.84	10	No
Pe-9	hypothetical protein CIMG_00724	gi 119192694	75.01	7.67	6	No
	hypothetical protein SNOG_13932	gi 169621444	106.51	7.66	1	No
	hypothetical protein EBI_27177	gi 269861473	87.91	8.14	2	No

(나) 2차 분석 (2-Dimensional electrophoresis)

수집한 원기형성 분비물을 이용하여 이차원 전기영동을 실시하였다. Isoelectric focusing은 IPGPhor (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 수행하였고, 2-D 전기영동은 Protean IIxL 2D multi cell (Bio-Rad)을 사용하였다. Silver Staining으로 염색한 후 여러 크기의 11개 spot들을 선정하였고 (Fig. 28), 선정된 spot을 PROTEAN 2-D Spot Cutter로 잘라내어 50 mM의 ammonium bicarbonate (pH 8.5, buffer in 50% CH₃CN)를 이용하여 세척한 후, digestion buffer 용액 (100 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5), 1 mM CaCl₂, 10% CH₃CN, 50 mg sequencing grade trypsin)과 혼합하여 overnight 반응하였다. 50% CH₃CN/5% TFA 용액을 사용하여 peptide를 추출한 다음, MALDI-TOF 분석에 의해 얻은 결과에 따라 NCBI database을 이용하여 단백질 동정을 하였다 (Table 23). 그러나 분석된 11개 spot에 대한 결과는 대부분 hypothetical protein으로 확인되어 2-D에 의해서도 만족할 만한 결과를 얻지 못했다.

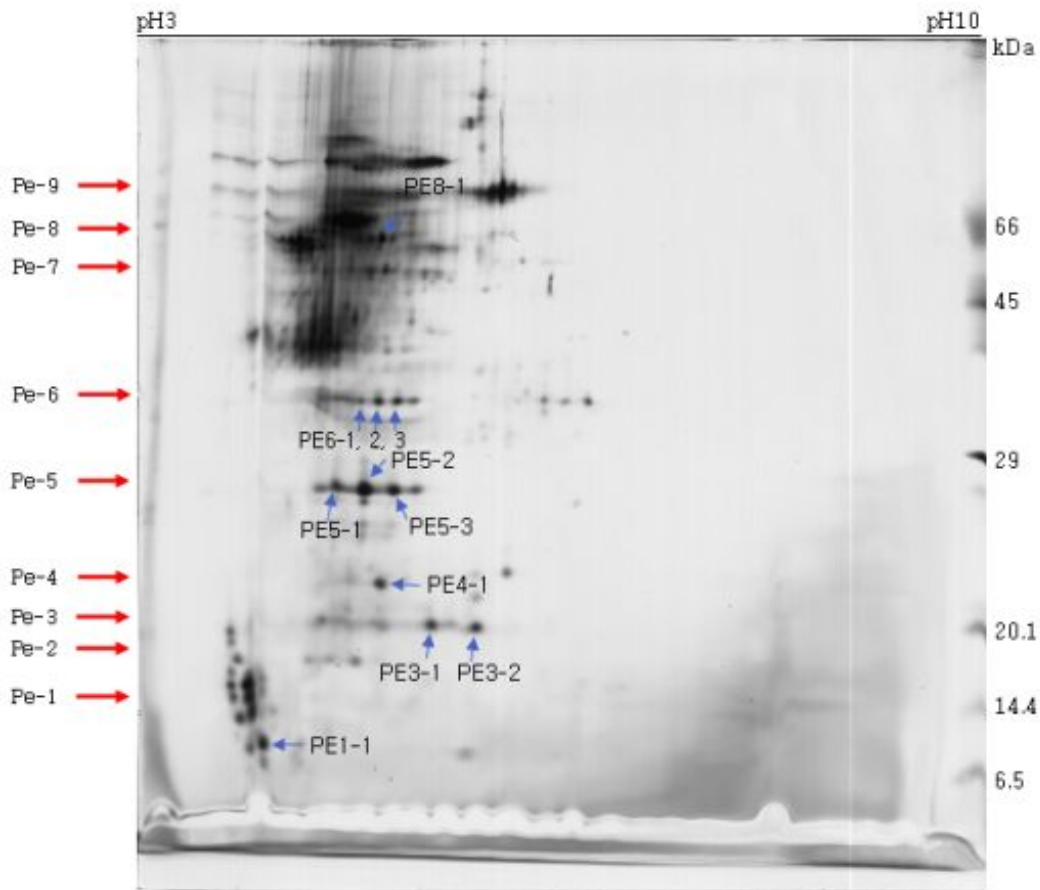


Fig. 28. Two dimensional electrophoresis of primordium exudates

Table 23. BLAST search result for different 2-D spots

spot No.	Protein	Accession No.	kDa	pI	Coverage (%)	Identification
PE1-1	hypothetical protein PICST_81383	gi 149385655	72.00	4.76	9	No
PE3-1	She9/Mdm33 family protein	gi 310799841	51.32	6.15	12	No
PE3-2	predicted protein	gi 325091570	21.54	11.19	25	No
PE4-1	hypothetical protein FG02040.1	gi 46110316	65.43	8.30	14	No
PE5-1	predicted protein	gi 154293181	9.09	9.30	56	No
PE5-2	hypothetical protein GLRG_03316	gi 310792711	29.54	5.71	22	No
PE5-3	hypothetical protein PTT_10208 STCV_EMENI Putative	gi 311327139	56.85	8.88	14	No
PE6-1	sterigmatocystin biosynthesis dehydrogenase stcV	gi 67901636	43.89	6.57	21	No
PE6-2	THO complex component (Rlr1), putative	gi 238494442	267.17	6.95	7	No
PE6-3	predicted protein	gi 149238217	58.78	5.88	17	No
PE8-1	hypothetical protein MPER_09526	gi 238586184	18.08	4.54	28	No

MALDI-TOF 분석 결과에 의해 단백질 동정에는 어려움이 있어서 spot중 가장 band intensity가 강한 PE5-2 spot에 대하여 N-terminal amino acid sequencing 분석을 실시하였다. 위와 같은 방법으로 2-DE 전기영동하여 spot을 PVDF membrane에 transfer 한 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 원하는 spot (PE5-2)을 잘라서 N-말단을 Edman degradation 방법을 이용하여 분석하였다. Fig 29에서 보는 바와 같이 N-terminal amino acid 서열이 SNICCAAIEV으로 분석되었고, 이 서열을 이용하여 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 검색 결과 (Table 24), Fungal, 조류 등과 관련된 predicted protein, hypothetical protein 포함 7종의 단백질과 유사한 서열을 갖는 것으로 분석되었으나 분자량 등이 일치하지 않아 동정에 실패하였다 .

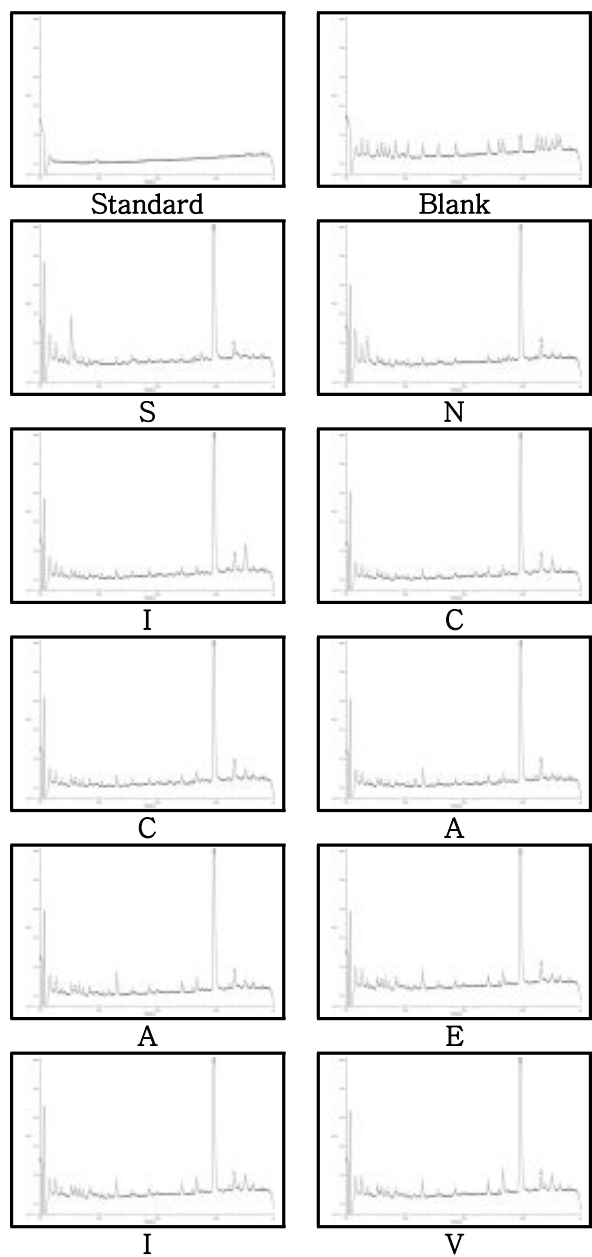


Fig. 29. Analysis of N-terminal amino acid sequence for PE5-2 spot using Edman degradation

Table 24. BLAST search result for amino acid sequence of PE 5-2 spot.

Accession	Description	Scientific name	Query coverage (%)	M.W (kDa)
XP_002176209.1	predicted protein	Phaeodactylum tricornerutum CCAP 1055/1	70	79.85
XP_002176205.1	predicted protein	Phaeodactylum tricornerutum CCAP 1055/1	70	79.83
XP_001011880.2	hypothetical protein	Tetrahymena thermophila	100	113.75
XP_001210832.1	conserved hypothetical protein	Aspergillus terreus NIH2624	90	71.45
XP_003042300.1	hypothetical protein NECHADRAFT_51752	Nectria haematococca mpVI 77-13-4	90	57.29
EGO23916.1	hypothetical protein SERLADRAFT_439227	Serpula lacrymans var. lacrymans S7.9	90	55.31
EGN98356.1	hypothetical protein SERLA73DRAFT_56314	Serpula lacrymans var. lacrymans S7.3	90	53.08

(다) 3차 분석 (SDS-PAGE)

1차 분석과 마찬가지로 다른 batch의 원기로부터 원기형성 분비물을 수집한 후 SDS-PAGE를 이용하여 재분석하였다. Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하였을 때, 뚜렷하게 나타나는 band 3개를 선별 (Fig. 30)하여 CAF-MALDI sequencing 분석을 하였다. 그 결과 분석된 서열은 Table 25와 같았으며 BLAST 탐색 결과, No. 1의 경우 새송이버섯 aryl-alcohol oxidase precursor로, No. 2의 경우는 새송이버섯 Laccase 단백질로 탐색되었고 또한 분자량도 약 57 kDa으로서 SDS-PAGE에서 추정의 위치와 흡사한 것으로 확인되었다 (Table 26).

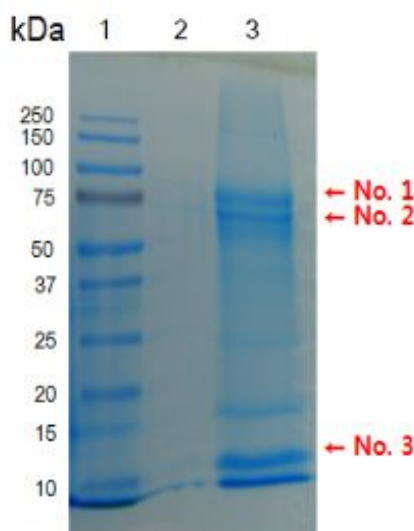
**Fig. 30. SDS-PAGE analysis of primordium exudates collected from other batch of primordium.**

Table 25. Sequencing results of 3 protein bands using CAF-MALDI method

Name	Protein sequence
No. 1	1) WTNTRTGPLTALIANHLAWLRLPSNS
	2) VDGLRIVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGERGADLI
No. 2	1) LPANKLIEVSIPGAGAHFPFLHGHFTFDIVRVNSD
No. 3	1) S*T*AAG*T*TFTFGGTR
	2) S*TGAAAG*TFTGGTR
	3) *VSCFAV*PVAEQTYE*F*ADAR
	4) VSCFAVXPVAEQTYEQFXADAR

Table 26. BLAST search results of 2 different protein bands

spot No.	Protein	Accession No.	kDa	pI
No.1	aryl-alcohol oxidase precursor [<i>Pleurotus eryngii</i>]	gi 3851524	63.71	4.8
	aryl-alcohol oxidase precursor [<i>Pleurotus pulmonarius</i>]	gi 6906855	63.64	4.8
	B Chain B, Crystal Structure Of Aryl-Alcohol-Oxidase From <i>Pleurotus Eryngii</i>	gi 262367890	60.93	4.7
	aryl-alcohol oxidase [<i>Pleurotus eryngii</i>]	gi 289655795	63.62	4.8
	aryl-alcohol oxidase precursor [<i>Pleurotus pulmonarius</i>]	gi 6906855	63.64	4.8
	aryl-alcohol oxidase [<i>Pleurotus eryngii</i>]	gi 289655795	63.62	4.8
No. 2	laccase 6 [<i>Pleurotus pulmonarius</i>]	gi 61224796	57.4	5.7
	laccase [<i>Pleurotus ostreatus</i>]	gi 15594026	57.39	5.7
	laccase 3 [<i>Pleurotus sajor-caju</i>]	gi 32399645	57.51	5.6
	laccase 2 [<i>Pleurotus sapidus</i>]	gi 67508841	57.43	5.5

(4) 원기형성 분비물 단백질에 대한 부분 유전자 확보 및 염기서열 분석

원기형성 분비물 단백질의 2D 분석 결과 Table 26에서 보는 바와 같이 Laccase 단백질인 것으로 확인되었다. Genebank에 등재되어 있는 새송이버섯 Laccase 단백질의 아미노산 서열과 유사성을 확인하기 위하여 alignment 한 결과, CAF-MALDI sequencing에 의해 얻어진 서열 (LPANKLIEVSIPGAGAHPF HLHGHTFDIVRVSNDS)은 다른 종의 새송이버섯 유래 laccase 단백질의 아미노산 서열들 pel_zjw_nt (GU480806.1), pel_1_zhang (GU953215.1), pel_3_3460_nt (AY686700.1), pel_4_1602_nt (DQ234990.1)과 높은 유사성 (녹색 부분)을 갖는 것으로 확인하였다 (Fig. 31). 따라서 SDS-PAGE에서 확인된 (Fig. 30) No. 2 band는 분자량 및 아미노산 서열이 새송이버섯 유래 laccase와 높은 유사성을 가지며 단백질이 균사체 내부에서 합성되어 원기형성 시기에 바깥으로 분비된 것으로 판단되어 진다.

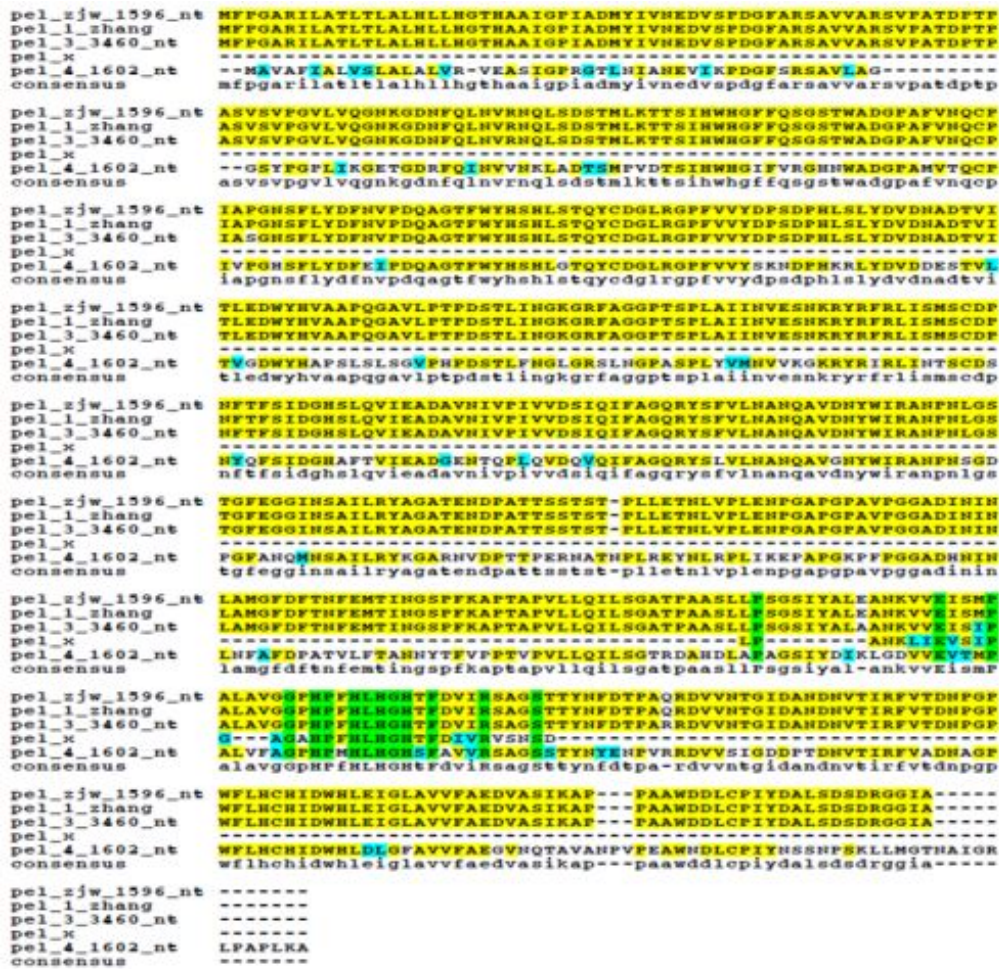


Fig. 31. Alignment of amino acid sequences between various laccase proteins and pel-x. pel_zjw_nt (GU480806.1): *Pleurotus eryngii* laccase mRNA, complete CDs ; pel_1_zhang (GU953215.1): *Pleurotus eryngii* laccase genomic DNA ; pel_3_3460_nt (AY686700.1): *Pleurotus eryngii* laccase precursor (pel3) gene ; pel_4_1602_nt (DQ234990.1): *Pleurotus eryngii* laccase precursor (pel4) mRNA

gactggccgtaagcacaggagcgtcttgcgcaccctgcatcaacgttggcgtagcgtag -660
MREs
cgacgaagcatggccttcccgaacttacgacgaaggcagagatggcgcagatggtgatgat -600
gagcgacttgaacatgtttgggggtagagtggtgggtgtactttgggcottgaattga -540
tcgcacacagcttatatgtaagtctcttcgaaatattggtcatttctggaacctaaagaac -480
tcctttctgattagtgcatccctcgcctcccgccctccgcagtaaccgaagtctggactcccc -420
gattgagctggtgacttgcgggtgtagatctgcatccatgtcacaacatagataccaggt -360
copper-sensing sequence
cacacctttttgtccaccagatataccataccaacgccatgaaaggaagcaacttcagatc -300
tatttgcctcggtagcctcatggactcttcttctgtatccccgaatacatccaggcactg -240
MREs
caactccctcgcagacgatcatcgcctccctcatggcaaacagggtttctaagaacaccagcc -180
gattcgtttcaagatactcgagatgaggcaccgctaaccgaagcttctaatccattcgt -120
cttcattctcatgcatcgaactcgaactttagatgtatttaagaacctgactgatgattgcaaa -60
cagcatcgacctccaattatttaacacctcatccaccgctaactgctacacctacaacg -1
M F P G A R I L A T L T L A L H L L H G 20
atgtttccaggcgcacggattctcgcctacgcttacattagctcttcaccttttacatggc 60
T H A A I G P I A D M Y I V N E D V S P 40
actcatgctgccatcgggcccattgcccacatgtacatcgtcaacgaggacgtctctcct 120
D G F A R S A V V A R S V P A T D P T P 60
gacggcttcgcctcgttcggctgtcgtcgcctcgtgtgccggccacagaccgcagccct 180
A S V S V P G V L V Q G N K G D N F Q L 80
gcgtcggtatcggttcctcgtcgtcgtgcaaggaacaagggcgataactttcagctg 240
N V R N Q L S D S T M L K T T S I H W H 100
aacgttcgcaatcaactgtcggactcgaactatgttgaagactactagtatccattggcat 300
G F F Q S G S T W A D G P A F V N Q C P 120
ggcttctttcaatccggctctacgtgggcagatggaccocgcttctgtaatcagtgcoccc 360
I A S G N S F L Y D F N V P D Q A G T F 140
atgcctcggggaatagcttctatatactttaacgttcccgaccaagctggcacgttc 420
W Y H S H L S T Q Y C D G L R G P F V V 160
tggtaccattcgcactctttccaccocagattgtgatggtcttagaggaccattcgtagta 480
Y D P S D P H L S L Y D V D N A D T V I 180
tacgatccctccgatccccacctgtccttatatgacgttgacaacgccgacactgtcatt 540
T L E D W Y H V A A P Q G A V L P T P D 200
acacttgaagattggtaccacgttgcggccctcagggtgcagtgcttctactcctgat 600
S T L I N G K G R F A G G P T S P L A I 220
agcacgctcatcaatggtaaaggtcgttcgcggggggccgacttcccccttggctatc 660

I N V E S N K R Y R F R L I S M S C D P	240
atcaacgtcgaagcaacaagcgatatcgtttccgacttatctcgatgtcttgggacccc	720
N F T F S I D G H S L Q V I E A D A V N	260
aatttcaogttotcaatcgacggtoactotttgcaggtoattgaagcagatgotgtcaat	780
I V P I V V D S I Q I F A G Q R Y S F V	280
attgtgoccatogtctgtggatagtagtattcaaatcttcggggccaacgctattctttcgtc	840
L N A N Q A V D N Y W I R A N P N L G S	300
ctgaatgccaatcaggctgttgacaattattggattcggcgaatcccaacttgggatcg	900
T G F E G G I N S A I L R Y A G A T E N	320
actggcttogaaggtggtatttaattocgctatccttcggatgctggtgocactgaaat	960
D P A T T S S T S T P L L E T N L V P L	340
gaccctgccaagacttctgacgagcactccccttctggagactaatcttgtgocactc	1020
E N P G A P G P A V P G G A D I N I N L	360
gaaaatcctgggtgctcctggctcagctgtccctggaggcgcagacatcaacatcaatctt	1080
A M G F D F T N F E M T I N G S P F K A	380
gctatgggcttgcactttaactttgaaatgaccatcaacggttcccccttcaaagca	1140
P T A P V L L Q I L S G A T P A A S L L	400
ccaactgctcctgttctgctcagattctgtcaggtgctacgcctgcogcttgccttctt	1200
P S G S I Y A L A A N K V V E I S I P A	420
ccttcaggtagtagtatacgcgtagcagccaacaaagctcgaatctccataccccgc	1260
L A V G G P H P F H L H G H T F D V I R	440
ttagctgtcggaggaccgcatcctttccatcttcaocggacacacgcttgcagctcatcagg	1320
S A G S T T Y N F D T P A R R D V V N T	460
agtgcgggctctactacgtataacttcgacaccctgcgcgacgcgatgttgcacact	1380
G I D A N D N V T I R F V T D N P G P W	480
ggaattgacgcgaacgacaacgttaaccatccgcttctgacggataatccgggoccatgg	1440
F L H C H I D W H L E I G L A V V F A E	500
ttcctcactgocacattgactggcatctcgaatcggctcgcggctcgttttcgocgaa	1500
D V A S I K A P P A A W D D L C P I Y D	520
gatgtggcgtccatcaaggccccgcctgcccgcgtgggacgacttgtgtcogatttatgat	1560
A L S D S D R G G I A *	531
gctttgagcgattcgcacagaggtggcatagcttag	1596

Fig. 32. Nucleotide and amino acid sequences of laccase mRNA from *Pleurotus eryngii* (pel_zjw_nt and pel_3_3460_nt).

Laccase 유전자의 아미노산 및 염기서열은 Fig. 32에 보는 바와 같고, genomic DNA는 3,460 nt로 구성되며, CDS는 1596 nt, 또한 전체 아미노산은 531개이며 그 중 신호서열 (yellow color)은 23개의 아미노산으로 구성된 단백질이다 (oxidoreductase or blue copper oxidase). 5'-flanking region에는 promoter (green color) 및 전사관련 transcription factor들이 결합하는 여러 부위, 즉 copper-sensing sequence 및 copper-response element, putative metal response elements (MREs) 등이 존재한다.

아. 원기형성 분비물 단백질에 대한 유전자 확보

(1) Laccase 유전자의 PCR 증폭

Fig. 32에 보여지는 laccase 유전자의 염기서열을 참고로 하여 full-length DNA를 확보하기 보다는 분비백터 제조를 위하여 필요로 하는 laccase promoter 및 laccase 신호서열(같은 exon내에 존재)을 확보하기 위하여 아래와 같은 2 set의 PCR primer를 제작하여 lactose promoter + 신호서열, 또는 신호서열에만 해당되는 coding region을 부분 증폭하였다.

- Laccase Promoter + signal sequence

lac Pro-F (*NdeI*):

5' GGGG **CATATG** AAG AAG CAC TTT GAG TCT ATT TCG 3'

lac sig-R (*EcoRI*):

5' CCCC **GAATTC** GGC AGC GTG AGT GCC ATG 3'

- Laccase signal sequence

lac sig-F (*BamHI*):

5' GGGG **GGATCC** ATG TTT CCA GGC GCA CGG 3'

lac sig-R (*EcoRI*):

5' CCCC **GAATTC** GGC AGC GTG AGT GCC ATG 3'

PCR 증폭의 주형으로는 구성된 total genomic library DNA를 사용하였고, Takara extaq (RR001A) polymerase로 95°C-5 min (1 cycle), 95°C-1 min, 50°C-30 sec, 72°C-1.5 min (30 cycles), 72°C-5 min (1 cycle) 조건하에서 증폭한 결과 Fig. 30에서 보는 바와 같이 laccase promoter 및 laccase 신호서열의 경우 455 bp와 laccase 신호서열의 경우 69 bp의 DNA fragment들이 증폭되었다.

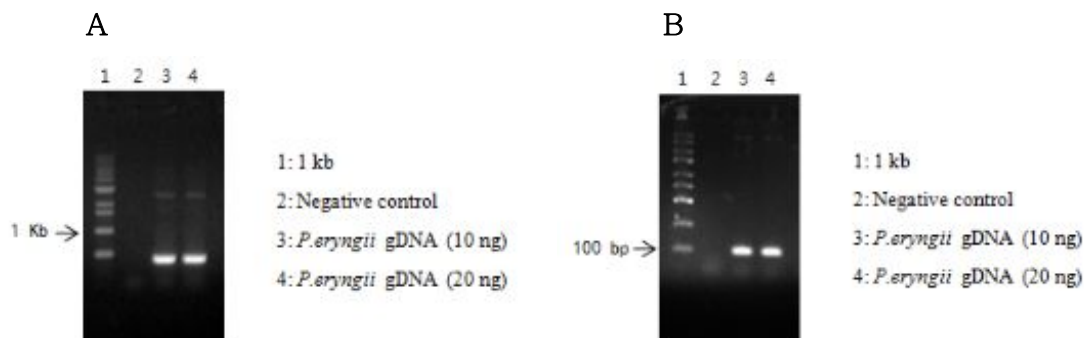
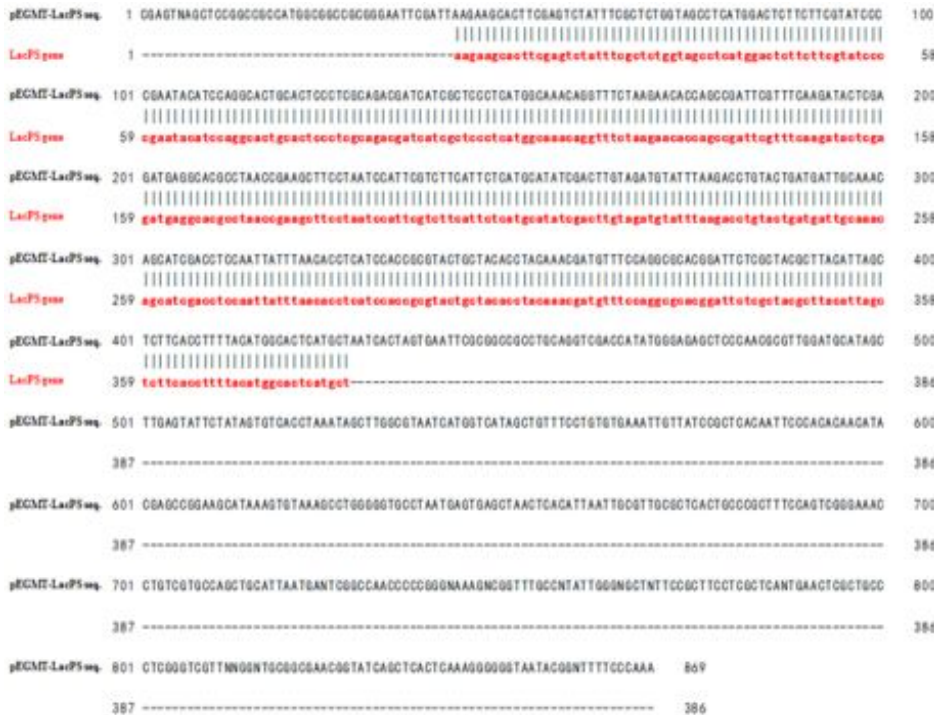


Fig. 33. Amplification of Laccase partial genes containing laccase promoter and signal sequence using specific primer set. (A) Laccase promoter and laccase signal sequence (B) Laccase signal sequence.

(2) Laccase 유전자의 염기서열 분석

PCR에 의해 증폭된 DNA fragment는 pGEM-Teasy vector에 클로닝하여 T7 primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 분석 결과 Fig. 34에서 보는 바와 같이 original laccase 서열과 정확하게 일치하는 것으로 확인하였다. 이렇게 확인된 2 종류의 부분 유전자들은 사용 목적에 맞는 분비백터 구성에 사용하였다.

A



B



Fig. 34. Sequencing analysis of PCR-amplified laccase promoter and signal sequence region. (A) Laccase promoter and signal sequence, (B) Signal sequence. Red color indicates sequences confirmed by DNA sequencing.

자. Fungal 및 Plant Vector를 이용한 secretion vector 구성

우선적으로 분비벡터를 구성하기 전에 식물에서 외래 유전자 발현에 많이 사용하는 CaMV S35 promoter를 갖는 pPEV 벡터와 이미 알려져 있는 신호서열 (pathogenesis-related protein 1b) 및 본 연구의 대상 유용 유전자인 human growth hormone 유전자를 사용하여 재조합벡터를 구성한 다음, 새송이버섯 균사체에서 발현 및 분비가 가능한 지 알아보기 위하여 다음과 같은 내용으로 선행적 연구를 수행하였다.

(1) 식물벡터 pPEV에서 human growth hormone 유전자의 발현 및 분비

(가) 분비벡터 pPEVpR1b 구성

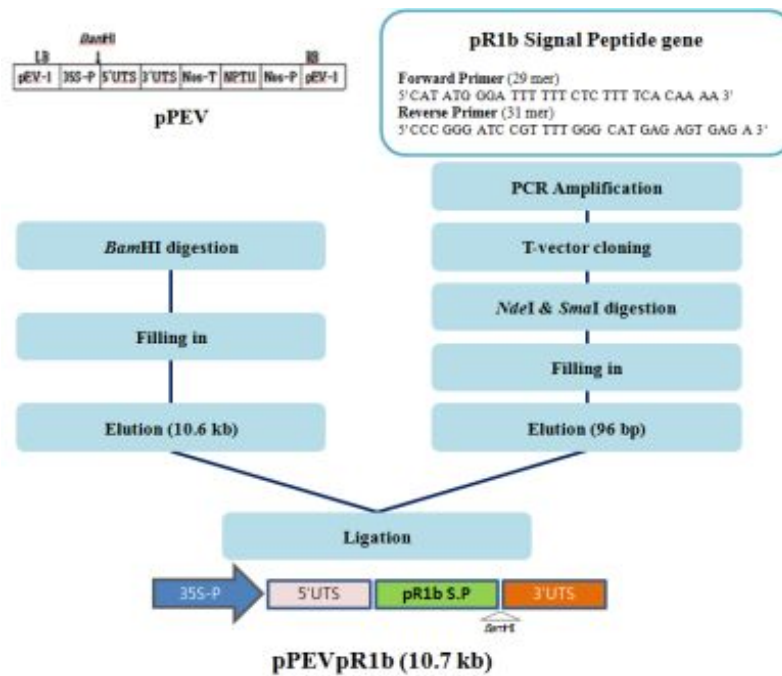


Fig. 35. Construction of pPEVpR1b secretion vector containing CaMV S35 promoter and signal sequence of pathogenesis-related protein 1b.

Fig. 35에서 보는 바와 같이 식물벡터인 pPEV vector (10.6 kb)에 pathogenesis-related protein 1b (pR1b) signal sequence (96 bp)를 도입하기 위해 pPEV vector는 *Bam*HI 제한효소로 절단하고 subcloning 되어 있는 pR1b signal sequence (pEGMT-pR1b)는 *Nde*I과 *Sma*I 제한효소로 절단한 다음, 각각의 DNA에 Klenow 효소를 처리하여 3'-말단 부위를 blunt화 하여 ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 pPEVpR1b 분비벡터 (10.7 kb)를 screening 하였다.

(나) 분비벡터 pPEVpR1b에 human growth hormone 유전자의 도입

A

```

M A A G S R T S L L L A F G L L C L S W 20
ATGGCTGCAGGGCTCCGGACGTCCTGCTGCTGGCTTTTGGCTGCTCGCCTGTCTGG 60

L Q E G S A F P T I P L S R L F D N A M 40
CTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACGATTCCCTTATCCAGGCTTTTGAACAAGCTATG 120

L R A R R L Y Q L A Y D T Y Q E F E E A 60
CTCCGCGCCGCTCGCCTGTACCAAGCTGGCATATGACACCTATCAGGAGTTTGAAGAAGCC 180

Y I L K E Q K Y S F L Q N P Q T S L C F 80
TATATCCTGAAGGAGCAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCGAGACCTCCCTGCTGCTTC 240

S E S I P T P S N R V K T Q Q K S N L E 100
TCAGAGTCTATTCCAAACACCTTCCAACAGGGTGAAAACGACAGCAGAAATCTAACCTAGAG 300

L L R I S L L L I Q S W L E P V Q L L R 120
CTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGAGCCGCTGCAGCTCCTCAGG 360

S V F A N S L V Y G A S D S N V Y R H L 140
AGCGTCTCCGCAACAGCCTGGTGTATGGCGCTGGACAGCAAGTCTATCGCCACCTG 420

K D L E E G I Q T L M W R L E D G S P R 160
AAGGACCTAGAGGAAAGGCATCAAACGCTGATGTGGAGGCTGGAAAGATGGCAGCCCCCG 480

T G Q I F N Q S Y S K F D T K S H N D D 180
ACTGGGCGAGTCTTCAATCAGTCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACACGATGAC 540

A L L K N Y G L L Y C F R K D M D K V E 200
GCAGTGTCAAGAACTACGGGCTGCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAG 600

T F L R I V Q C R S V E G S C G F * 217
AGATTCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAG 654
    
```

B

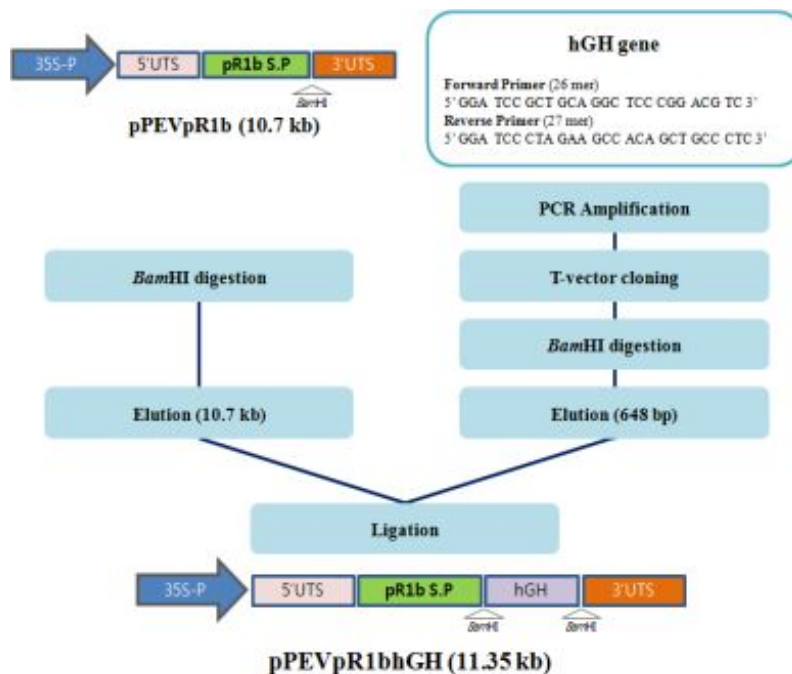


Fig. 36. Cloning strategy for the construction of recombinant pPEVpR1bhGH vector (B) and nucleotide sequence of human growth hormone gene (A)

Human growth hormone (hGH) 유전자를 pPEVpR1b 분비벡터로 도입하기 위하여 Fig. 36에서 보는 바와 같이 분비벡터는 *Bam*HI으로 자르고, 이미 증폭되어 subcloning 되어 있는 hGH 유전자도 마찬가지로 *Bam*HI으로 잘라 약 0.65 kb fragment를 얻은 다음 ligation 하여 대장균에 도입한 후 right clone을 screening 하였다. 구성된 재조합벡터는 최종적으로 염기서열 분석에 의해 신호서열 및 hGH 유전자들이 정확하게 in frame하에서 결합하였는지 확인하였다 (Fig. 37).

```

- pPEV + pR1b signal sequence
- human growth hormone
- hGH-F (BamHI) 5' GGA TCC GCT GCA GGC TCC CGG ACG TC 3' (26 mer)
- hGH-R (BamHI) 5' GGA TCC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3' (27 mer)

NNNNNTNAATCTATCTCTCTATAAGGATCT → pPEV Vector

ATGGGATTTTTCTCTTTTCACAAATGCCCTCATTTTTTCTTGCTCTACACTTCTTATTCTAATAATATCTCAC
TCTTCTCATGCCAAAAC → pR1b signal sequence

GGATCCGCTGCAGGCTCCCGGACGTCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCTCCTGGCTTCAAGAGG
BamHI hGH-F (BamHI)
GCAAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTATCCAGGCTTTTGGACAACGCTATGCTCCGCGCCCGCTGCCTGTACCAG
CTGGCATATGACACCTATCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCTGAAGGAGCAGAAGTATTCTTCTGCAGA
ACCCCCAGACCTCCCTCTGCTTCTCAGAGTCTATTCCAACACCTTCCAACAGGGTGAAAACGCAGCAGAAAATC
TAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGAGCCCGTGCAGCTCCTCAGGAGC
GTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTATGGCGCTCGGACAGCAACGCTATCGCCACCTGAAGGACCTAGAGGAA
GGCATCCAAACCGCTGATGTGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAATCAGTCTAC
AGCAAGTTTGACACAAAATCGCACACGATGACGCACTGCTCAAGAAGTACGGGCTGCTACTGCTTTCAGG
AAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCTCGGCATCGTGCAGTGGCGCTGTG GAGGGCAGCTGTGGCTTC
TAGGGATCC → hGH BamHI hGH-R (BamHI)

CGATCCTAATGTGTGAGTAGTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCAT
ATAAGAAACCCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTCCTAAAACAAAAAT
CCAGTACTAAAATCCAGATCCCCGGGTACNGAGCTCGAATTCCTCCGATCTAGTAACATAGATGACACCCGCGCGC
GATAATTTATCCTAGTTTGGCGGCTATATTTGNTTCTATCGCGTAATAAATGTATAATTGCGGG

```

Fig. 37. Confirmation of DNA sequences of pR1b signal and human growth hormone gene cloned into pPEVpR1bhGH vector

(다) Fungal transformation

구성된 pPEVpR1bhGH vector는 대장균에 도입하여 다량 확보한 다음 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 LBA4404에 형질전환 하여 재조합 pPEVpR1bhGH vector가 도입된 *Agrobacterium* 균주를 screening 하였다. 버섯에서 형질전환 방법 중 제일 형질전환 효율이 좋았던 “상해를 이용한 *Agrobacterium* 형질전환법”을 사용하여 새송이버섯 균사체로 형질전환하고 kanamycin 포함 선택배지에서 selection에 의해 재조합 벡터가 도입된 새송이버섯 형질전환체를 여러 주 선발하였다. 올바른 형질전환체의 선별은 균사체를 다시 배양하여 균사체로부터 genomic DNA를 추출 한 다음 (Fig. 38 & Fig. 39A.), hGH-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 유전자를 확인하였다 (Fig. 39B).

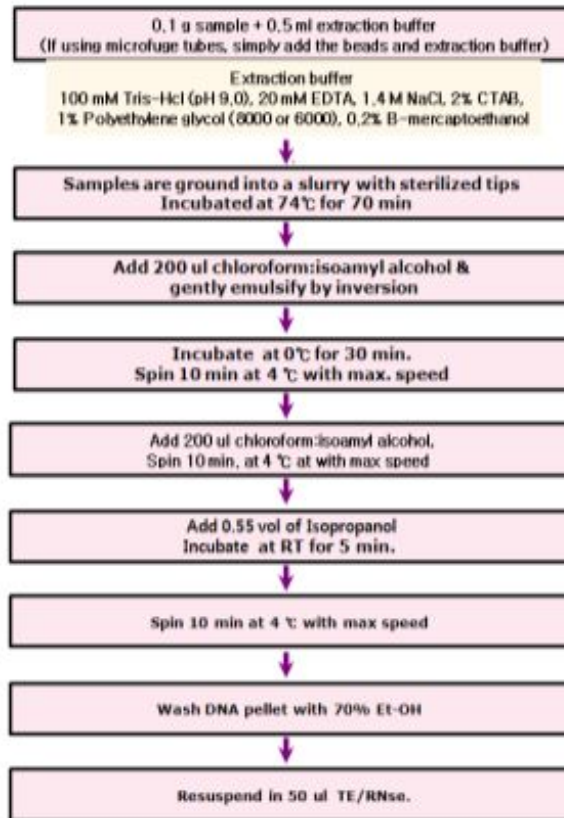


Fig. 38. Protocol for extraction of genomic DNA from Fungi.

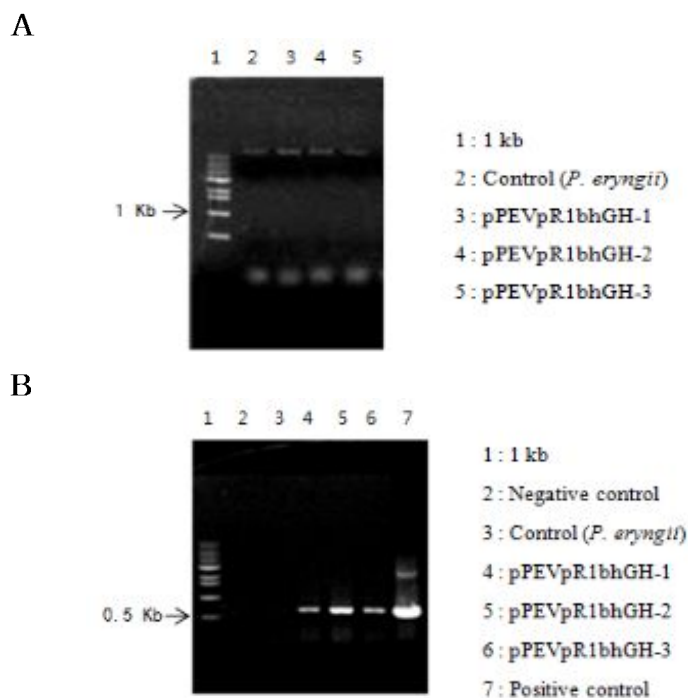


Fig. 39. PCR screening of the hGH gene from mycelium of *P. eryngii* containing pPEVpR1bhGH vector. Genomic DNA of transformants (A) and the hGH gene were confirmed by PCR amplification using hGH-specific primer set (B).

(라) 새송이버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현

pPEVpR1bhGH vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 배양하면서 5, 6, 7일째 되는 날마다 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. 발효액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western 분석 결과 발효액에는 hGH가 분비되지 않았다. 그러나 균사체 단백질 시료를 SDS-PAGE를 통하여 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색한 결과 Fig. 40에서 보는바와 같이 약 23 kDa 정도 위치에서 발현된 hGH 밴드를 확인 할 수 있었다. SDS-PAGE gel 위에 분리된 단백질을 PVDF membrane에 transfer 한 후 2.5% skim milk (in TBST)로 blocking 하여 비특이적 반응을 차단하고 hGH 단백질에 특이성을 갖는 1차 항체를 처리한 다음, 1차 항체에 특이성을 가지면서 발색효소를 갖는 2차 항체를 처리한 후, 2차 항체에 결합된 효소의 기질로서 발색물질을 처리하여 hGH 항체에 특이성을 가지는 단백질을 분석하였다. 그 결과 SDS-PAGE hGH band 위치와 동일한 위치에서 특이성을 가지는 hGH 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. 발현된 단백질 농도는 이미지 분석기로 측정하여 총 단백질에 대한 % 비율로 나타내었다. 그 결과 Fig. 40에서 보는 것처럼 pPEVpR1bhGH vector가 도입되지 않은 새송이버섯 균사체에서는 hGH 단백질을 생산하지 않았지만, 도입된 형질전환체는 배양기간에 따라 총 단백질 중 26.3%(5일째), 26.7%(6일째), 27.2%(7일째)의 hGH 단백질을 생산하는 것으로 분석되었다.

새송이버섯 균사체로 도입되어 발현된 hGH 단백질은 mature form이 191 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량이 21 kDa 정도의 크기이다. 그러나 SDS-PAGE 상에서 나타난 밴드의 위치는 약 23 kDa 위치인 것으로 보아 hGH 유전자 앞에 붙어있는 pR1b signal sequence (32 아미노산)가 균사체내에서 적절한 peptidase에 의해 정확하게 processing 되지 않은 것으로 판단된다. 따라서 원기형성 분비 단백질 분석 결과에서 얻어진 laccase promoter 및 laccase 신호서열을 도입하여 분비백터를 제조하였다.

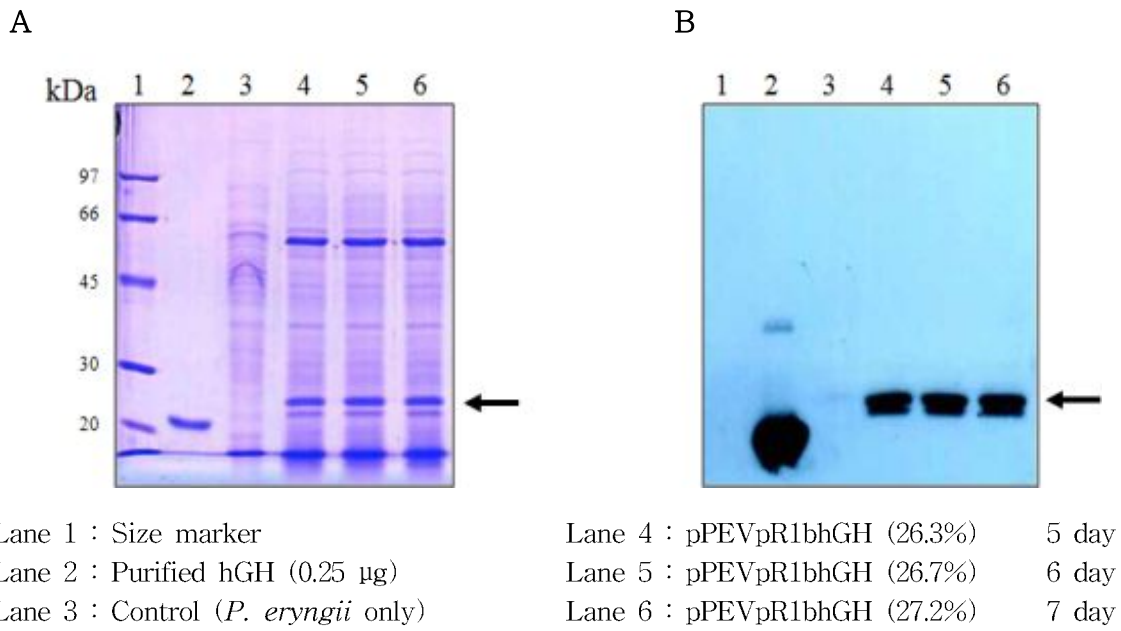


Fig. 40. Expression of the hGH from *P. eryngii* mycelia harboring pPEVpR1bhGH vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

(2) Fungal vector인 pBARGPE1 vector를 이용한 분비벡터 제조
 (가) 분비벡터 구성의 전체 전략

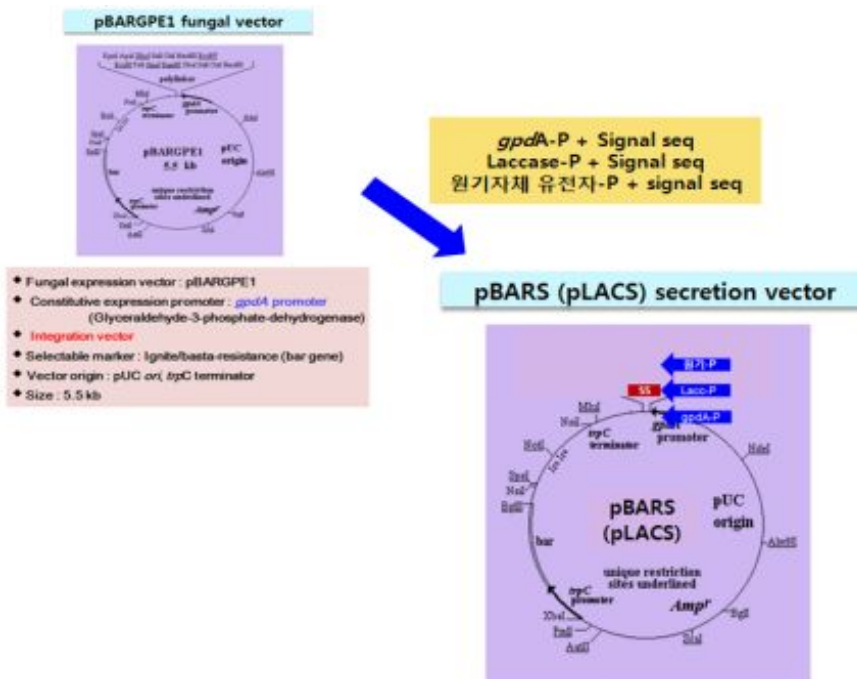


Fig. 41. Construction strategy of various secretion vectors.

기본적인 fungal 벡터인 pBARGPE1 vector를 사용하여 자체 promoter (*gpdA* promoter)와 원기단백질로부터 분리된 여러 신호서열, 또는 laccase promoter와 여러 신호서열 및 다른 원기단백질 promoter와 여러 신호서열 등의 조합으로 분비벡터를 제조하고 여러 유용 유전자들을 도입하여 단백질 발현 및 분비에 최적의 분비 vector를 구성하려한다 (Fig. 41). 새송이버섯에 재조합 벡터의 도입은 “상해를 이용한 *Agrobacterium* 형질전환법”을 사용하며 형질전환체 selection은 Phosphinothricin (100 - 300 ug/ml)에 의해 선별하고, 필요에 따라서는 pCAMBIA1300 vector내에 있는 hygromycin 저항성 유전자를 도입하여 형질전환체 선발이 용이하도록 한다.

(나) pBARGPE1 vector로 laccase promoter 및 signal sequence 도입

Fig. 42의 클로닝 전략에 따라 Fungal vector인 pBARGPE1 vector (5.5 kb)에 laccase promoter (317 bp)와 signal sequence (69 bp) DNA fragment를 도입하기 위해 *NdeI*과 *EcoRI* 제한효소로 절단하여 각각 4.4 kb (자체 promoter인 *gpdA* promoter 제거: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 와 386 bp의 유전자를 얻었다. 이를 ligase 효소를 사용하여 결합시킨 후 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 pBARGPE1LacPS vector (4.79 kb)를 구성하였다. 즉, Fig. 39에 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열을 증폭할 수 있는 primer를 사용하여 PCR하여 386 bp DNA fragment를 얻은 후, T-vector로 클로닝한 다음, screening하여 올바르게 도입된 pGEMT-lacPS-3 클론을 얻었다 (Fig. 43). Laccase promoter와 신호서열을 갖는 분비벡터를 구성하기 위하여 우선 pBARGPE1 vector를 *NdeI*과 *EcoRI* 제한효소로 절단하여 자체 promoter인 *gpdA* promoter가 제거된 4.4 kb 크기의 vector를 확보하고, 위에서 얻어진 pGEMT-lacPS-3를 같은 제한효소로 잘라 전기영동에 의해 elution하여 linearized vector와 ligation 하여 대장균에 형질전환 하였다. Fig. 41에서 보는 바와 같이 형질전환체 pBARGPE1LacPS1-8번까지의 positive 클론들을 얻었고, *NdeI*과 *EcoRI* 제한효소로 절단하여 도입된 약 0.4 kb의 insert DNA를 확인하였다 (Fig. 44). 이렇게 얻어진 분비벡터는 상기와 같이 pBARGPE1LacPS 벡터로 명명하였다.

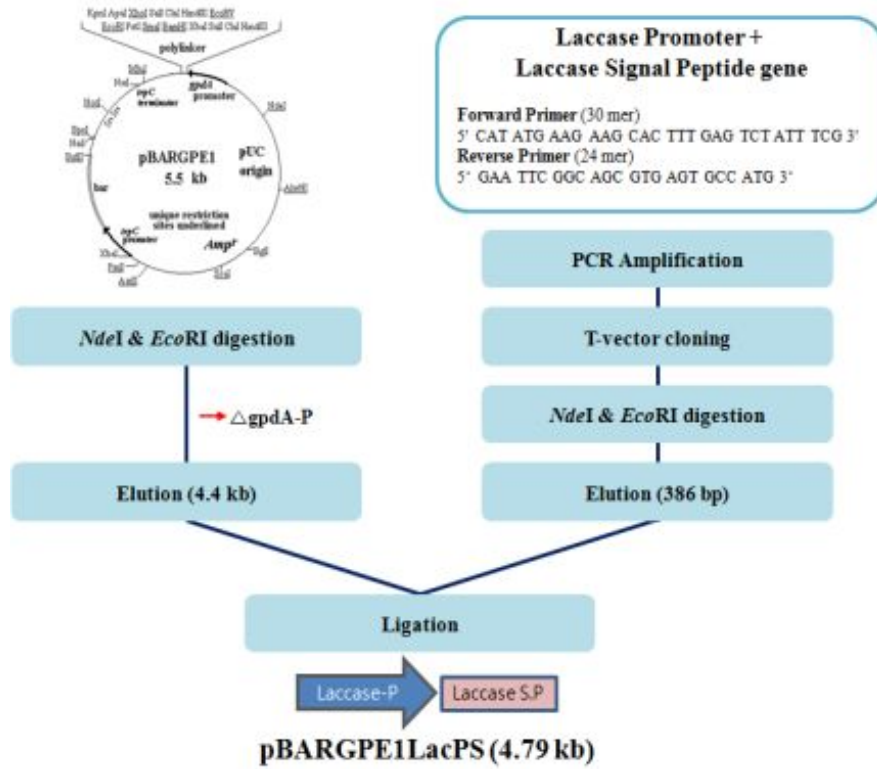


Fig. 42. Construction strategy of pBARGPE1LacPS secretion vector.

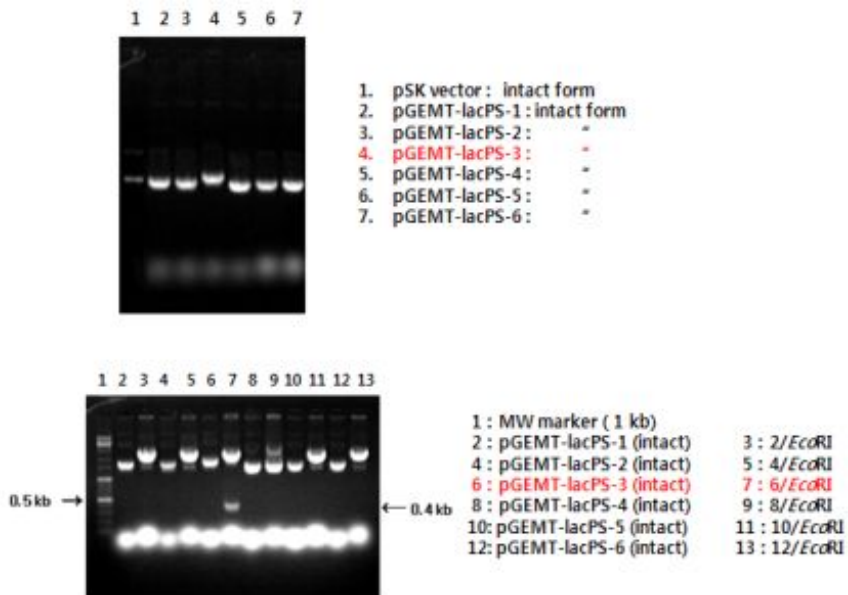


Fig. 43. Amplification of laccase promoter and signal sequence region and Its cloning in pGEM-T vector.

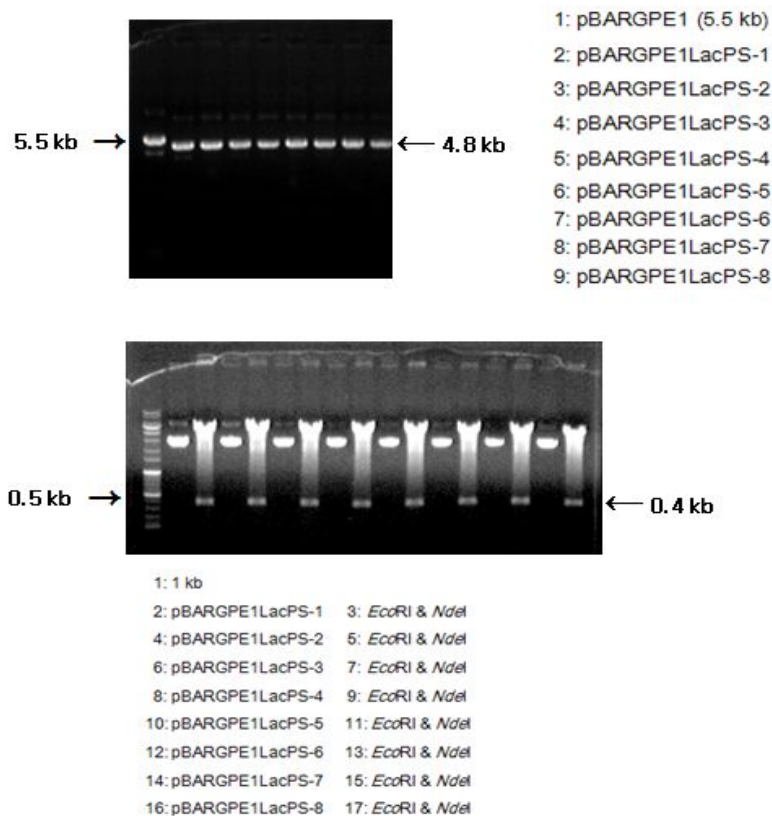


Fig. 44. Construction of fungal secretion vector containing laccase promoter and signal sequence, pBARGPE1LacPS.

(다) pBARGPE1 vector로 laccase signal sequence 도입

또 다른 종류의 분비벡터를 제조하기 위하여 pBARGPE1 vector (5.5 kb) 자체 promoter인 *gpdA* promoter (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter)를 이용하여, laccase promoter를 제외한 signal peptide (69 bp) 유전자만 도입하였다. Fig 45에서 보는 바와 같이 vector 및 insert DNA를 *Bam*HI과 *Eco*RI 제한효소로 절단하여 각각 5.5 kb와 69 bp의 유전자를 얻었다. 이를 ligase 효소를 사용하여 결합시킨 후 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 putative transformants를 얻었고, right 클론들의 확인은 유전자 크기 비교, 제한효소 처리, pPEV-F 프라이머 (5'CATTTGGAGAGGACACGCTGAA 3')를 사용한 PCR 등으로 선별하여 최종적으로는 염기서열 분석에 의해 확인하였다. 이렇게 얻어진 분비벡터는 pBARGPE1LacS vector (5.57 kb)로 명명하였다.

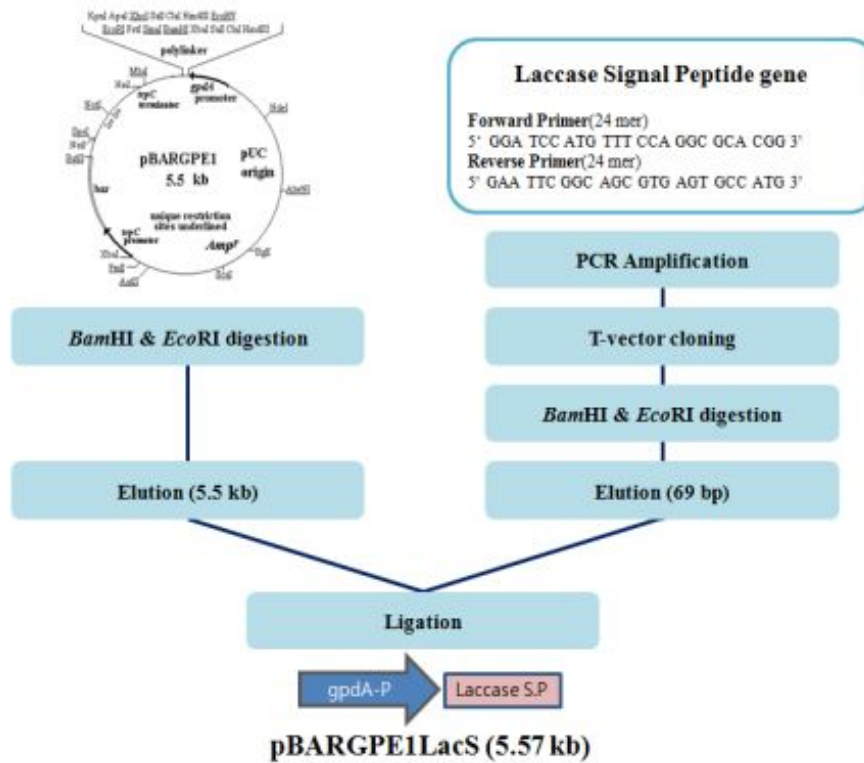


Fig. 45. Construction of fungal secretion vector containing *gpdA* promoter and signal sequence, pBARGPE1LacS.

(3) Fungal vector인 pCAMBIA1302 vector를 이용한 분비백터 제조

형질전환 및 재조합 발현백터 제조를 위하여 fungus 특이 프로모터를 사용하는 발현 백터 pBARGPE1 vector, 식물조직 특이 프로모터인 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter를 갖는 pPEV vector, hygromycin 선택마커를 갖는 pCAMBIA1302 vector을 실험 목적에 맞게 사용하였다 (Fig. 46). promoter searching 및 효율적인 분비서열을 조사하기 위하여 선발마커로 hygromycine-resistant 유전자를 갖고, target 유전자로서 GFP (Green fluorescent protein) 유전자를 갖는 pCAMBIA1302 vector를 사용하여 실험을 수행하였다.

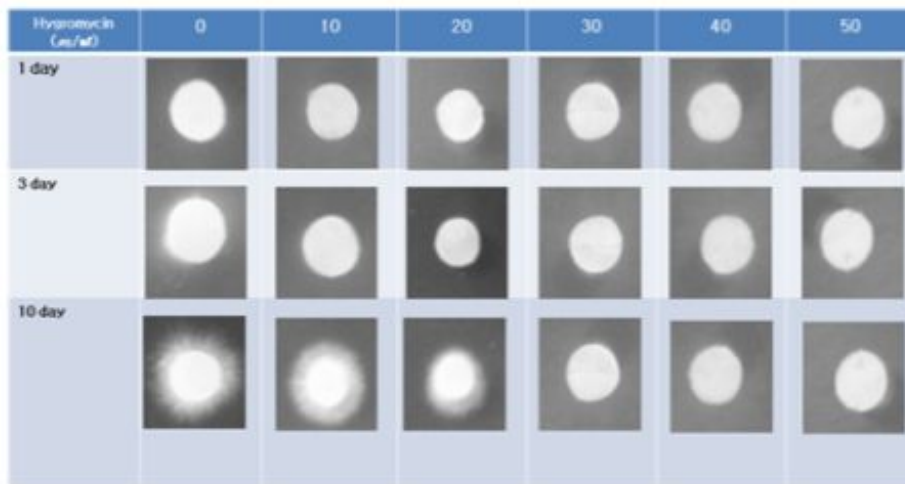


Fig. 47. Hygromycin resistance test of *Pleurotus eryngii* on MCM agar medium containing various concentrations of hygromycin.

차. 새송이버섯에서 사용되는 목적단백질 현황

유용유전자		
GFP		
EPO		
EGF		
CSF		
hGH		
혈전용해제		
Surfactant		

카. Promoter 및 분비서열을 포함하는 벡터 구성 및 Green fluorescent protein 발현

Green fluorescent protein (GFP)을 reporter gene으로 사용하여 promoter의 strength 및 적합한 분비서열 조합을 조사하기 위하여, CaMV 35S promoter, laccase promoter (자실체 형성 초기의 분비물에 많은 양 분비되는 laccase 단백질), PR1b (pathogen related protein) signal sequence, 및 laccase signal sequence 등을 사용하여 여러 종류의 재조합 벡터를 구성하고, GFP의 세기에 따라 가장 효율적인 promoter 및 신호서열을 선별하고 목적단백질 유전자를 도입하여 재조합벡터를 구성한 다음, 새송이버섯에 도입하여 얻어진 형질전환체로부터 목적단백질을 대량생산 할 수 있는 시스템을 구축하려 하는 것이 본 연구의 최종목표라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 목적단백질 생산을 위한 최적의 promoter 및 분비서열을 선택하여 재조합 (분비)벡터를 구성하고, 목적단백질 유전자를 클로닝하여 intracellular & extracellular 발현을 통하여 산업적으로 유용한 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 시스템을 구축하려 한다. 전체적으로 사용한 핵심적인 방법에 대하여 정리하면 다음과 같다.

재조합 유전자 벡터의 제조 : Sambrook *et al* (1989) 방법에 따라 실험을 수행하였다.

: pCambia1302 벡터에 CaMV 35S promoter, laccase promoter (자실체 형성 초기의 분비물에 많은 양 분비되는 laccase 단백질), PR1b (pathogen related protein) signal sequence, 및 laccase signal sequence 등을 Sam Brook 등 (1989)의 방법에 따라 pCambia벡터와 프로모터 및 신호서열 DNA 단편을 ligation 하여 라이게이션 반응액을 대장균(*E. coli* XL-1 Blue MRF')에 형질전환 하였다. LB 배지에 접종한 *E. coli* XL-1 Blue MRF'를 600 nm에서 흡광도가 약 0.5가 될 때까지 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 배양하고, 6,500 rpm으로 10 분간 원심분리하여 대장균을 회수한 다음, washing buffer (0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-Cl, pH 7.5)로 세척하고, 차가운 CaCl₂ 용액(75 mM CaCl₂, 0.25 M KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-Cl, pH 7.5)에 20 분간 방치한 후 얻어진 대장균을 약 1 ml의 차가운 CaCl₂ 용액에 잘 현탁하여 얼음에서 30분 동안 방치하였다. 대장균 현탁액 100 μ l에 상기의 방법으로 각각 제조한 라이게이션 반응액을 잘 혼합하여 주고, 얼음에서 60분 동안 방치하고 42°C에서 90 초 동안 열 충격을 가한 후 얼음에서 2분 동안 방치하였다. 이 반응액에 0.9 ml의 LB 배지를 가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하고, 이 용액 0.3 ml을 50 μ g/ml의 kanamycin을 포함하는 LB 한천 배지에 도말하고 37°C에서 하루 동안 배양하여 colony가 생성되도록 하였다. 선별된 콜로니로부터 알카리 분해법으로 재조합 벡터를 분리하고, PCR을 이용하여 각각 도입된 유전자의 증폭된 DNA 밴드를 확인하였으며

염기서열 분석에 의해 최종적으로 확인된 재조합 벡터를 pCam35S, pCam35SPR1b, pCam35SLacS, pCamLacP, pCamLacPpR1b, pCamLacPS로 각각 명명하였다.

아그로박테리움의 형질전환 : Holster *et al.*, (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163: 181-187.

: 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)에 재조합된 vector (pCam35S, pCam35SPR1b, pCam35SLacS, pCamLacP, pCamLacPpR1b 와 pCamLacPS)를 도입시키기 위하여 아그로박테리움에 의한 형질전환 방법을 사용하였다. YEP 배지(1% Bacto tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl)에 접종한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 600 nm에서 흡광도가 약 0.5 가 될 때까지 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 배양하고, 배양액을 얼음에서 10분간 방치하여 냉각시켰다. 3500 rpm으로 10분간 원심분리하여 균을 회수하고 1 ml의 차가운 20 mM CaCl₂ 용액에 잘 현탁하고, 아그로박테리움 현탁액 200 μ l에 상기의 방법으로 각각 제조한 재조합 벡터 용액을 잘 혼합하여 주고, 혼합액을 액체 질소에 방치하여 급속 냉동시킨 후, 얼려진 각 혼합액을 37°C에서 5분 동안 방치하여 녹여 주었다. 그런 후, 혼합액의 10배 부피의 YEP 배지를 가하여 28°C에서 2시간 동안 잘 저어 주면서 균을 배양하였다. 4500 rpm으로 10분간 원심분리하여 균을 회수하고, 균을 0.3 ml의 YEP 배지에 잘 현탁시키고, 이 중 0.1 ml을 취하여 50 μ g/ml의 kanamycin을 포함하는 YEP 한천 배지에 도말하고 37°C에서 하루 동안 배양하여 콜로니(colony)가 생성되도록 하였다. 선별된 콜로니로부터 알카리 분해법으로 각 재조합 벡터를 분리하고, 유전자가 클로닝되어 있는 클론을 확인하였으며, DNA 시퀀싱에 의하여 재조합 벡터에 삽입된 유전자의 서열을 최종적으로 확인되었다.

***Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환** : Michielse *et al.*, (2004). *Mol. Genet. Genomics* 271: 499-510.

: *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 형질전환된 아그로박테리움 LBA4404를 50 μ g/ml의 카나마이신을 포함하는 5 ml의 최소배지(0.2% glucose, 0.205% K₂HPO₄, 0.145% KH₂PO₄, 0.015% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.01% CaCl₂·6H₂O, 0.00025% FeSO₄·7H₂O, 0.05% (NH₄)₂SO₄ 접종하고 28°C에서 2일 동안 잘 저어주면서 배양하였다. 아그로박테리움 배양액을 600 nm에서 흡광도가 약 0.5가 되게 유도배지(induction medium) (10 mM glucose, 0.205% K₂HPO₄, 0.145% KH₂PO₄, 0.015% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.01% CaCl₂·6H₂O, 0.00025% FeSO₄·7H₂O, 0.05% (NH₄)₂SO₄, 0.5% glycerol, 200 μ M acetosyringone, 40 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid)로 희석하고 같은 조건에서 3시간 동안 더 배양하여 준 후, 동일한 부피의 새송이버섯 분생자

현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 혼합하여 주었다(*Eur. Mol. Biol. Organ.*, 1995, 14, 3206-3214). 이 혼합액 200 μ l를 3 MM filter paper에 가하고, 200 μ M의 acetosyringone을 포함하는 유도배지 및 acetosyringone을 포함하지 않는 유도배지에 각각 상기의 이 filter paper를 담가두고 28°C에서 2일 동안 공동배양(co-cultivation)하였다. 각 공동배양 후에, 3 MM filter paper에서 자란 버섯균(새송이버섯; *Pleurotus eryngii*) 및 미생물균(*Agrobacterium tumefaciens*)을 200 μ M cefotaxime을 포함하는 PDA(potato dextrose agar) 배지로 옮겨 아그로박테리움을 죽게 하였다. PDA 배지 상에서 자란 각 형질전환된 새송이버섯의 분생자(conidia)를 멸균수에 현탁하고 200 μ M cefotaxime 및 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 접종하고 28°C에서 100 rpm으로 진탕배양하였다. PDB 배지에서 자란 새송이버섯 형질전환체를 원심분리하여 회수하고, 여러 가지 분석을 위하여 사용하였다. 형질전환 후 선택적 항생제 배지에서 자란 균사체를 두 차례 분리 과정을 거쳐 예상되는 후보 균주를 확보할 수 있었다. 이후 이렇게 선별되어진 균사체의 DNA를 추출 하여 PCR로 2차 분리를 하고 최종 균주를 선별하였다.

염색체 DNA 분석 : Ausubel *et al.*, (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York City, NY: John Wiley & Sons Inc.

: 새송이버섯 형질전환체를 200 μ M cefotaxime 및 50 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지에서 배양하고, 회수한 균사체로부터 염색체 DNA를 변형한 hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB) 방법으로 분리하였다. 새송이버섯 균사체 0.1 g 을 0.5 ml의 DNA extraction buffer (0.1 M Tris-Cl (pH 9), 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 1% polyethylene glycol, 0.2% β -mercaptoethanol)를 가하여 조직을 파쇄하고, 74°C에서 70분간 열처리 하였으며, 200 μ l의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)로 추출하고, 0°C에서 30분간 방치한 후, 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 0.5 volume의 Isopropanol을 가하여 상온에서 5분간 방치한 후, 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전물을 회수하여, 염색체 DNA를 얻었다. DNA 침전물을 RNase A를 포함하는 TE-buffer (Tris-EDTA)에 녹여, PCR의 주형 DNA로 사용하였다. 이 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR 방법으로 GFP 유전자 또는 도입유전자로 형질전환 여부를 확인하였다. 최종적으로 DNA 서열을 분석하여 최종적으로 정확한 서열의 유전자로 형질전환 되었음을 확인하였다.

형광현미경을 이용한 GFP 단백질 발현 확인 : Tsien, R. Y. (1998). *Annu Rev Biochem.* 67, 509-544.

각각의 promoter 및 신호서열로 재조합된 벡터로 형질 전환된 새송이버섯 균사체

의 GFP 발현을 관찰하기 위하여, 신선한 배지에서 성장한 균사체를 0.9% 생리 식염수로 희석한 다음, 슬라이드 글라스에 균사체를 올려놓고 cover slip을 덮는다. 건조를 방지하기 위하여 nail polish로 슬라이드를 sealing 한 다음, 그 샘플을 BX50 fluorescence microscope 시스템(Olympus)에서 visible 영역에서는 UPlanFL 20 objective를 또는 자외선 영역에서는 100W mercury UV lamp를 사용하여 관찰하였다. GFP 발현 균사체 사진을 찍기 위하여 U-MNB narrow-band cube (excitation 470-490 nm; emission >515 nm)를 사용하였다. Confocal imaging을 위하여 100 oil immersion objective와 Radiance Plus confocal scanning system (BioRad)이 장착된 Eclipse E 800 microscope (Nikon)가 사용되었다. 488 nm argon laser로 excitation이 사용되었으며, fluorescence는 500-530 nm에서 감지되었다. 이와 같은 방법을 통하여 promoter 및 신호서열의 효율성과 형광단백질의 발현을 정성적으로 확인 할 수 있었다.

(1) CaMV 35S promoter를 포함하는 벡터구성 (pCam35S)

(가) 클로닝 전략

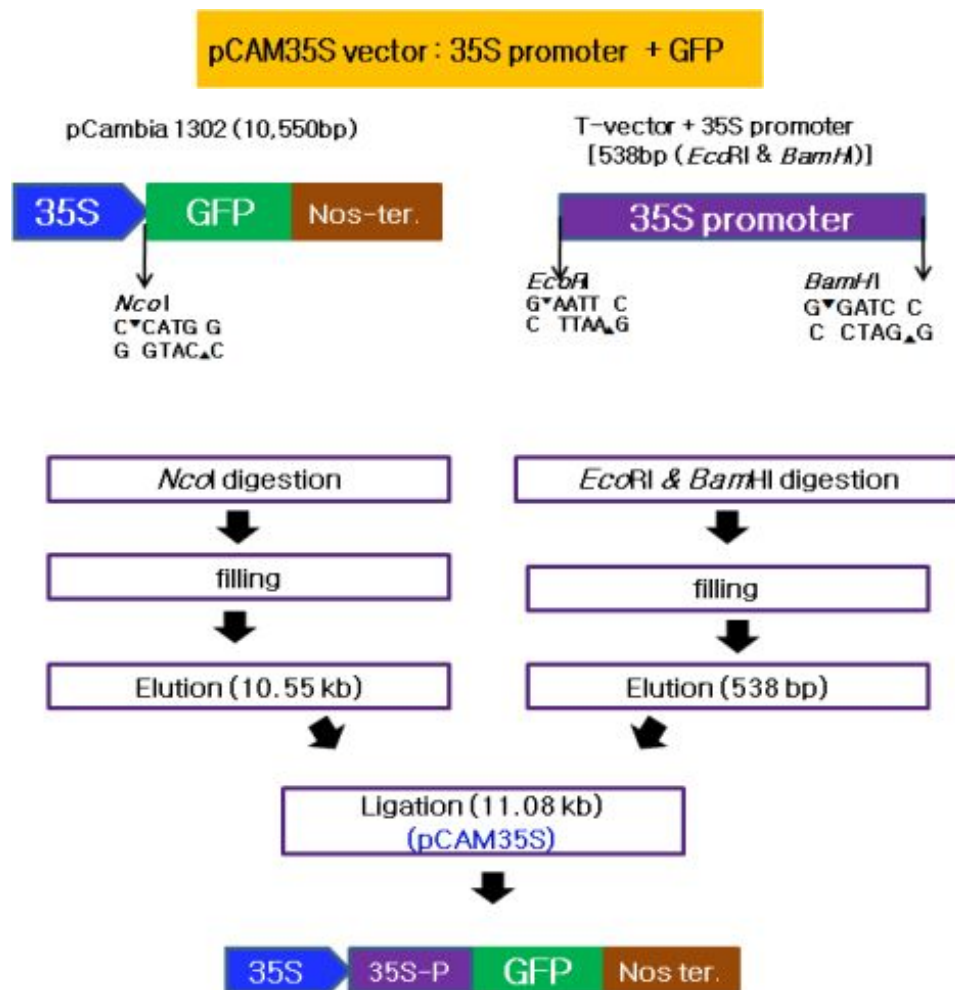


Fig. 48. Cloning strategy for construction of pCam35S vector containing CaMV35S promoter.

Fig. 48에서 보는 바와 같이 GFP 발현벡터인 pCambia1302 vector (10.5 kb)에 CaMV 35S promoter (538 bp)를 도입하기 위해 pCambia1302 vector는 *Nco*I 제한효소로 절단하고, T-vector에 subcloning 되어 있는 CaMV 35S promoter는 *Eco*RI과 *Bam*HI 제한효소로 절단한 다음, 각각의 DNA에 Klenow 효소를 처리하여 3'-말단 부위를 blunting 하여 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 pCam35SP 발현벡터 (11.08 kb)를 screening 하였다.

(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

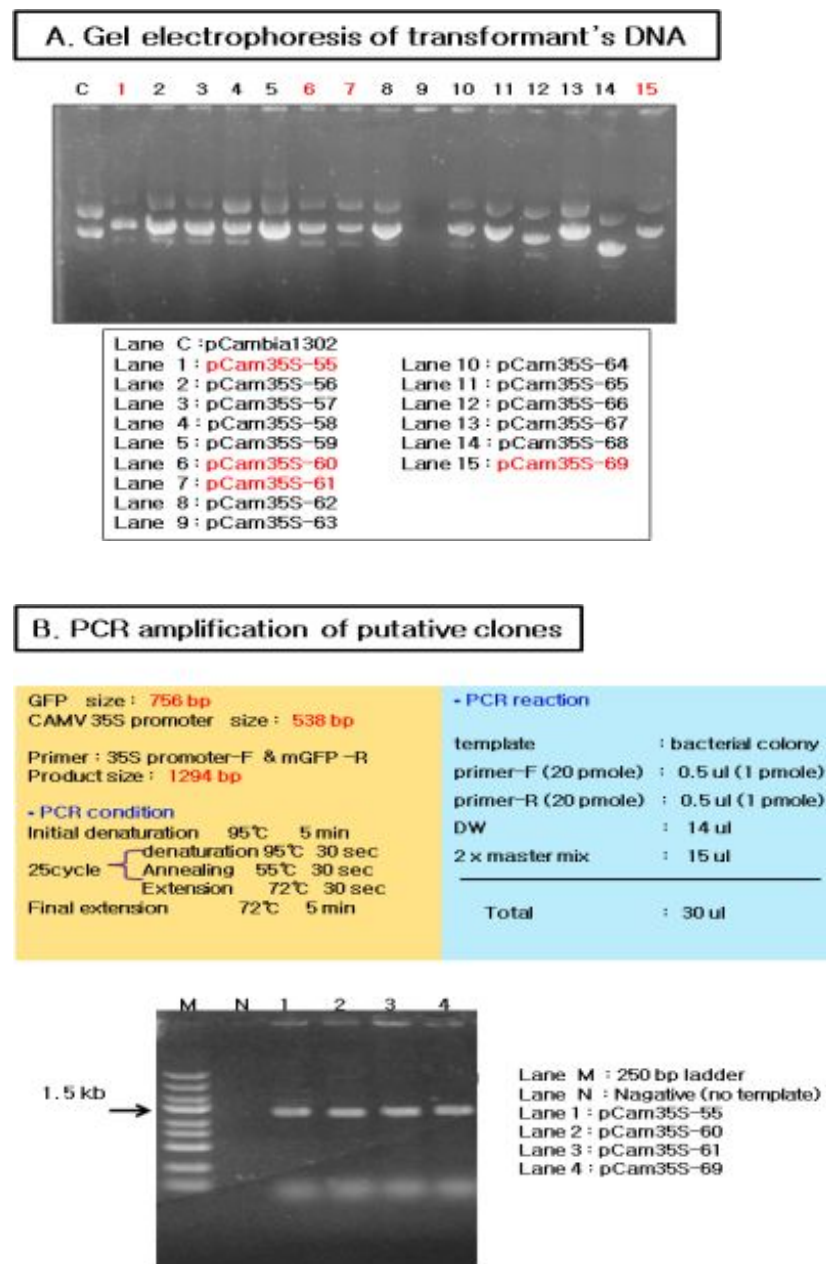


Fig. 49. Agarose gel electrophoresis of putative clones and PCR amplification

대장균 형질전환체로부터 alkaline lysis 방법에 의해 추출된 plasmid DNA는 전기영동하에서 size selection에 의해 control DNA(pCambia1302)보다 커진 클론들(pCam35S-55, 60, 61, 69)을 선별하고, CaMV 35SP Forward PCR primer: 5' GGG GAA TTC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA 3'와, GFP Reverse PCR primer: 5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3'를 이용하여 PCR을 통해 Fig. 49에서 보는 바와 같이 약 1.3 kb의 DNA 단편을 확인하였고, 따라서 상기 클론들은 CaMV 35S promoter가 도입된 것으로 확인되었으며, pCam35S 발현벡터로 명명하였다.

(다) 염기서열 분석

구성된 pCam35S 발현벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 50에서 보는 바와 같이 정확하게 CaMV 35S promoter가 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.



Fig. 50. DNA sequence analysis of pCam35S vector.

(라) *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

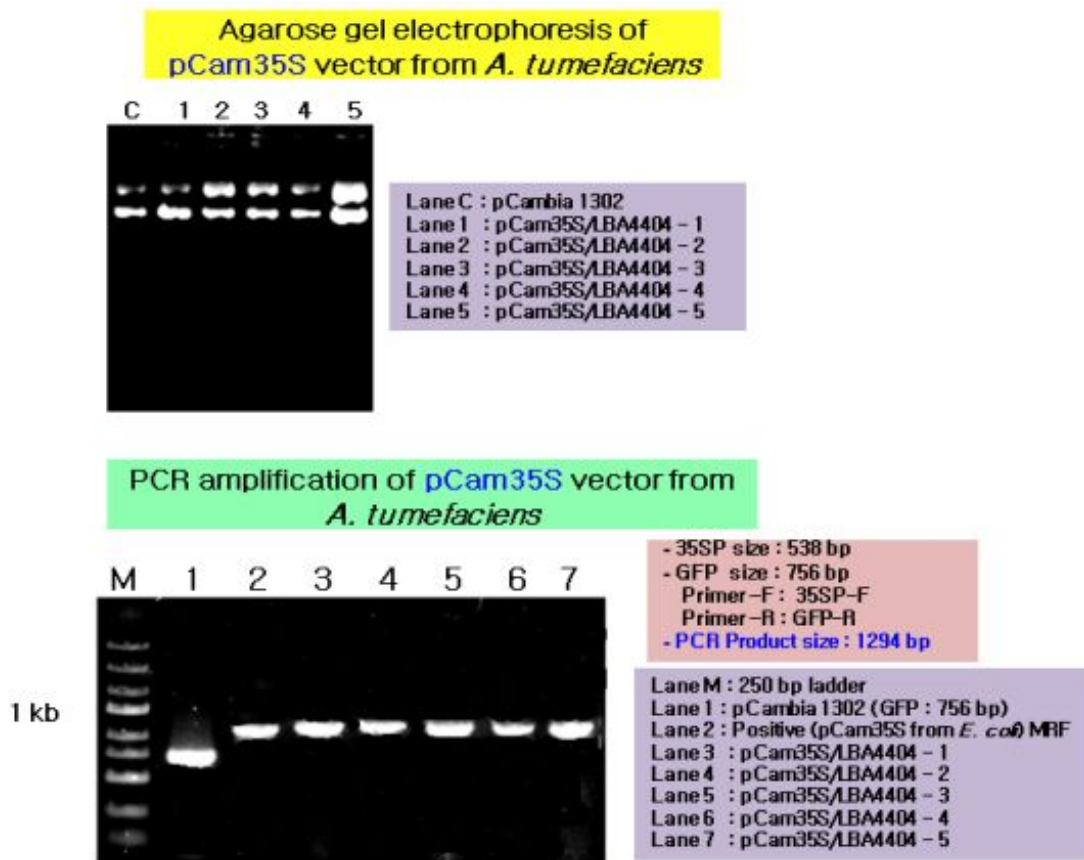


Fig. 51. Introduction of the pCam35S vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and Its PCR amplification.

새송이버섯에 구성된 pCam35S 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii* 를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCam35S 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCam35S 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CaMV 35SP Forward PCR primer: 5' GGG GAA TTC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA 3'와, GFP Reverse PCR primer: 5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 51에서 보는 바와 같이 약 1.3 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

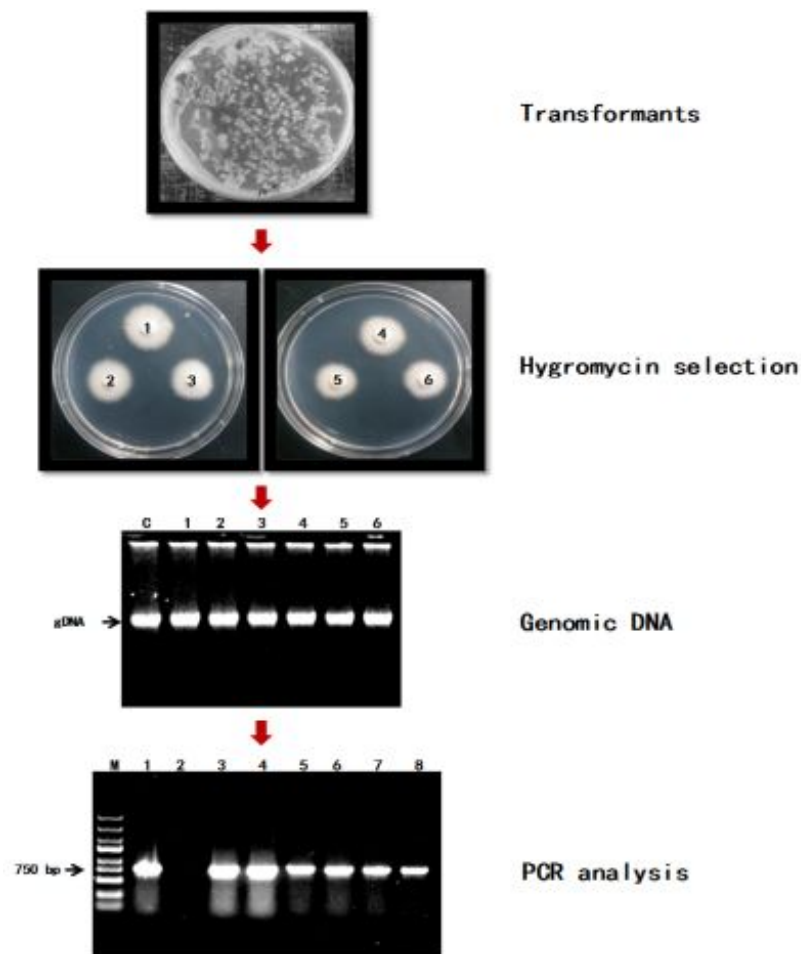


Fig. 52. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCam35S vector and Selection of transformants by PCR

pCam35S vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCam35S vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 52에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 GFP-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 750 bp 유전자를 확인하였고, CaMV 35S promoter에 의한 녹색형광 단백질 (Green fluorescent protein)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCam35S)의 GFP 분석

여러 가지 색깔의 fluorescent protein은 filamentous fungi에서 marker로 사용하기 위하여 개발되었다 (Bourett *et al.*, 2002 : *Fung. Genet. Biol.* 37, 211-220). 상당한 수준의 GFP 발현을 위하여 유전자 수준에서 intron이 필요한 것으로 보고되었으나 담자균류 (Basidiomycetes)에서는 일반적으로 잘 발현되는 것으로 보고되었다 (Ma *et al.*, 2001: *Appl. Environ. Microb.* 67, 948-955). 담자균류에서 외래 유전자의 발현은 여러 요인에 의해 손상을 받을 수 있다. 즉, DNA methylation, AT-rich 서열의 존재 (유전자 발현 불활성화; Scholtmeijer *et al.*, 2001; *Appl. Environ. Microb.* 67, 481-483), mRNA 축적을 위하여 intron이 필요, 등이 보고되어지고 있다. 그러나 최근에는 여러 가지 BT 기술의 접목에 의해 별 문제없이 발현되므로 GFP를 reporter gene으로 사용하여 promoter 세기 분석을 위하여 사용되어 진다. GFP 유전자는 756nt (CDS)로 구성되어 있으며 251개의 아미노산에 정보를 가지며 단백질의 크기는 약 27.6 kDa이다.

```

ATGGTAGATCTGACTAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCCTTGTGTAAT
TAGATGGTGTATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATA
CGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCGTGGCCAACACTT
GTCACACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACG
ACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGA
CGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAG
CTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACACTACA
ACTCCCACAACGTATACATCATGCGCCGACAAGCAAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGAC
CCGCCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGCAACTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATT
GGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCAAG
ATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACA
TGGCATGGATGAACTATACAAAGCTAGCCACCACCACCACCACCACCGTGTGA
    
```

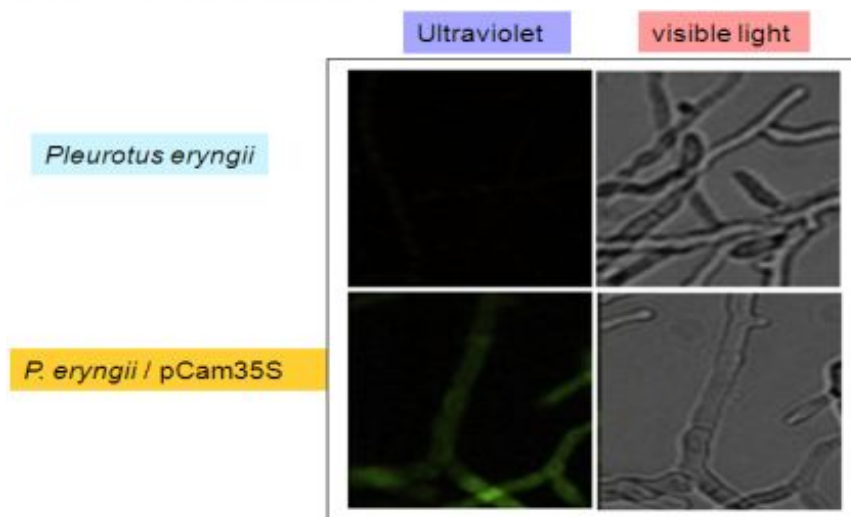


Fig. 53. GFP analysis for mycelia of trasgenic *Pleurotus eryngii* containing pCam35S vector.

pCam35S vector가 새송이버섯 염색체로 도입되어 확인된 *P. eryngii*/pCam35S 형질 전환체를 hygromycin (30 ug/ml)을 함유하는 PDB 배지에서 충분히 성장을 시킨 다음, 0.9% 생리 식염수로 희석한 다음, 슬라이드 글라스에 균사체를 올려놓고 앞에 기술한 방법에 따라 균사체에서 GFP 발현 여부를 조사한 결과 Fig. 53에서 보는 바와 같이 control 새송이버섯과 비교한 결과 약하지만 녹색형광단백질이 *P. eryngii*/pCam35S 형질전환체에서 발현되는 것을 확인하였다.

(2) CaMV 35S promoter 및 pR1b 분비서열을 포함하는 벡터구성

(pCam35SpR1b)

(가) 클로닝 전략

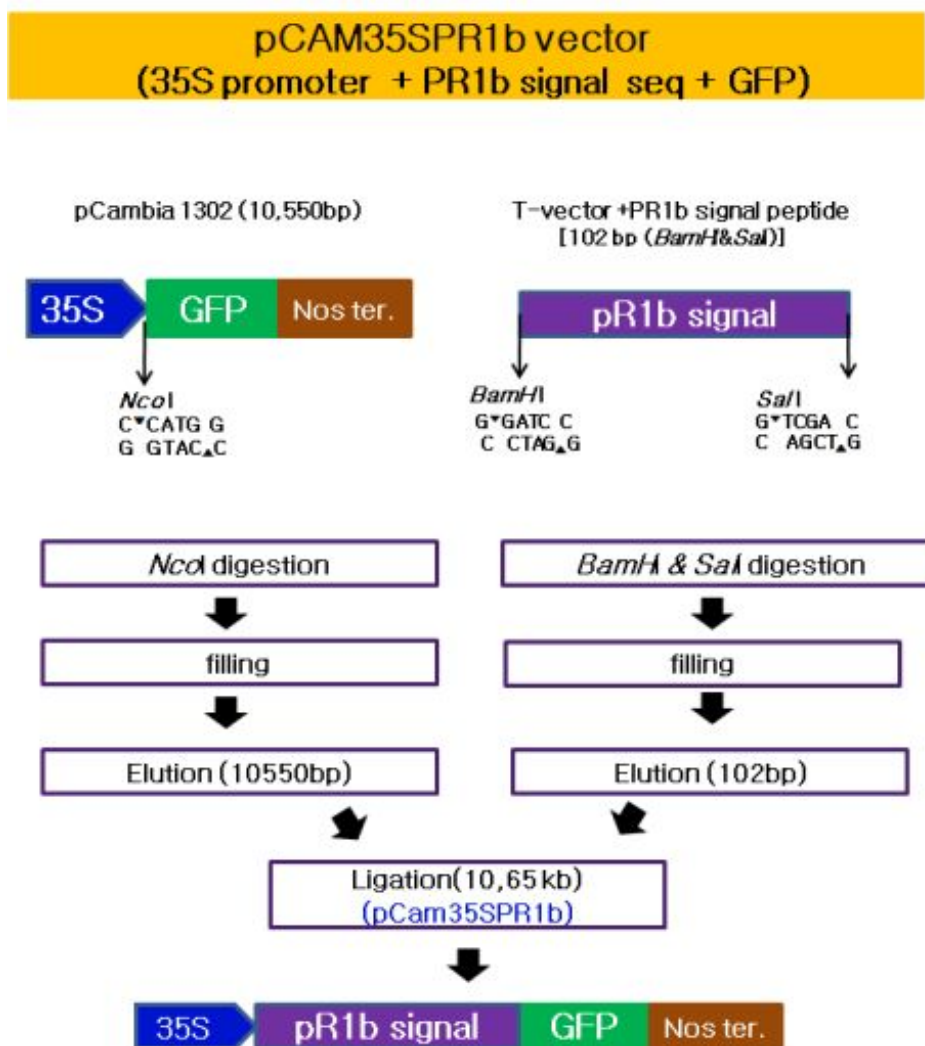


Fig. 54. Cloning strategy for construction of pCam35SpR1b vector containing CaMV35S promoter and pR1b signal sequence.

Fig. 54에서 보는 바와 같이 GFP 발현벡터인 pCambia1302 vector (10.5 kb)에 CaMV 35S promoter 뒤에 pathogen-related protein의 신호서열 (ATGGGATTTT TTCTCTTTTC ACAAATGCC TCATTTTTC TTGTCTCTAC ACTTCTCTTA TTCCTAATAA TATCTCACTC TTCTCATGCC CAAAACCTCTC AA)을 도입하기 위하여 pCambia1302 vector는 *NcoI* 제한효소로 절단하고, T-vector에 subcloning 되어 있는 pR1b signal sequence는 *BamHI*과 *SalI* 제한효소로 절단한 다음, 각각의 DNA에 Klenow 효소를 처리하여 3'-말단 부위를 blunting 하여 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 pCam35SpR1b 분비벡터 (10.65 kb)를 screening 하였다.

(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

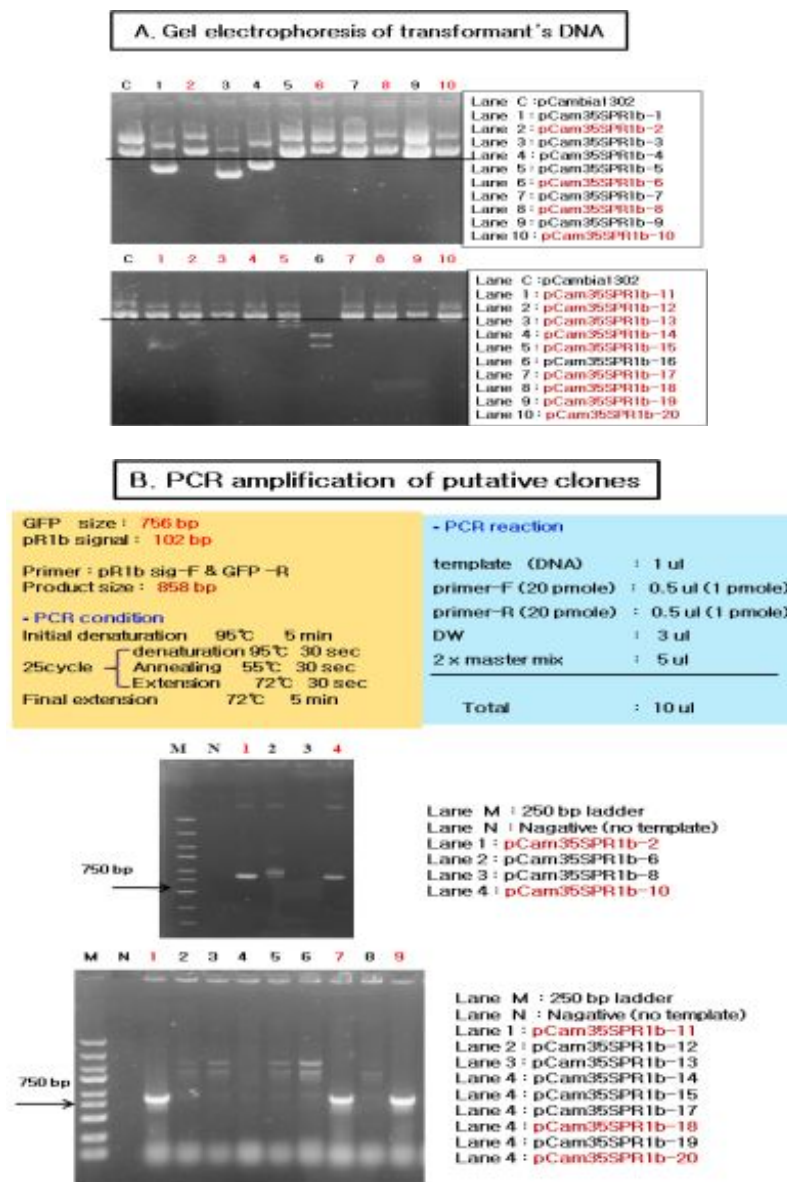


Fig. 55. Agarose gel electrophoresis of putative clones and PCR amplification

대장균 형질전환체로부터 alkaline lysis 방법에 의해 추출된 plasmid DNA는 전기영동하에서 size selection에 의해 control DNA(pCambia1302)보다 커진 클론들(pCam35SpR1b-2, 6, 8, 10, 11-15, 17-20)을 선별하고, pR1b forward PCR primer(5'GGATCCATGGGATTTTTTCTCTTTTCACAA3')와, GFP reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')를 이용하여 PCR을 통해 Fig. 55에서 보는 바와 같이 약 0.86 kb의 DNA 단편을 pCam35SpR1b-2, 10, 11, 18, 20 클론들에서 확인 하였고, 따라서 상기 클론들은 CaMV 35S promoter에 pathogen-related protein의 신호서열이 도입된 것으로 확인되었으며, pCam35SpR1b 분비벡터로 명명하였다.

(다) 염기서열 분석

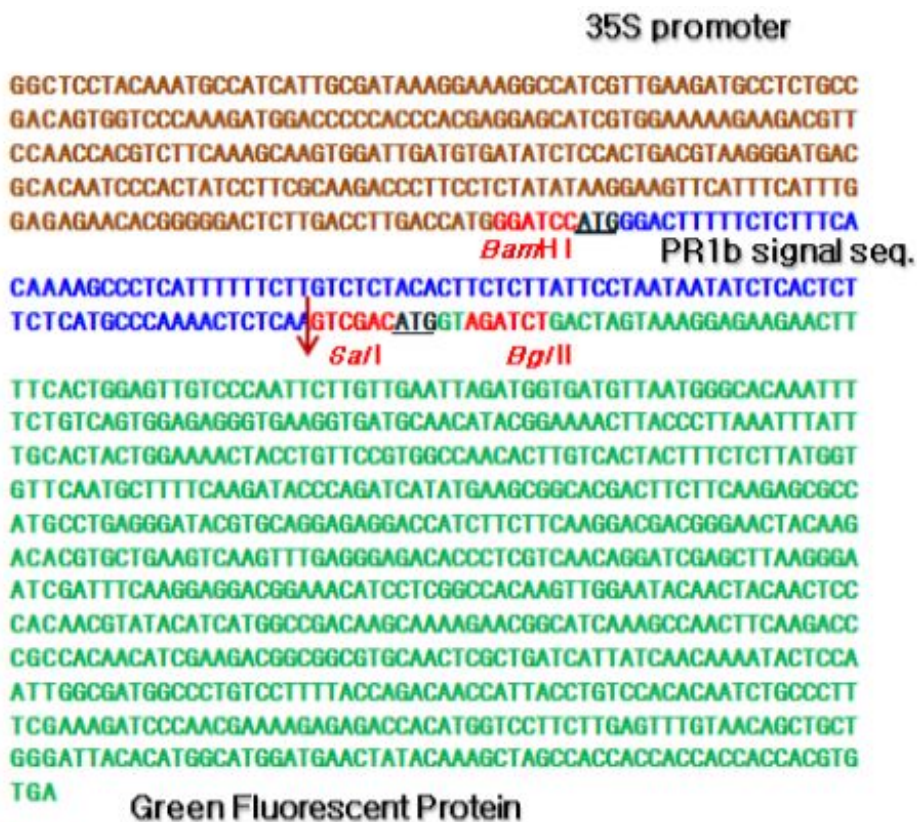


Fig. 56. DNA sequence analysis of pCam35SpR1b vector

구성된 pCam35SpR1b 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 56에서 보는 바와 같이 정확하게 CaMV 35S promoter에 pathogen-related protein의 신호서열이 GFP 유전자와 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

(라) *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

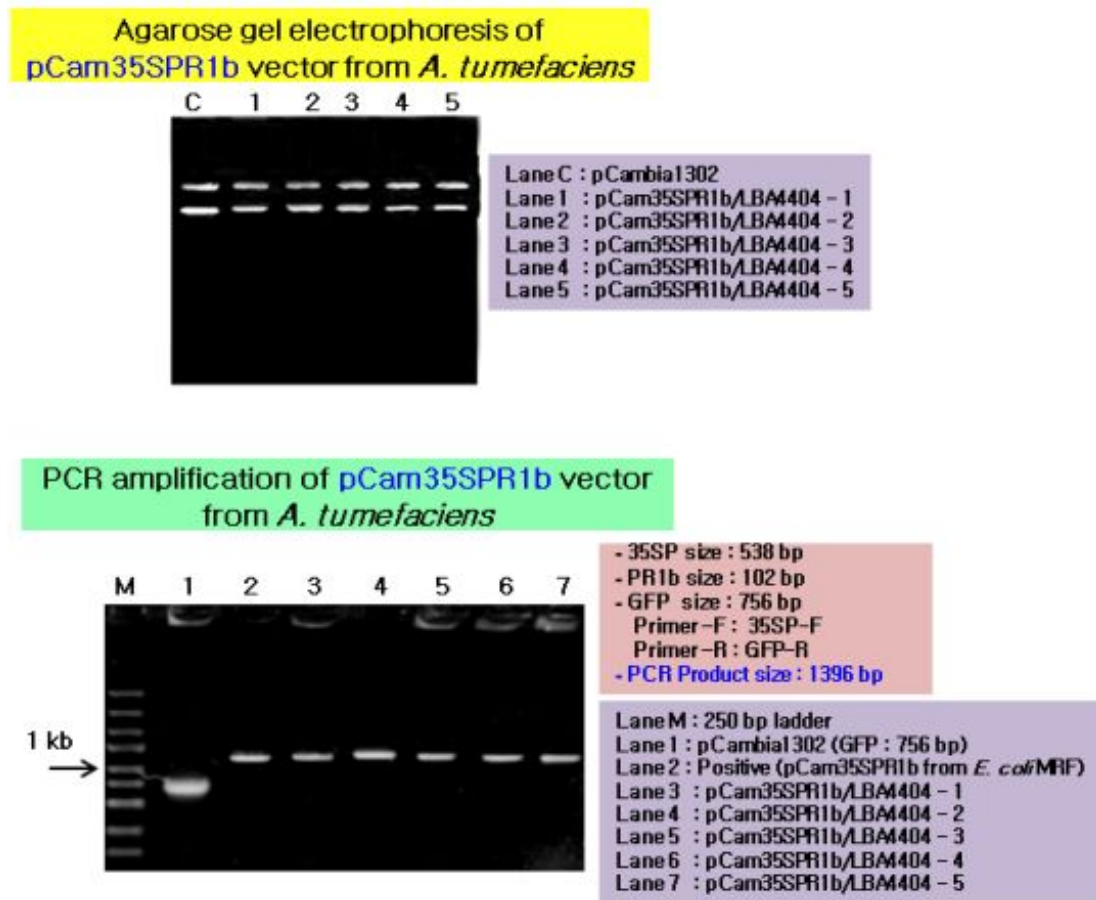


Fig. 57. Introduction of the pCam35SpR1b vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and Its PCR amplification.

새송이버섯에 구성된 pCam35SpR1b 분비벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCam35SpR1b 분비벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCam35SpR1b 분비벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CaMV 35SP forward PCR primer: 5' GGG GAA TTC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA 3'와, GFP reverse PCR primer: 5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 57에서 보는 바와 같이 약 1.4 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

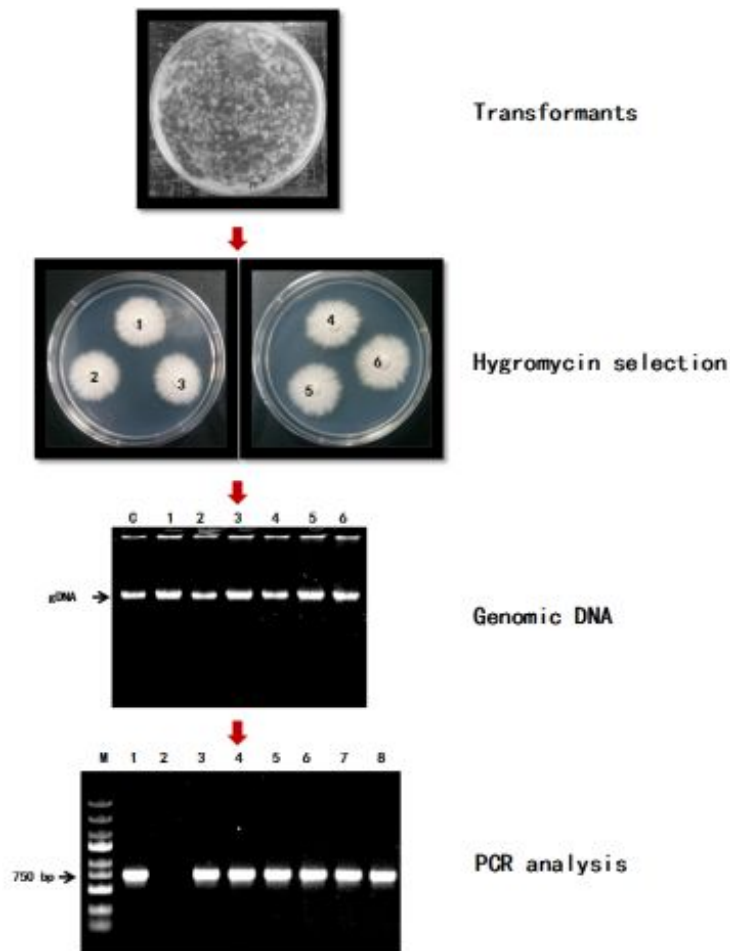


Fig. 58. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCam35SpR1b vector and Selection of transformants by PCR.

pCam35SpR1b vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCam35SpR1b vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 58에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 GFP-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 750 bp 유전자를 확인하였고, CaMV 35S promoter와 pathogen-related protein의 신호서열에 의한 녹색형광 단백질 (Green fluorescent protein)의 발현 및 분비 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCam35SpR1b)의 GFP 분석

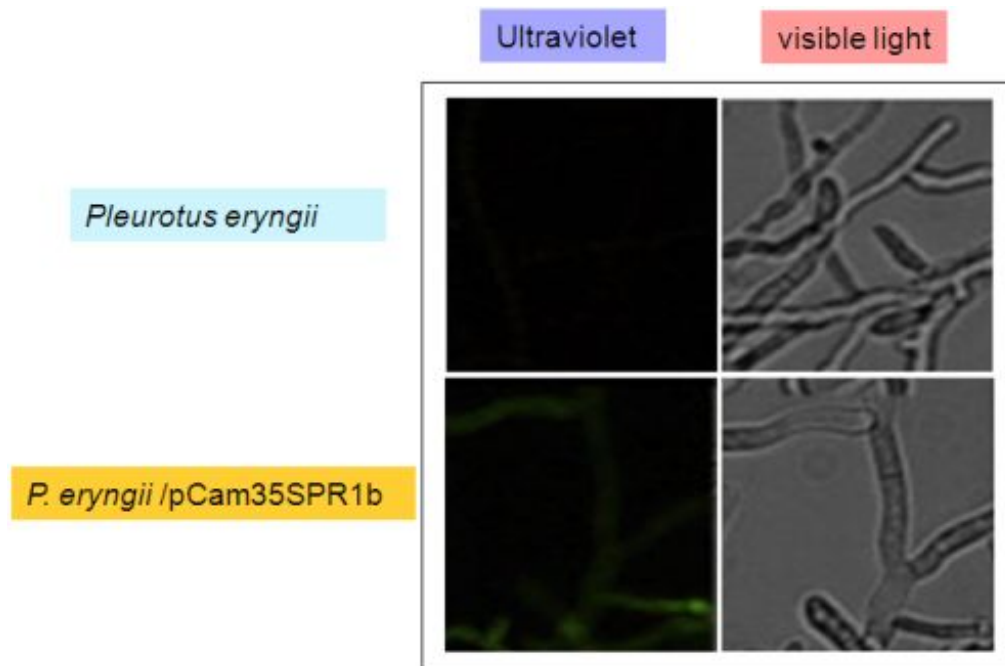


Fig. 59. GFP analysis for mycelia of transgenic *Pleurotus eryngii* containing pCam35SpR1b vector.

pCam35SpR1b vector가 새송이버섯 염색체로 도입되어 확인된 *P. eryngii*/pCam35SpR1b 형질전환체를 hygromycin (30 ug/ml)을 함유하는 PDB 배지에서 충분히 성장을 시킨 다음, 0.9% 생리 식염수로 희석한 다음, 슬라이드 글라스에 균사체를 올려놓고 앞에 기술한 방법에 따라 균사체에서 GFP 발현 여부를 조사한 결과 Fig. 59에서 보는 바와 같이 control 새송이버섯과 비교한 결과 약하지만 녹색형광단백질이 *P. eryngii*/pCam35SpR1b 형질전환체에서 발현되는 것을 확인하였다.

- (3) CaMV 35S promoter 및 laccase 분비서열을 포함하는 벡터구성 (pCam35SLacS)
 (가) 클로닝 전략

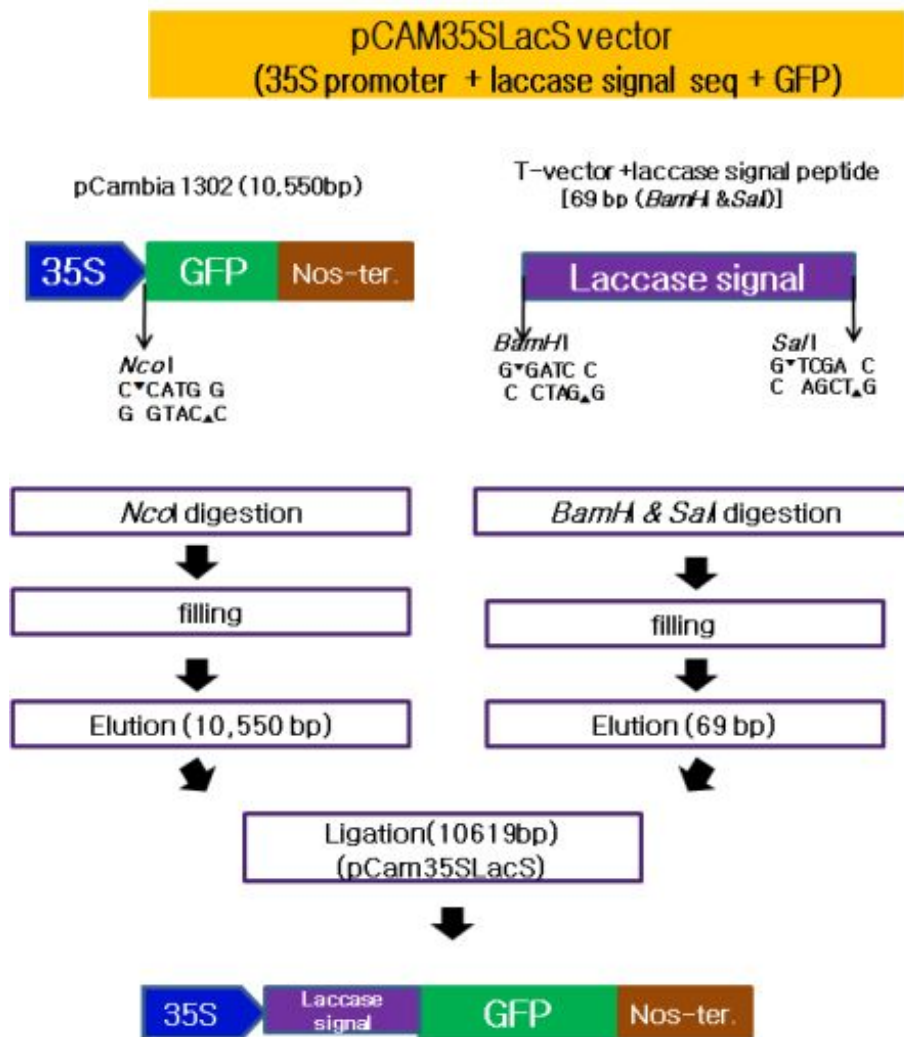


Fig. 60. Cloning strategy for construction of pCam35SLacS vector containing CaMV35S promoter and laccase signal sequence.

Fig. 60에서 보는 바와 같이 GFP 발현벡터인 pCambia1302 vector (10.5 kb)에 CaMV 35S promoter 3'-말단에 69 bp laccase protein의 신호서열 (ATGTTTCCAG GCGCACGGAT TCTCGCTACG CTTACATTAG CTCTTCACCT TTTACATGGC ACTCATGCT)을 도입하기 위하여 pCambia1302 vector는 *NcoI* 제한효소로 절단하고, T-vector에 subcloning 되어 있는 laccase signal sequence는 *BamHI*과 *SalI* 제한효소로 절단한 다음, 각각의 DNA에 Klenow 효소를 처리하여 3'-말단 부위를 blunting 하여 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 pCam35SLacS 분비벡터 (10.62 kb)를 screening 하였다.

(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

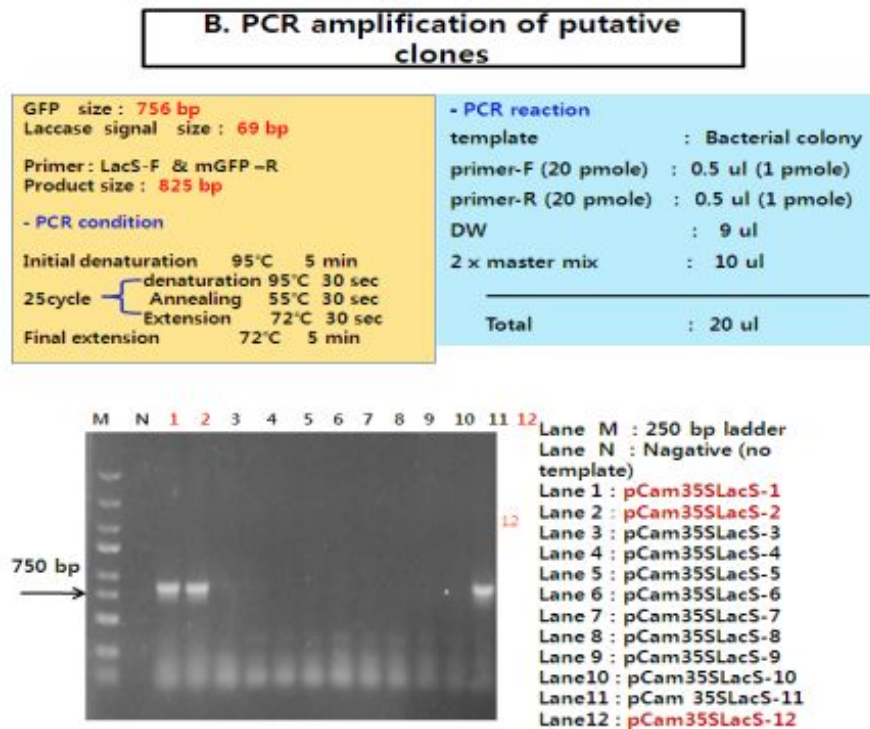


Fig. 61. Agarose gel electrophoresis of putative clones and PCR amplification.

대장균 형질전환체로부터 alkaline lysis 방법에 의해 추출된 plasmid DNA는 전기영동하에서 size selection에 의해 control DNA (pCambia1302)보다 커진 클론들 (pCam35SLacS-1,2,3-12)을 선별하고, LacS forward PCR primer(5' GGATCCATG TTT CCA GGC GCA CGG 3')와, GFP reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')를 이용하여 PCR을 통해 Fig. 61에서 보는 바와 같이 약 825 bp의 DNA 단편을 pCam35SLacS-1, 2, 12 클론들에서 확인 하였고, 따라서 상기 클론들은 CaMV 35S promoter에 69 bp laccase protein의 신호서열이 도입된 것으로 확인되었으며, pCam35SLacS 분비벡터로 명명하였다.

(다) 염기서열 분석



Fig. 62. DNA sequence analysis of pCam35SLacS vector

구성된 pCam35SLacS 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 62에서 보는 바와 같이 정확하게 CaMV 35S promoter에 69 bp lacase protein의 신호서열이 GFP 유전자와 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

(라) *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

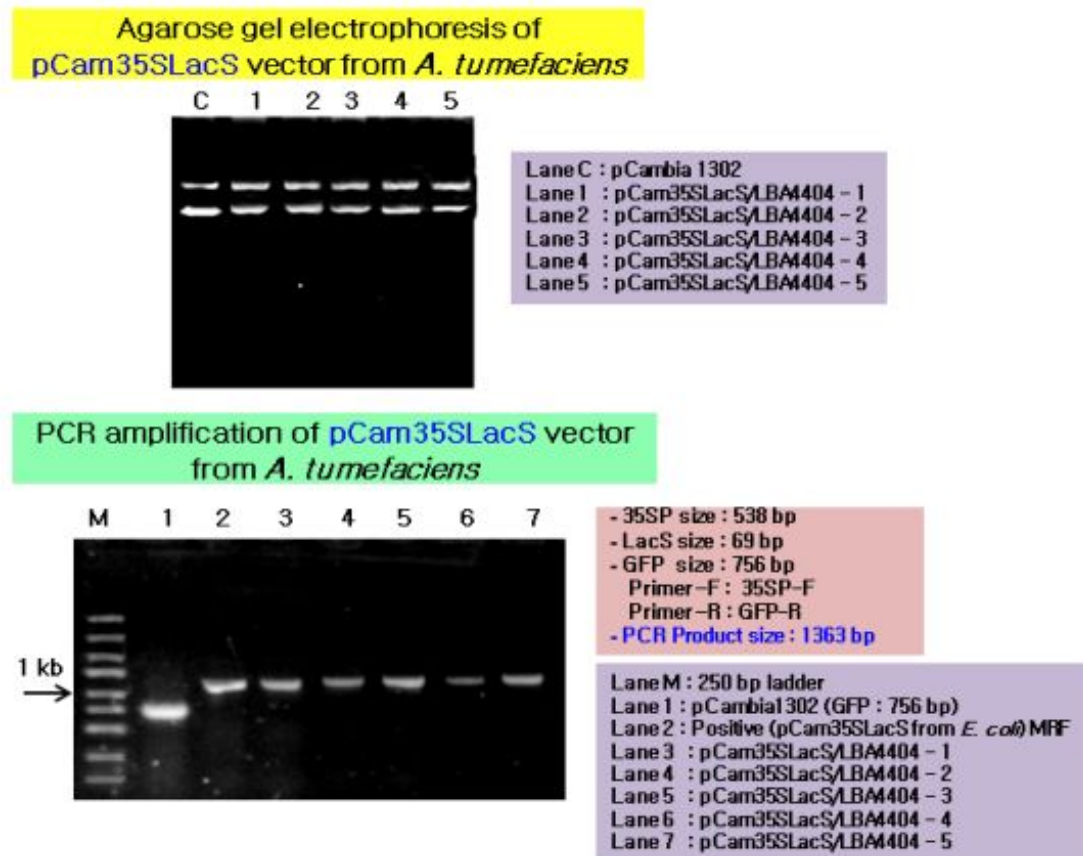


Fig. 63. Introduction of the pCam35SLacS vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and Its PCR amplification.

새송이버섯에 구성된 pCam35SLacS 분비벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCam35SLacS 분비벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCam35SLacS 분비벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CaMV 35SP forward PCR primer: 5' GGG GAA TTC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA 3'와, GFP reverse PCR primer: 5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 63에서 보는 바와 같이 약 1.36 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

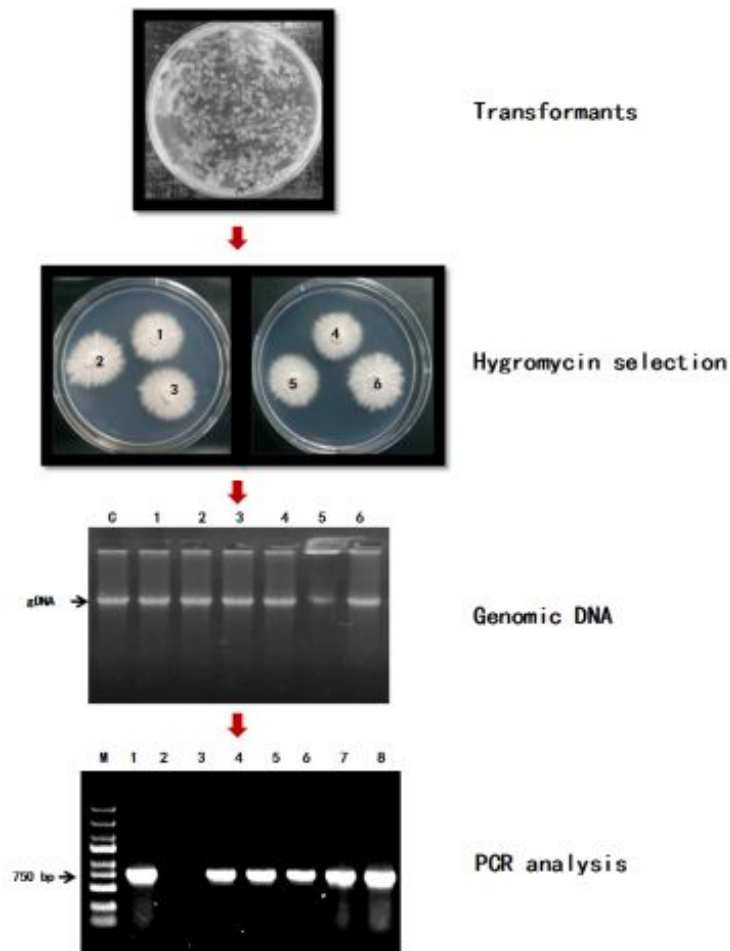


Fig. 64. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCam35SLacS vector and Selection of transformants by PCR.

pCam35SLacS vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michiels 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCam35SLacS vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 64에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 GFP-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 750 bp 유전자를 확인하였고, CaMV 35S promoter와 laccase protein의 신호서열에 의한 녹색형광 단백질 (Green fluorescent protein)의 발현 및 분비 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCam35SLacS)의 GFP 분석

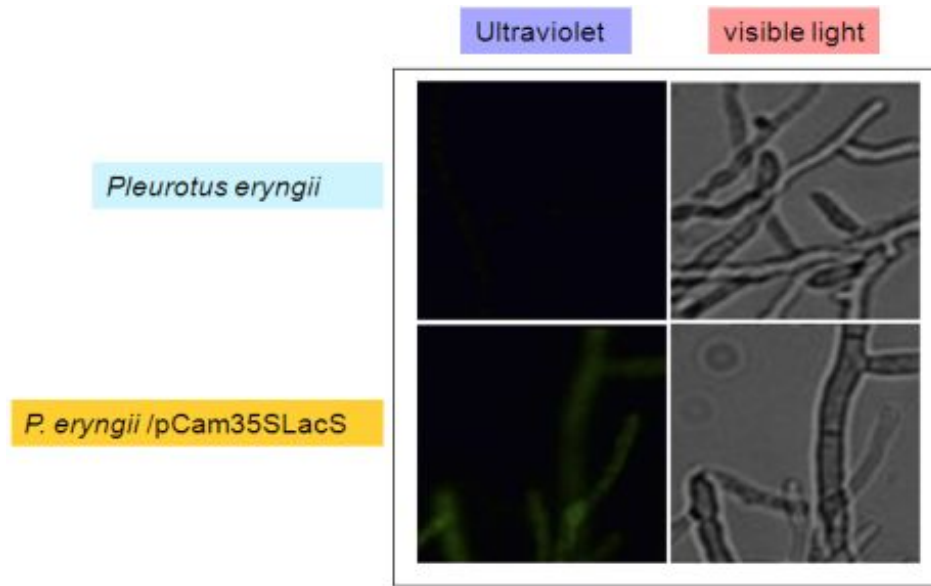


Fig. 65. GFP analysis for mycelia of transgenic *Pleurotus eryngii* containing pCam35SLacS vector.

pCam35SLacS vector가 새송이버섯 염색체로 도입되어 확인된 *P. eryngii*/pCam35SLacS 형질전환체를 hygromycin (30 ug/ml)을 함유하는 PDB 배지에서 충분히 성장을 시킨 다음, 0.9% 생리 식염수로 희석한 다음, 슬라이드 글라스에 균사체를 올려놓고 앞에 기술한 방법에 따라 균사체에서 GFP 발현 여부를 조사한 결과 Fig. 65에서 보는 바와 같이 control 새송이버섯과 비교한 결과 아주 적은 정도의 녹색형광단백질이 *P. eryngii*/pCam35SLacS 형질전환체에서 발현되는 것을 확인하였다.

- (4) Laccase promoter를 포함하는 벡터구성 (pCamLacP)
 (가) 클로닝 전략

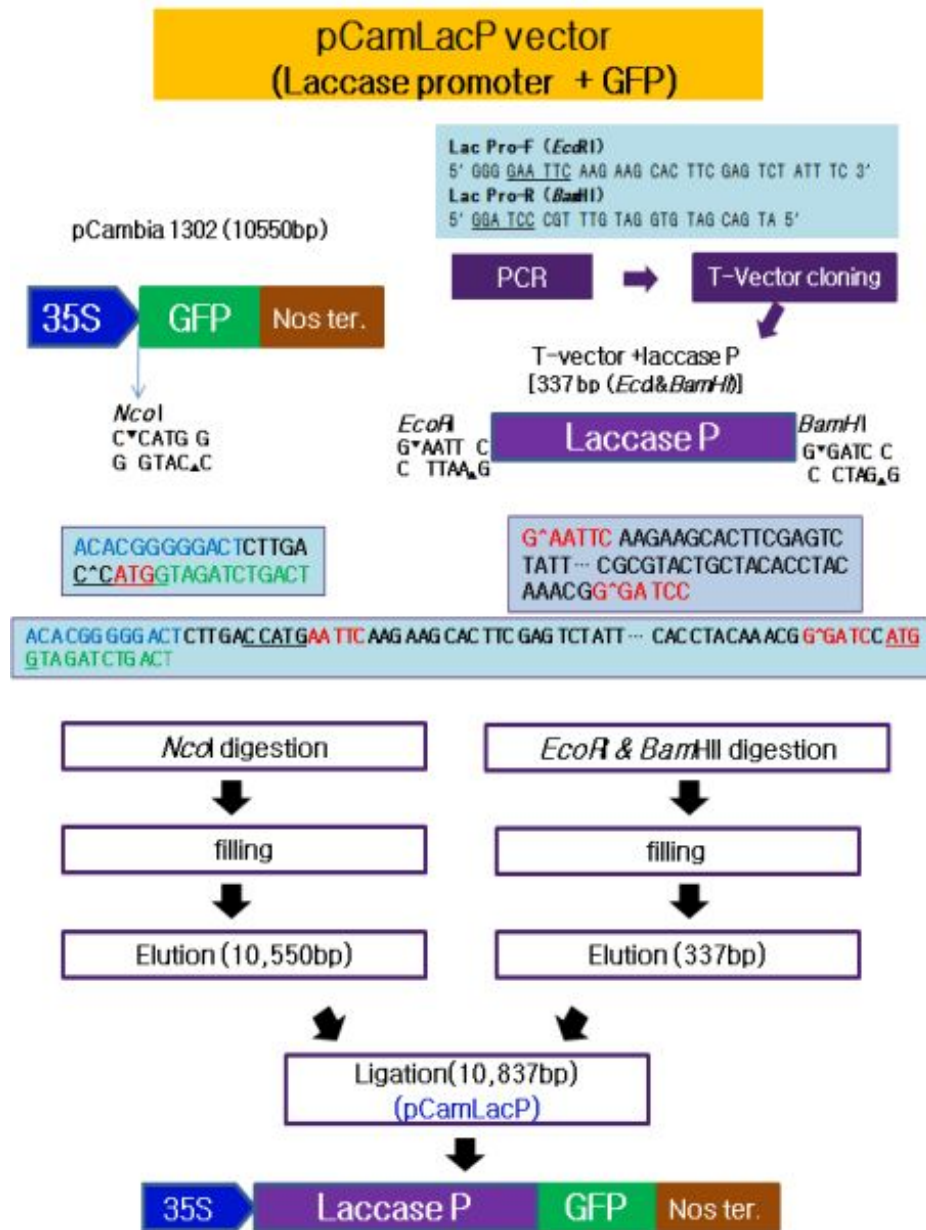


Fig. 66. Cloning strategy for construction of pCamLacP vector containing laccase promoter.

Fig. 66에서 보는 바와 같이 GFP 발현벡터인 pCambia1302 vector (10.5 kb)에 Laccase promoter (337 bp)를 도입하기 위해 pCambia1302 vector는 *NcoI* 제한효소로 절단하고, T-vector에 subcloning 되어 있는 laccase promoter는 *EcoRI*과 *BamHI* 제한효소로 절단한 다음, 각각의 DNA에 Klenow 효소를 처리하여 3'-말단 부위를 blunting 하여 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 pCamLacP 발현벡터 (10.84 kb)를 screening 하였다.

(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

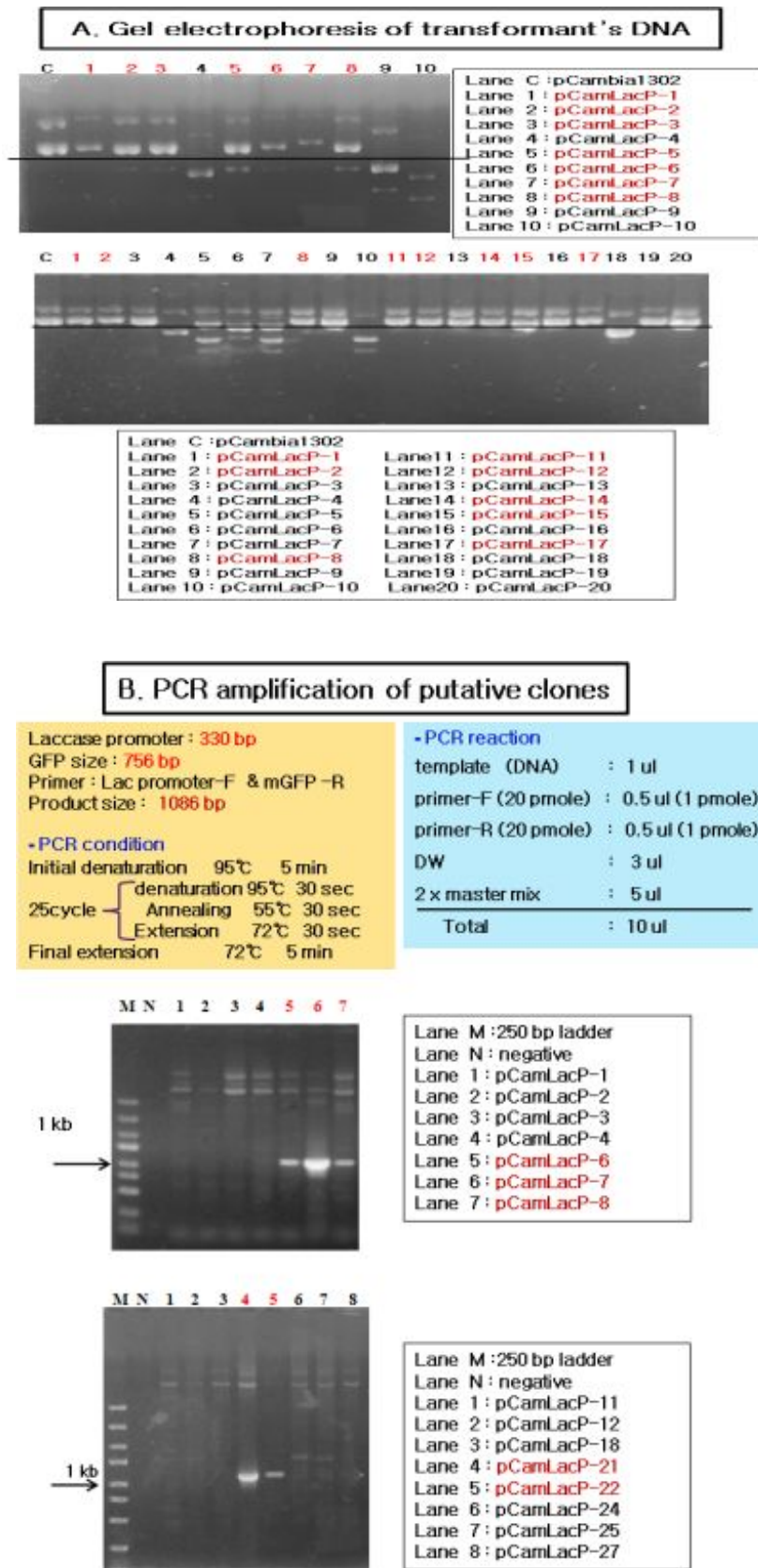


Fig. 67. Agarose gel electrophoresis of putative clones and PCR amplification.

대장균 형질전환체로부터 alkaline lysis 방법에 의해 추출된 plasmid DNA는 전기영동하에서 size selection에 의해 control DNA (pCambia1302)보다 커진 클론들 (pCamLacP-1,2,8,11,12,14,15,17)을 선별하고, laccase forward PCR primer (5' GGG GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3')와 GFP reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')를 이용하여 PCR을 통해 Fig. 67에서 보는 바와 같이 약 1.09 kb의 DNA 단편을 확인하였고, 따라서 상기 클론들은 laccase promoter가 도입된 것으로 확인되었으며, pCamLacP 발현 벡터로 명명하였다.

(다) 염기서열 분석



Fig. 68. DNA sequence analysis of pCamLacP vector.

구성된 pCamLacP 발현벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 68에서 보는 바와 같이 정확하게 CaMV 35S promoter 3'-말단 부분에 337 bp laccase promoter가 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

(라) *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

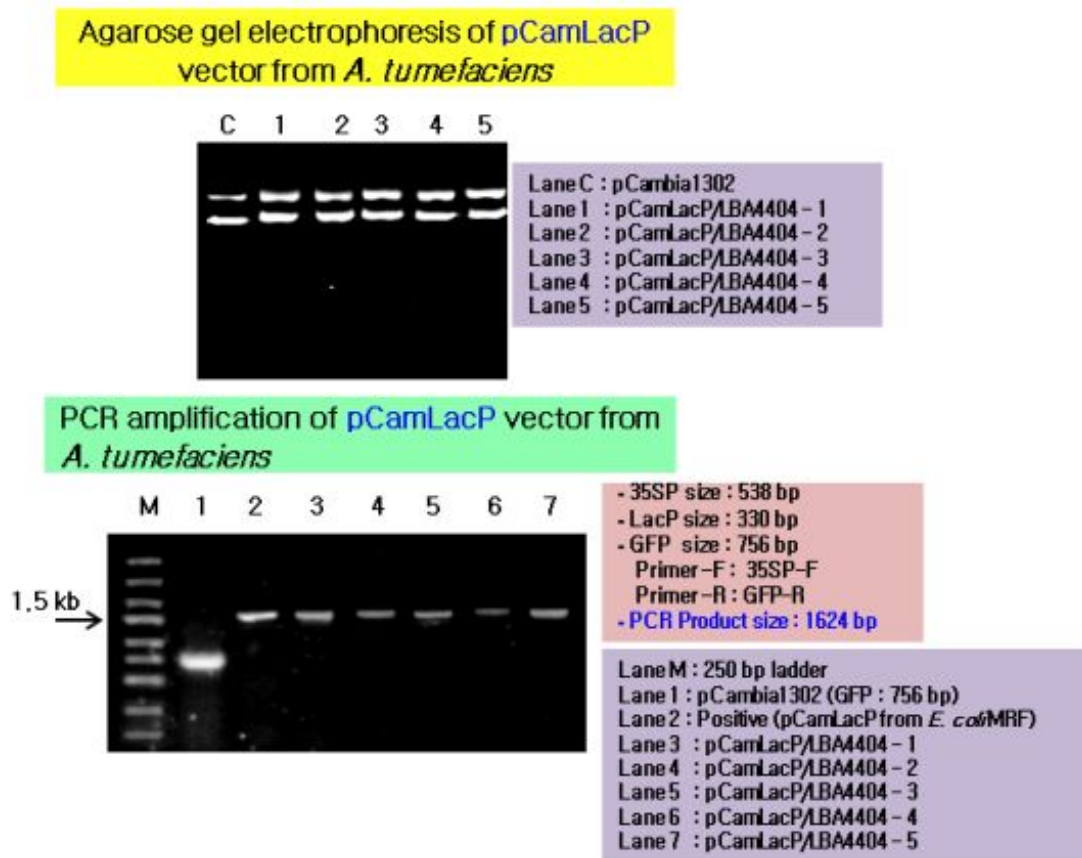


Fig. 69. Introduction of the pCamLacP vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and Its PCR amplification.

새송이버섯에 구성된 pCamLacP 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacP 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacP 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CaMV 35SP forward PCR primer: 5' GGG GAA TTC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA 3'와, GFP reverse PCR primer: 5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 69에서 보는 바와 같이 약 1.62 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

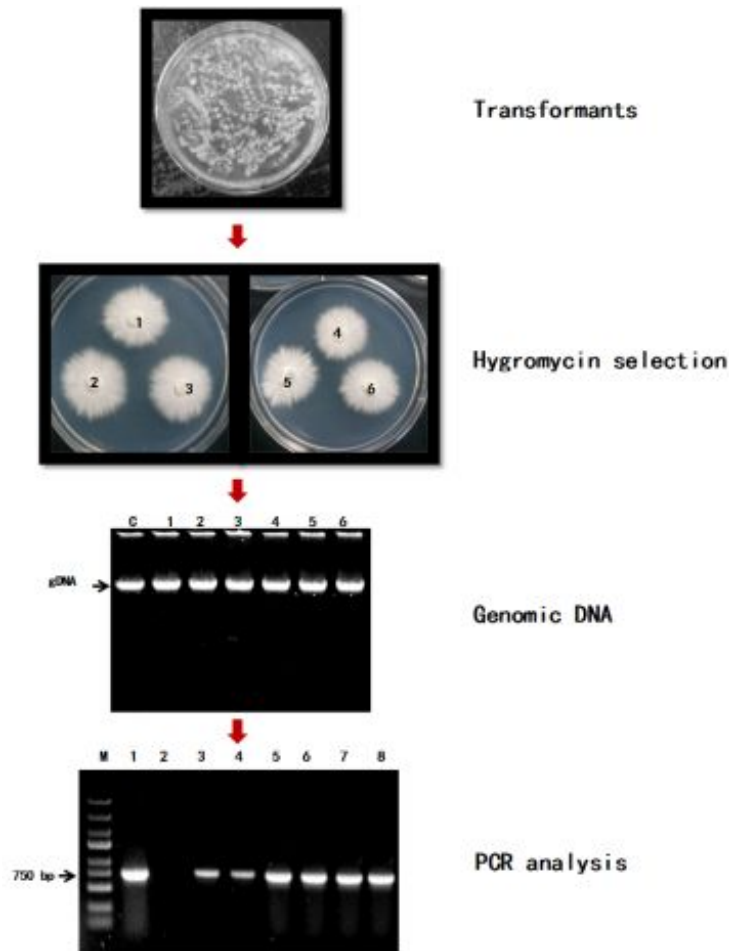


Fig. 70. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacP vector and Selection of transformants by PCR.

pCamLacP vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacP vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 70에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 µg/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 GFP-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 750 bp 유전자를 확인하였고, laccase promoter에 의한 녹색형광 단백질 (Green fluorescent protein)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCamLacP)의 GFP 분석

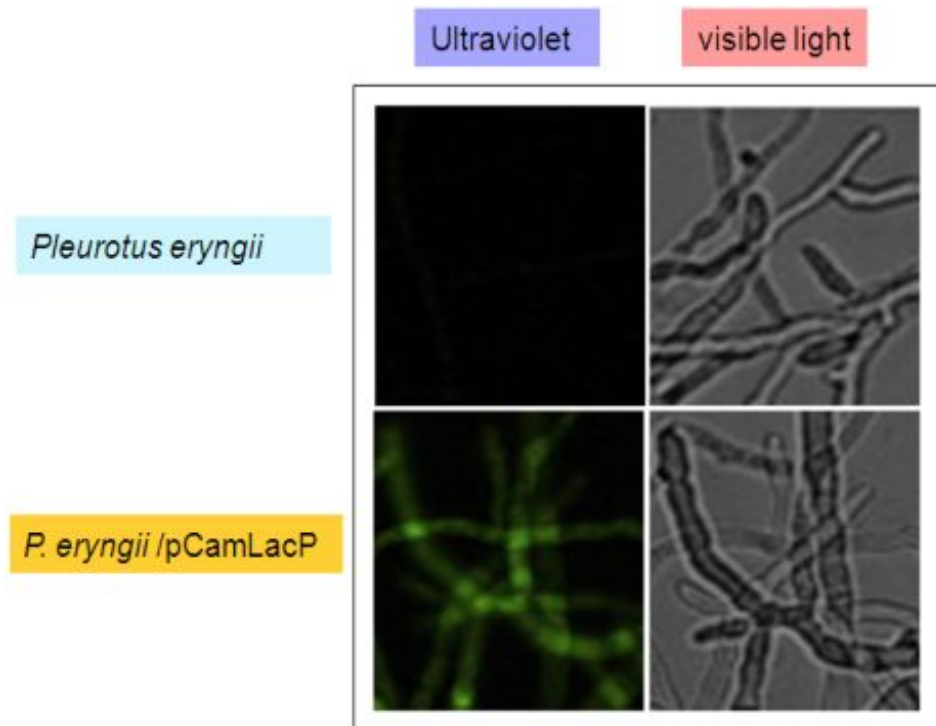


Fig. 71. GFP analysis for mycelia of transgenic *Pleurotus eryngii* containing pCamLacP vector.

pCamLacP vector가 새송이버섯 염색체로 도입되어 확인된 *P. eryngii*/pCamLacP 형질전환체를 hygromycin (30 ug/ml)을 함유하는 PDB 배지에서 충분히 성장을 시킨 다음, 0.9% 생리 식염수로 희석한 다음, 슬라이드 글라스에 균사체를 올려놓고 앞에 기술한 방법에 따라 균사체에서 GFP 발현 여부를 조사한 결과 Fig. 71에서 보는 바와 같이 control 새송이버섯과 비교한 결과 GFP 단백질이 선명하게 발현 되는 것이 확인되었으며, CaMV promoter 보다는 효율적으로 녹색형광단백질이 *P. eryngii*/pCamLacP 형질전환체에서 발현되는 것으로 나타났다. 따라서 외래 유용유전자의 intracellular 발현을 위하여 CaMV promoter 보다는 laccase promoter가 도입된 vector를 사용할 예정이다.

(5) Laccase promoter 및 pR1b 분비서열을 포함하는 벡터구성 (pCamLacpR1b)
 (가) 클로닝 전략

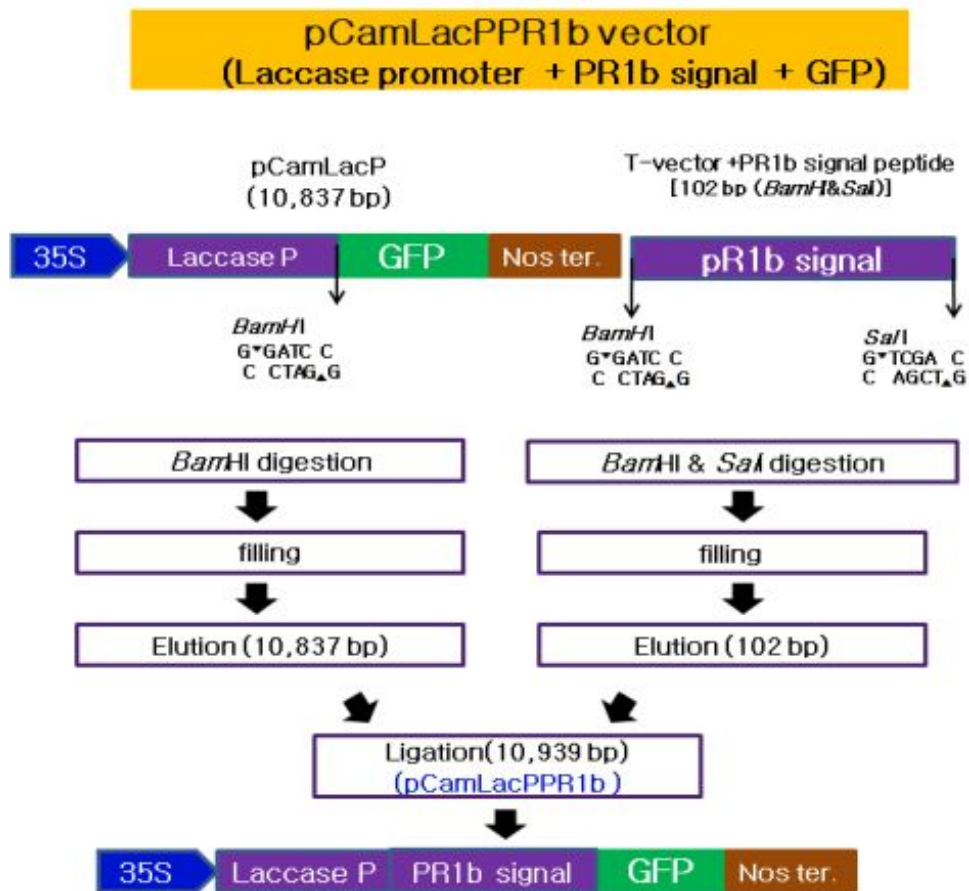


Fig. 72. Cloning strategy for construction of pCamLacPpR1b vector containing laccase promoter.

Fig. 72에서 보는 바와 같이 재조합에 의해 구성된 GFP 발현벡터인 pCamLacP vector (10.84 kb)의 laccase promoter 뒤에 102 bp의 pathogen-related protein의 신호 서열 (ATGGGATTTT TTCTCTTTTC ACAAATGCCC TCATTTTTTC TTGTCTCTAC ACTTCTCTTA TTCCTAATAA TATCTCACTC TTCTCATGCC CAAAACCTCTC AA)을 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *Bam*HI 제한효소로 절단하고, T-vector에 subcloning 되어 있는 pR1b signal sequence는 *Bam*HI과 *Sal*I 제한효소로 절단한 다음, 각각의 DNA에 Klenow 효소를 처리하여 3'-말단 부위를 blunting 하여 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 pCamLacPpR1b 분비벡터 (10.94 kb)를 screening 하였다.

(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

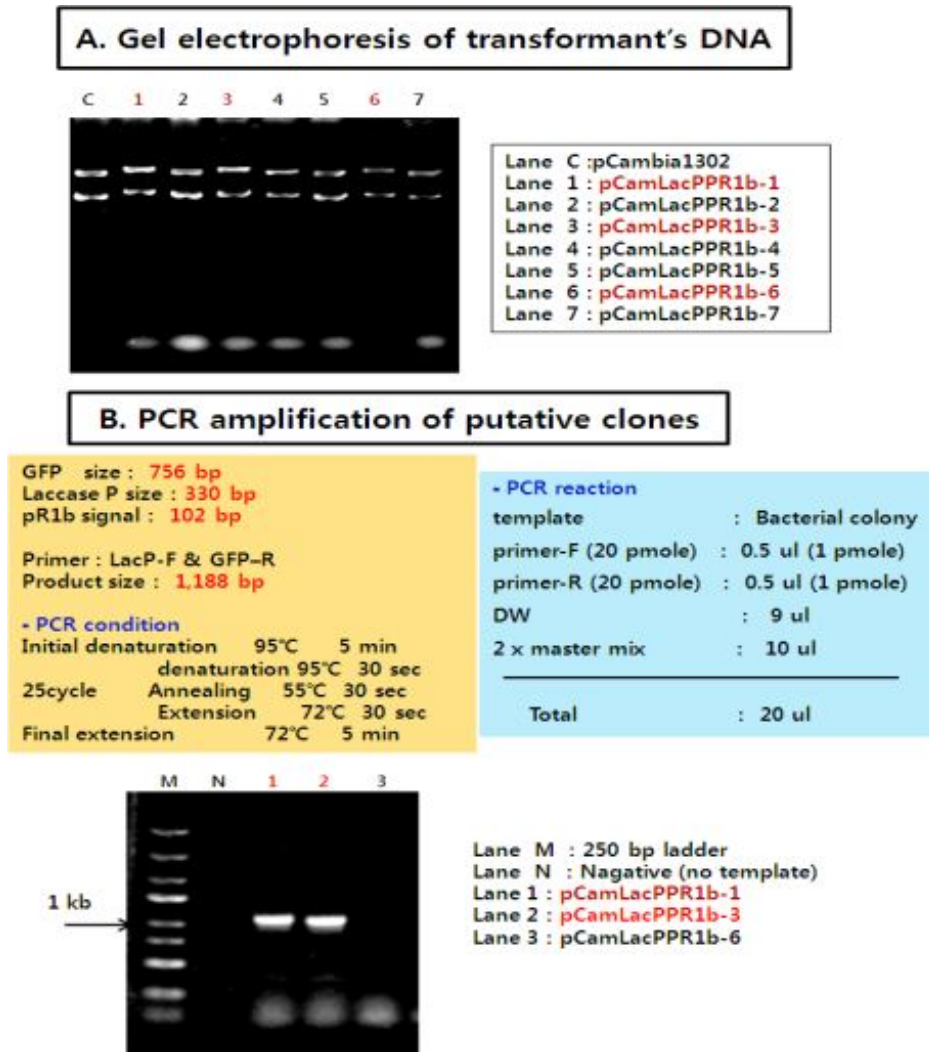


Fig. 73. Agarose gel electrophoresis of putative clones and PCR amplification

대장균 형질전환체로부터 alkaline lysis 방법에 의해 추출된 plasmid DNA는 전기영동하에서 size selection에 의해 control DNA (pCambia1302)보다 커진 클론들 (pCamLacPpR1b-1, 3, 6)을 선별하고, laccase forward PCR primer (5' GGG GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3')와 GFP reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')를 이용하여 PCR을 통해 Fig. 73에서 보는 바와 같이 약 1.19 kb의 DNA 단편을 pCamLacPpR1b-1, 3 클론들에서 확인 하였고, 따라서 상기 클론들은 laccase promoter에 pathogen-related protein의 신호서열이 도입된 것으로 확인되었으며, pCamLacPpR1b 분비벡터로 명명하였다.

(다) 염기서열 분석



Fig. 74. DNA sequence analysis of pCamLacPpR1b vector.

구성된 pCamLacPpR1b 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 74에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter에 pathogen-related protein의 신호서열이 GFP 유전자와 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

(라) *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

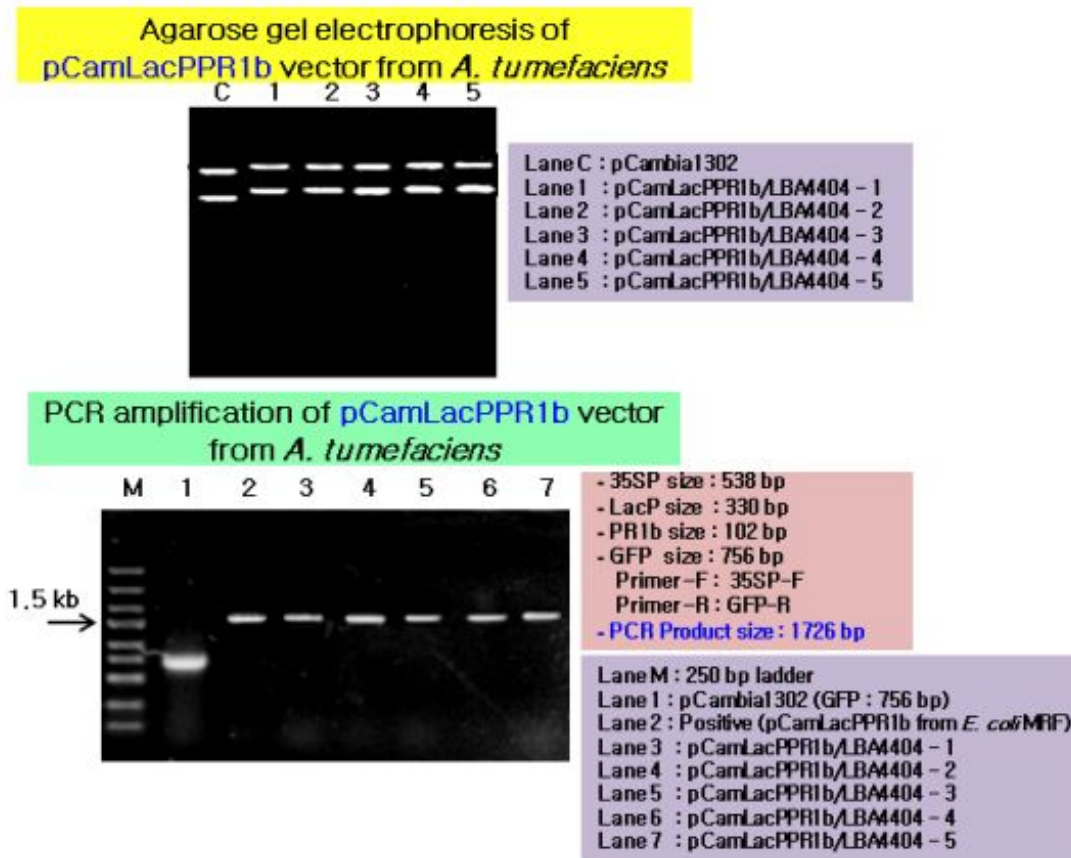


Fig. 75. Introduction of the pCamLacPpR1b vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and Its PCR amplification.

새송이버섯에 구성된 pCamLacPpR1b 분비벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPpR1b 분비벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPpR1b 분비벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CaMV 35SP forward PCR primer: 5' GGG GAA TTC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA 3'와, GFP reverse PCR primer: 5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 75에서 보는 바와 같이 약 1.73 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

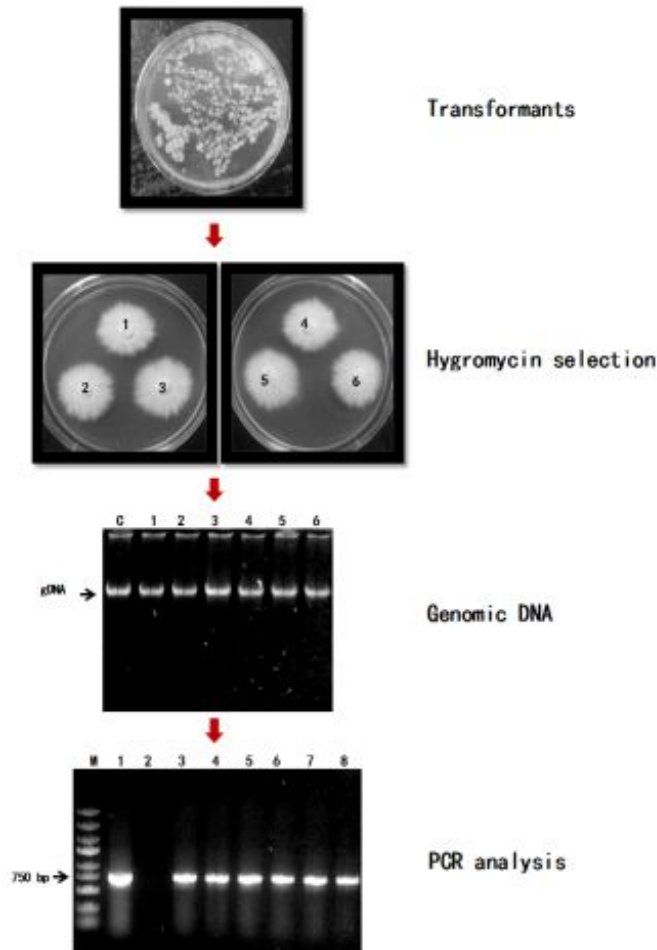


Fig. 76. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPpR1b vector and Selection of transformants by PCR

pCamLacPpR1b 분비벡터를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPpR1b vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 76에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 GFP-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 750 bp 유전자를 확인하였고, laccase promoter와 pathogen-related protein의 신호서열에 의한 녹색형광 단백질 (Green fluorescent protein)의 발현 및 분비 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCamLacPpR1b)의 GFP 분석

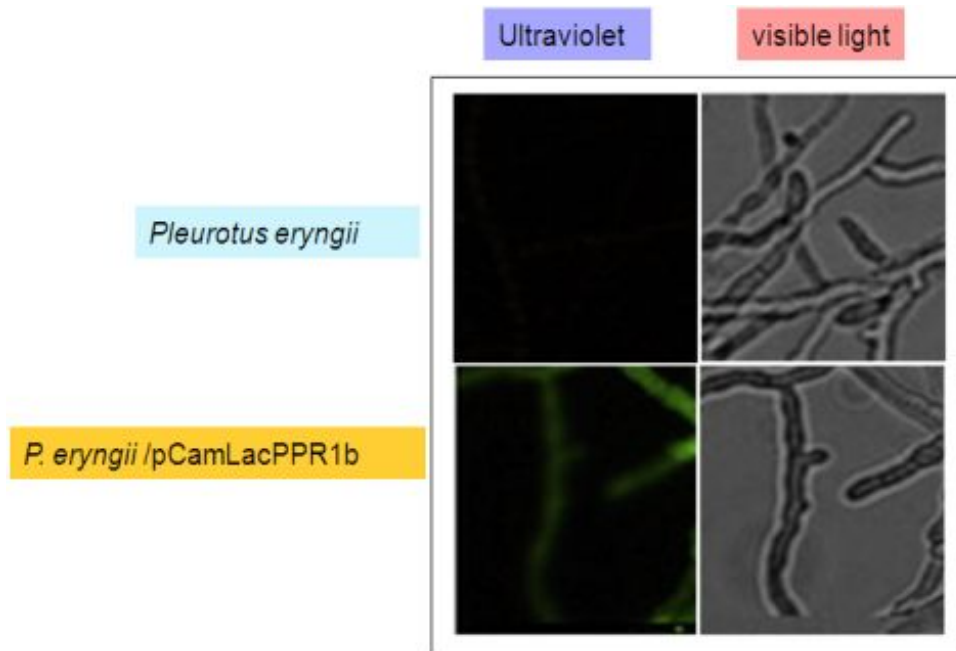


Fig. 77. GFP analysis for mycelia of transgenic *Pleurotus eryngii* containing pCamLacPpR1b vector.

pCamLacPpR1b 분비벡터가 새송이버섯 염색체로 도입되어 확인된 *P. eryngii*/pCamLacPpR1b 형질전환체를 hygromycin (30 ug/ml)을 함유하는 PDB 배지에서 충분히 성장을 시킨 다음, 0.9% 생리 식염수로 희석한 다음, 슬라이드 글라스에 균사체를 올려놓고 앞에 기술한 방법에 따라 균사체에서 GFP 발현 여부를 조사한 결과 Fig. 77에서 보는 바와 같이 control 새송이버섯과 비교한 결과 GFP 단백질이 약하게 발현 되는 것이 확인되었지만, laccase promoter 보다는 적은 양의 녹색형광단백질이 *P. eryngii*/pCamLacPpR1b 형질전환체에서 발현되는 것을 확인하였다.

(6) Laccase promoter 및 laccase 분비서열을 포함하는 벡터구성 (pCamLacPS)
 (가) 클로닝 전략

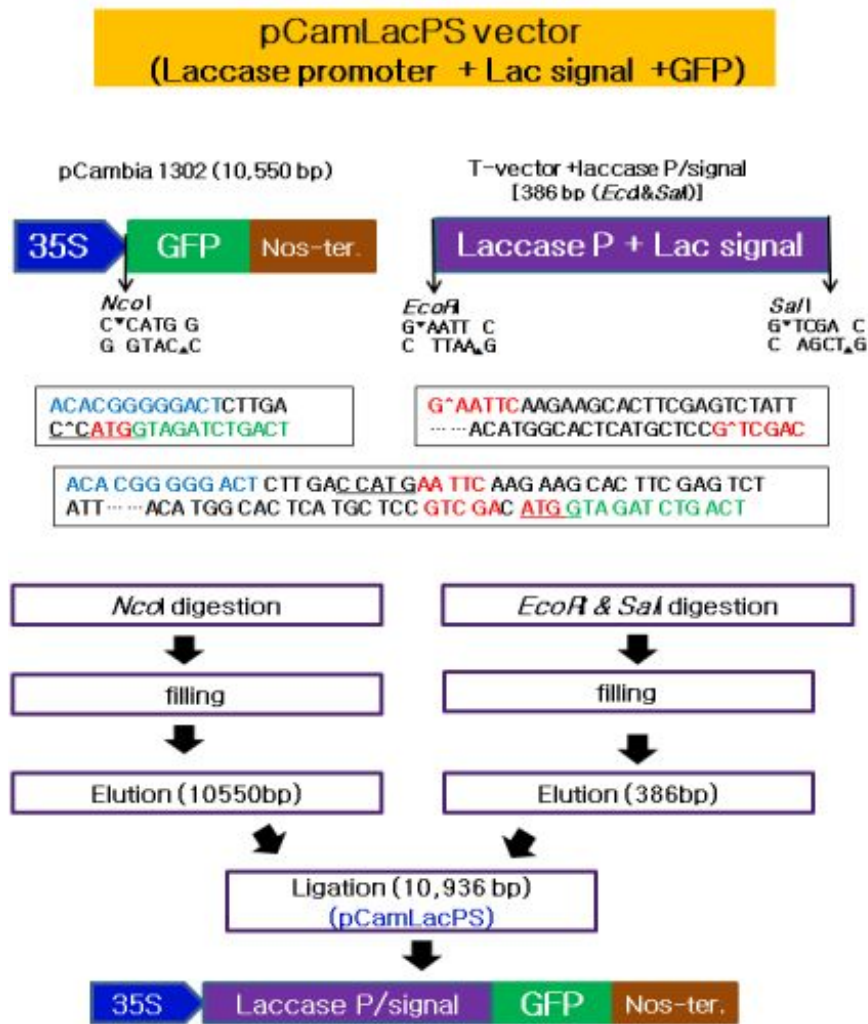


Fig. 78. Cloning strategy for construction of pCamLacPS vector containing laccase promoter and signal sequence.

Fig. 78에서 보는 바와 같이 GFP 발현벡터인 pCambia1302 vector (10.5 kb)의 CaMV 35S promoter 3'-말단에 laccase promoter와 69 bp laccase protein의 신호서열 (ATGTTTCCAG GCGCACGGAT TCTCGCTACG CTTACATTAG CTCTTCACCT TTTACATGGC ACTCATGCT)을 도입하기 위하여 pCambia1302 vector는 *NcoI* 제한효소로 절단하고, T-vector에 subcloning 되어 있는 laccase promoter와 signal sequence는 *EcoRI*과 *SalI* 제한효소로 절단한 다음, 각각의 DNA에 Klenow 효소를 처리하여 3'-말단 부위를 blunting 하여 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 pCamLacPS 분비벡터 (10.94 kb)를 screening 하였다.

(나) 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

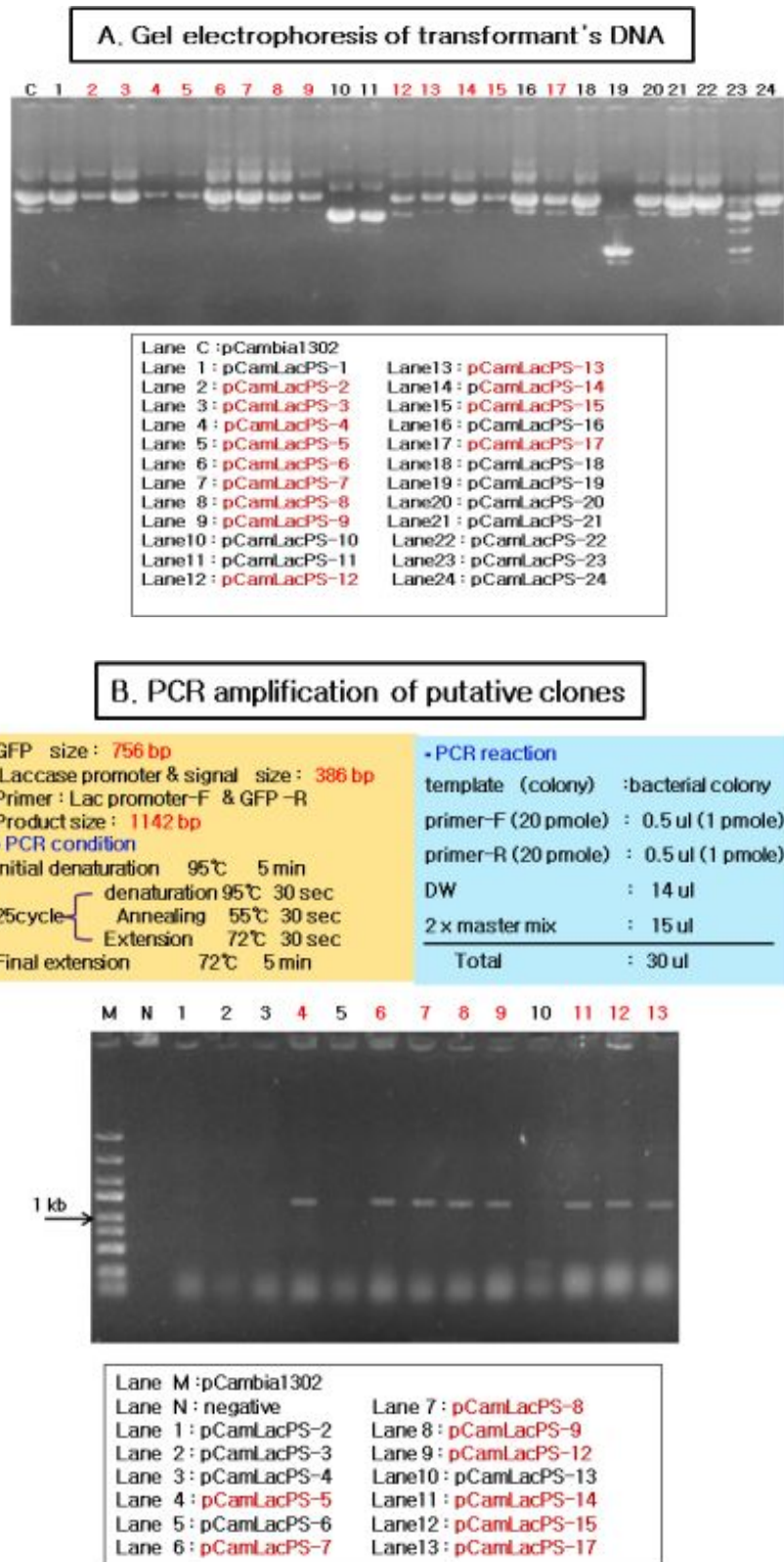


Fig. 79. Agarose gel electrophoresis of putative clones and PCR amplification.

대장균 형질전환체로부터 alkaline lysis 방법에 의해 추출된 plasmid DNA는 전기영동하에서 size selection에 의해 control DNA (pCambia1302)보다 커진 클론들 (pCamLacPS-2, 3-9, 12-15, 17)을 선별하고, laccase forward PCR primer (5' GGG GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3')와 GFP reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')를 이용하여 PCR을 통해 Fig. 79에서 보는 바와 같이 약 1.14 kb의 DNA 단편을 pCamLacPS-5,7-9,12,14,15,17 클론들에서 확인 하였고, 따라서 상기 클론들은 laccase promoter에 laccase protein의 신호서열이 도입된 것으로 확인되었으며, pCamLacPS 분비백터로 명명하였다.

(다) 염기서열 분석



Fig. 80. DNA sequence analysis of pCamLacPS vector.

구성된 pCamLacPS 분비백터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 80에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter에 laccase protein의 신호서열이 GFP 유전자와 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

(라) *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

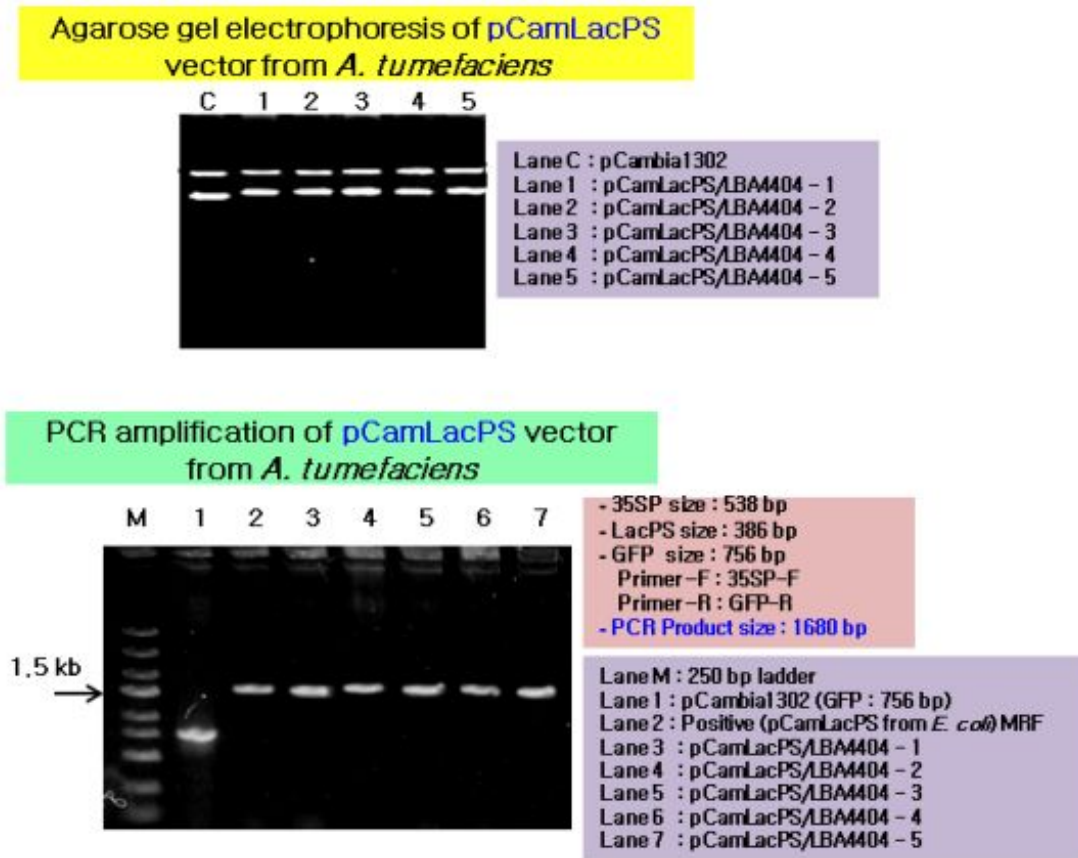


Fig. 81. Introduction of the pCamLacPS vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and Its PCR amplification.

새송이버섯에 구성된 pCamLacPS 분비벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPS 분비벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPS 분비 벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CaMV 35SP forward PCR primer: 5' GGG GAA TTC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA 3'와 GFP reverse PCR primer: 5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 81에서 보는 바와 같이 약 1.68 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

(마) 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

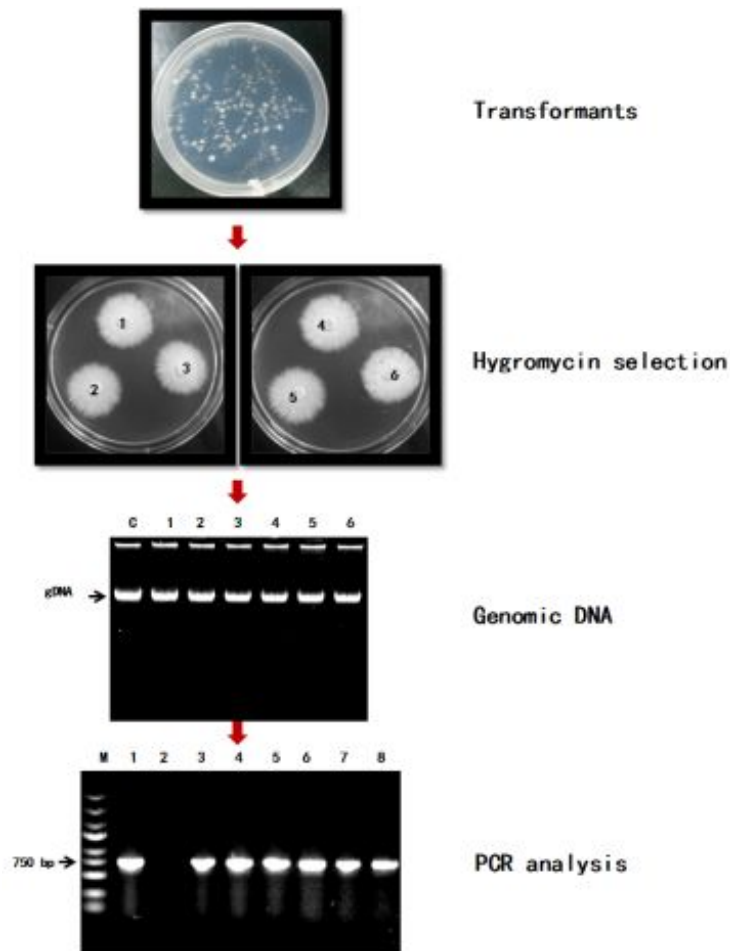


Fig. 82. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPS vector and Selection of transformants by PCR.

pCamLacPS 분비백터를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielsse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPS vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 82에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 GFP-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 750 bp 유전자를 확인하였고, laccase promoter와 laccase 신호서열에 의한 녹색형광 단백질 (Green fluorescent protein)의 발현 및 분비 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

(바) 새송이버섯의 형질전환체 (pCamLacPS)의 GFP 분석

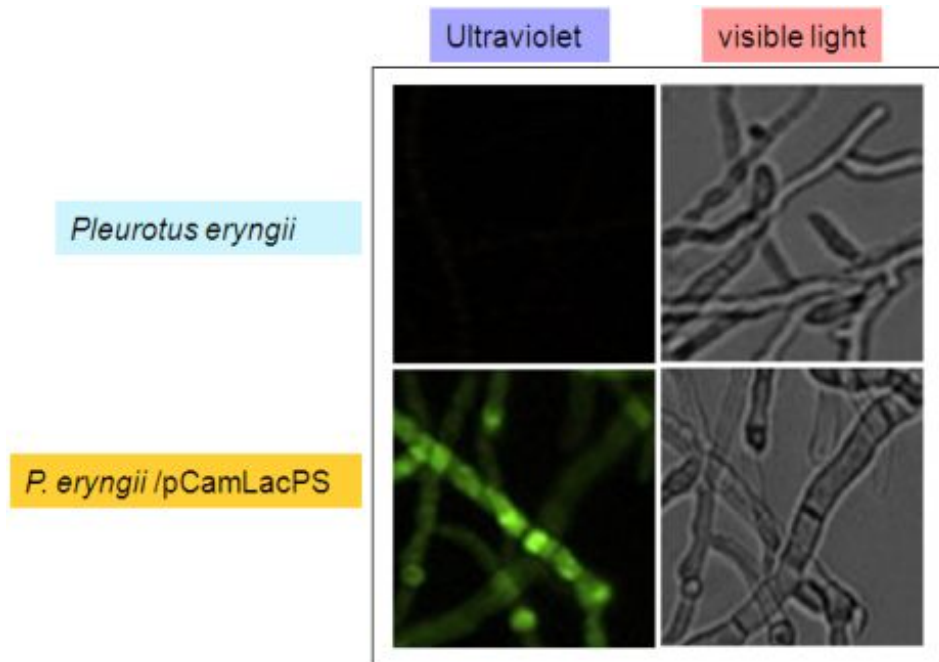


Fig. 83. GFP analysis for mycelia of transgenic *Pleurotus eryngii* containing pCamLacPS vector.

pCamLacPS 분비백터가 새송이버섯 염색체로 도입되어 확인된 *P. eryngii*/pCamLacPS 형질전환체를 hygromycin (30 ug/ml)을 함유하는 PDB 배지에서 충분히 성장을 시킨 다음, 0.9% 생리 식염수로 희석한 다음, 슬라이드 글라스에 균사체를 올려놓고 앞에 기술한 방법에 따라 균사체에서 GFP 발현 여부를 조사한 결과 Fig. 83에서 보는 바와 같이 control 새송이버섯과 비교한 결과 GFP 단백질이 선명하게 발현 되는 것이 확인되었으며, CaMV promoter 보다는 효율적으로 녹색형광단백질이 *P. eryngii*/pCamLacPS 형질전환체에서 발현되는 것으로 나타났지만, 배양액으로 분비 여부는 확인 실험 중에 있다. 그러나 외래 유용유전자의 extracellular 분비를 위하여 CaMV promoter에 신호서열이 도입된 vector 보다는 laccase promoter와 laccase 신호서열 및 pR1b 신호서열로 구성된 발현백터에 유용유전자를 도입하였으며, 형질전환 새송이버섯 균사체 및 자실체를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

타. Laccase promoter 및 Lac promoter/분비서열을 포함하는 벡터로 유용유전자 도입 (Intracellular expression)

(1) Laccase promoter를 포함하는 pCamLacP vector로 유용유전자 도입
(가) 클로닝 전략

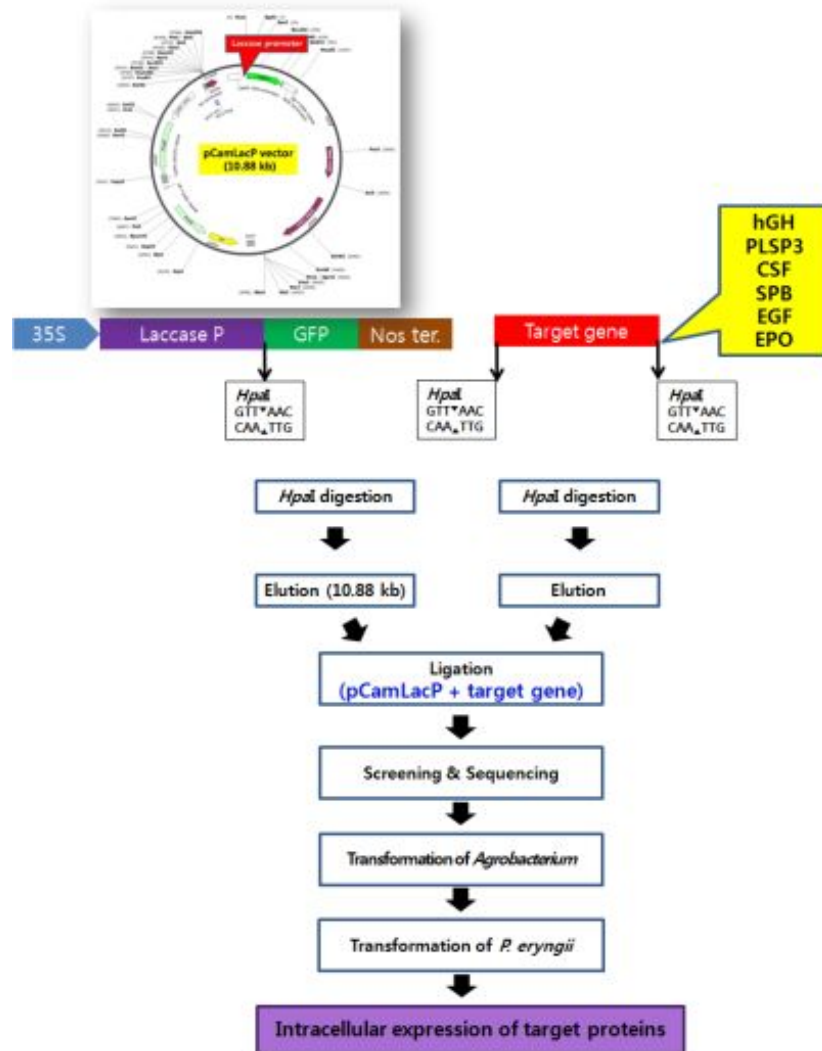


Fig. 84. Cloning strategy of foreign genes into pCamLacP containing laccase promoter.

Fig. 84에서 보는 바와 같이 laccase promoter가 도입된 pCamLacP (10.88kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.88 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 hGH, PLSP3, CSF, SPB, EGF, EPO는 *HpaI*으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacP 발현벡터를 screening 한다.

- (2) Laccase promoter/신호서열을 포함하는 pCamLacPS vector로 유용유전자 도입 (Extracellular expression)
 (가) 클로닝 전략

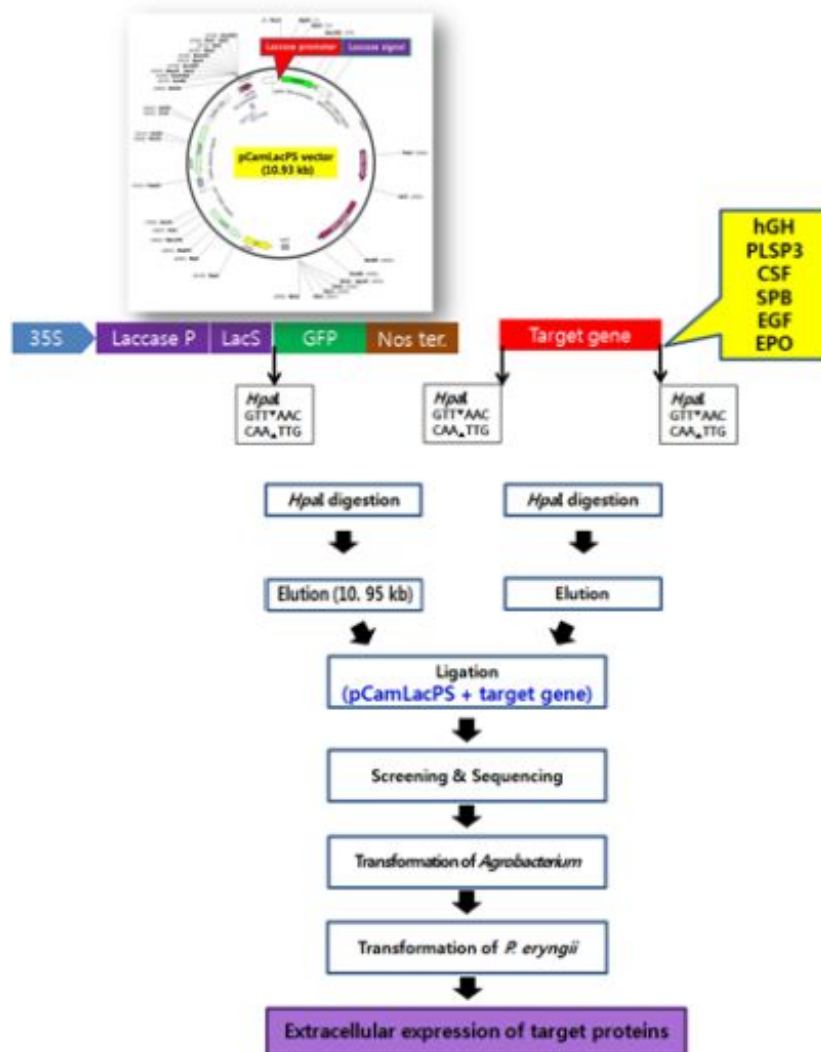


Fig. 85. Cloning strategy of foreign genes into pCamLacPS containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 85에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.95kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPS vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 hGH, PLSP3, CSF, SPB, EGF, EPO는 *HpaI*으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, laccase 신호서열과 frame이 맞도록 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPS 분비백터를 screening 한다.

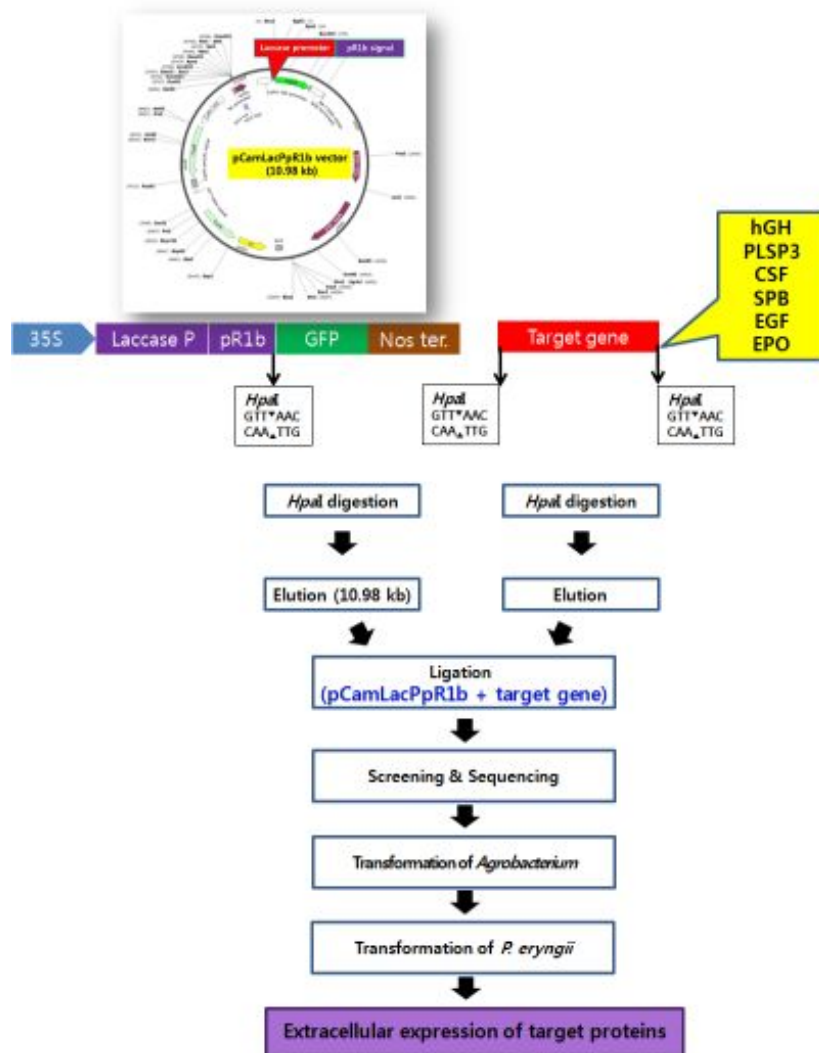


Fig. 86. Cloning strategy of foreign genes into pCamLacPS containing laccase promoter and pR1b signal sequence.

Fig. 86에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPpR1b (10.98kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPpR1b vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.98 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 hGH, PLSP3, CSF, SPB, EGF, EPO는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, laccase 신호서열과 frame이 맞도록 T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPpR1b 분비백터를 screening 한다.

(3) 발현 및 분비를 위한 target 유전자

(가) Human growth hormone

•human growth hormone (hGH) - 570 bp
 •hGH-F1(*HpaI*) 5' GTT AAC ATG TTC CCA ACC ATT CCC TT 3' (26 mer)
 •hGH-F2 (*HpaI*) 5' GTT AAC TTC CCA ACC ATT CCC TTA TC 3' (26 mer)
 •hGH-R1(*HpaI*) 5' GTT AAC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3' (27 mer)

```

T-vector                                     HpaI 1
GCAGTGAGCTCCGGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATTGTTAAACATGT
TCCCAACCATTCCCTTATCCAGGCTTTTCGACAACGCTATGCTCCGCCTCG
TCGCCTGTACCAGCTGGCATATGACACCTATCAGGAGTTGAAGAAGCCTAT
ATCCTGAAGGAGCAGAAGTATTGATTCCTGCAGAACCCGAGACCTCCCTCT
GCTTCTCAGAGTCTATTCCAACACCTTCCAACAGGGTGAACGAGCAGAA
ATCTAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTG
GAGCCCGTGCAGCTCCTCAGGAGCGTCTTCGCCAAGAGCCTGGTGTATGGCG
CCTCGGACAGCAACGCTATCGCCACCTGAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCA
AACGCTGATGTGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGAGATCTTC
AATCAGTCCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACAACGATGACGCAGTGC
TCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTGCA
GACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTC
TAGGTTAAACAATCACTAGTGAATTCGGCGCCGCTGCAGGTCGAC
HpaI                                     T-vector
    
```

hGH

(나) PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)

•Serine protease (PLSP3) - 690 bp
 •PLSP3-F1 (*HpaI*) 5' GTT AAC ATG ATT GTA GGA GGC CAG GAC 3' (27 mer)
 •PLSP3-F2 (*HpaI*) 5' GTT AAC ATT GTA GGA GGC CAG GAC GCC 3' (27 mer)
 •PLSP3-R1 (*HpaI*) 5' GTT AAC TTA GTT GAT GTT TCC TAT CCA GTC 3' (30 mer)

```

T-vector                                     HpaI 1
GCAGTGCAGCTCCGGCCGCATGGCGCCGCGGAATTCGATTGTTAAACATG
ATTGTAGGAGGCCAGGACGCCAGGCAAGGTGAATCCCTGGCAGGTGGGCA
TGAGAAGAAGCACAAGCTCCCTTTTCTGTGGTGGCATCGTCATCGGTACAG
ATGGATCATGTCTGCTGCTCACTGTACCGATAGAGAACTGTTTCCAATCTG
ATCCTAACAGTTGGAGACCAACCATAATGACAACGAAAGGTACAGAGCAGG
ACCTCAGGTTAGCTGCTCAGACAACCCCTGGCTACAATAGAATTAAGTCT
TGACAACGACATTTCTGCTGCAACGTCACCGCCATCGGCTAAATGCG
GACGTTGTTGCTGCATGTTCTCCAGCTGACAGTGACTTTACTGGCAGAACTG
CTGTGTGTCTGGATGGGAACTCTAAGATCTGGTGGACCTTGCTGTCTAC
CCAGCTGAGTACGTACAGGTGCCTGTGATCAGTAACGCGAGTGAATTC
GTAGATTACCCAGGTGACATCAGAGATGGTATGCTCTGTGCTGGTACCCTT
ACAACCCGACGCTTGGCAGGGAGATTCGGTGGCCCTGGTGGTGAAGAC
TAGCGGCTTTTCCAAGTCATCGGTATCGTGTCTTGGGCATTGGATGTGCT
TCTGATTATGCTGGAGTATACGCCAGGGTACCACCTACATGGACTGGATAG
GAAACATCAACTAAGTTAAACAATCACTAGTGAATTCGGCGCCGCTGCAGGT
CGAC                                     HpaI                                     T-vector
    
```

PLSP3

(㉔) Colony stimulating factor

•Granulocyte Colony stimulating factor (G-CSF) - 0.53 kb
 •CSF-F1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC ATG ACC CCC CTG GGC CCT GC 3' (26 mer)
 •CSF-F2 (*Hpa*I) 5' GTT AAC ACC CCC CTG GGC CCT GCC AG 3' (26 mer)
 •CSF-R1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC TTA TCA GGG CTG CGC AAG GTG G_{3'} (28 mer)

T-vector	<i>Hpa</i> I	1
GAGTCAGCTCCGGCCGCATGGCGCCGCGGGAATTCGATT	GTTAACATGA	
CCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCGAGAGTTCTGCTCAAGTGCTT		
AGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTG		
TGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCGAGGAGCTGGTGTCTCBBGACACT		
CTCTGGGCATCCCTGGGCTCCCTGAGCTCCTGCCGAGCCAGGCCCTGCA		
GCTGGCAGGCTGCTTGAAGCAACTCCATAGCGGCTTTTCTCTACGAGGG		
CTCTGCAGGCCCTGGAAGGATATCCCCGAGTTGGTCCCACCTTGGACA		
CACTGCAGCTGGAGCTGCCGACTTTCACCACCACATCTGGCAGCAGATGGA		
AGAACTGGGAATGGCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCATGCCGGCC		
TTGCCTCTGCTTCCAGGCCGGGAGGAGGGTCTGTTGCTAGCCATC		
TGCAGAGCTTCTGGAGGTGTGTAACGGCTTCTAGCCACCTTGGCAGCC		
CTGAT GTTAAC AATCACTAGTGAATTCGGGCCGCTGCAGGTCGACCAT		
ATG	<i>Hpa</i> I	T-vector

CSF

(㉕) Surfactant protein B

•Surfactant protein B - 0.24 kb
 •SPB-F1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC ATG AAC GGT CCC ATT CCT CTC 3' (27 mer)
 •SPB-F2 (*Hpa*I) 5' GTT AAC AAC GGT CCC ATT CCT CTC CCC 3' (27 mer)
 •SPB-R1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3' (27 mer)

T-vector	<i>Hpa</i> I	1
GCAGTGAGCTCCGGCCGCATGGCGCCGCGGGAATTCGATT	GTTAACATGAAC	
GGTCCATTCTCTCCCTATTGCTGGCTCTGCAGGGCTCTGATCAAGCGTTAA		
CAAGCCATGATCCCAAGGGTGTGCTAGCTGTGGCAGTGGCCAGGTGTGCCG		
GTGGTACCTCTGGTGGCGGGCGGATCTGCCAGTGCCTGGCTGAGCGCTACTCC		
GTCACTTCTGCTCGACAGCTGCTGGGCCGATGCTGCCAGCTGGTCTGCCG		
CTTGTCTCCGGTCTCATGT GAGTTAAC AATCACTAGTGAATTCGGGCCG		
CTGCAGGTCGACCATATGGGA	<i>Hpa</i> I	T-vector

SPB

(㉑) Epidermal growth factor

T-EGF sequence

- Epidermal Growth factor EGF - 0.17 kb
- EGF-F1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC ATG AAT AGT GAC TCT G 3' (21 mer)
- EGF-F2 (*Hpa*I) 5' GTT AAC AAT AGT GAC TCT GAA T 3' (21 mer)
- EGF-R1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC TTA GCG CAG TTC CCA CCA C 3' (24 mer)

T-vector	<i>Hpa</i> I 1
GCAGTGAAGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGGGAATTCGATT	GTTAACATGAATA
GTGACTCTGAATGACTCTGAATGTCCCTGTCCACGATGGTACTGCCTCCATG	
ATGGTGTGTGCATGTATATGAAGCATTGGACAAGTATGCATGCAACTGTGTTGT	
TGGCTACATCGGGAGCGATGTCAGTACCGAGACCTGAAGTGGTGGAACTGCGC	
TAA GTTAACAACTACTAGTGAATTCGGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATAT	
<i>Hpa</i> I	T-vector

EGF

(㉒) Erythropoietin

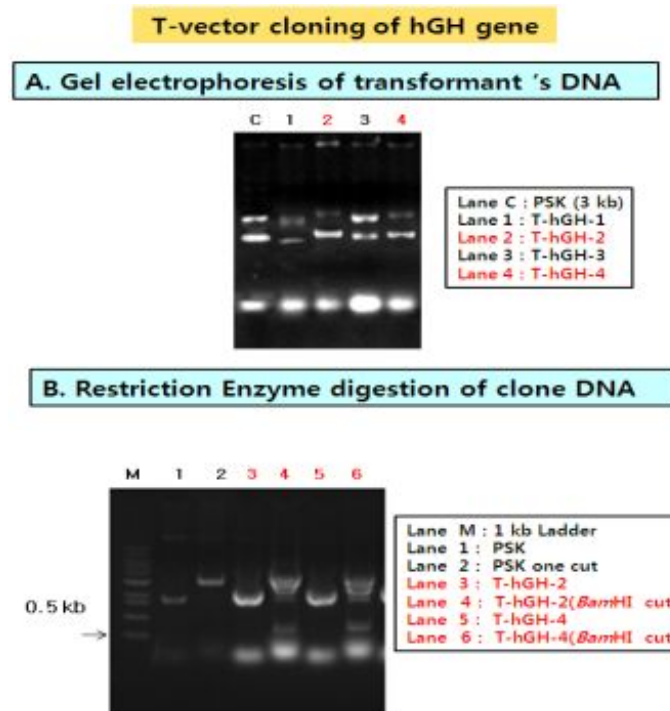
- Homo sapiens erythropoietin (EPO)- 0.5 kb
- EPO-F1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC ATG GCC CCA CCA CGC CTC AT 3' (26 mer)
- EPO-F2 (*Hpa*I) 5' GTT AAC GCC CCA CCA CGC CTC ATC TG 3' (26 mer)
- EPO-R1 (*Hpa*I) 5' GTT AAC TCA TCT GTC CCC TGT CCT GC 3' (26 mer)

T-vector	<i>Hpa</i> I 1
GAGTCAGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGGGAATTCGATT	GTTAACATGG
CCCAGCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTTGG	
GGCCAA GGAGCCGAGAATATCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTT	
GAA TGAGAATACACTGTCCAGAC ACCAAGTTAATTTCTATGCCTGGAA	
GAGGATGGAGGTCGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTG	
CTGTCCGAAGCTGTCTGCGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTCCAGC	
CGTGGGAGCC CCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTAGTGGCCTTCGA	
GCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGA GCCAGAAAGGAAGCCATCTCCC	
CTCCAGATGCGGCTCAGCTGCTCCACTCCBAACAATCACTGCTGACA CTT	
TCCGCAAACTCTTCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAAAGCTGAAGCT	
GTACACAGGGGAGGCTGCAGGAAGGGGACAGAT	TAA GTTAACAACTACTAGT
GAATTCGGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATG	<i>Hpa</i> I
T-vector	

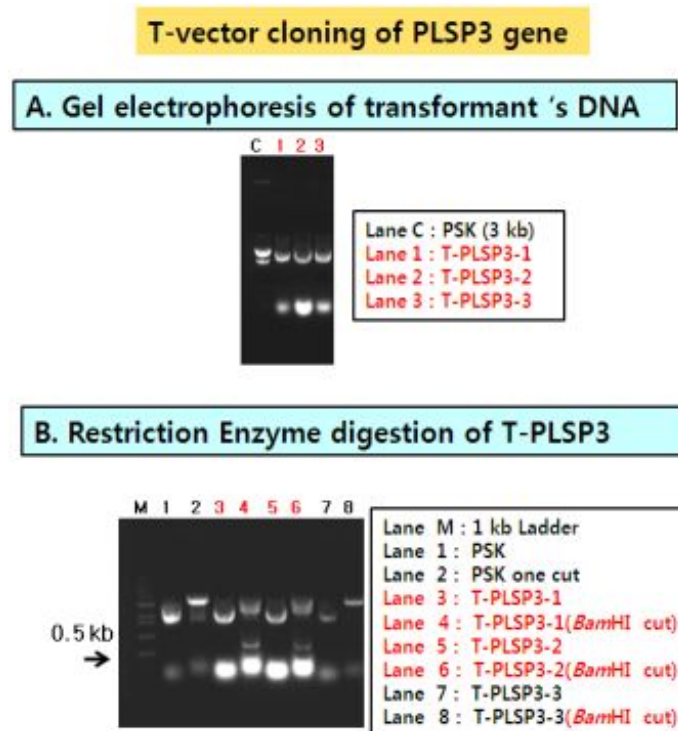
EPO

(4) Target 유전자 증폭 및 분리

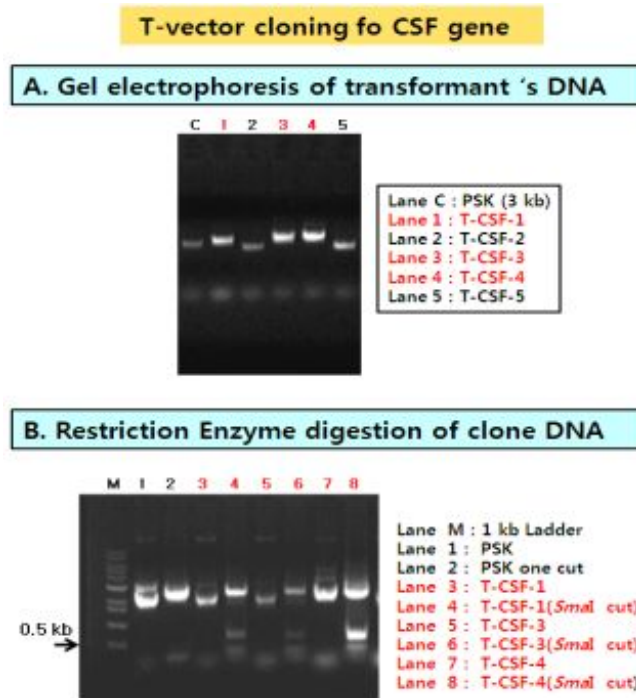
(가) Human growth hormone



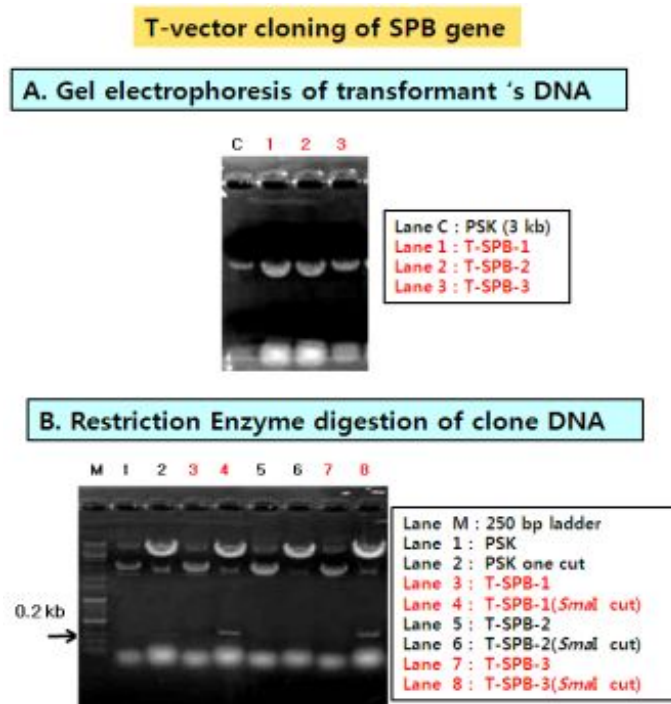
(나) PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)



(다) Colony stimulating factor



(라) Surfactant protein B



(㉑) Epidermal growth factor

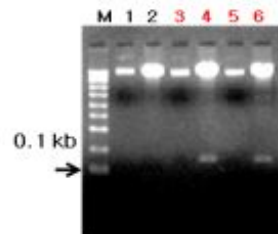
T-vector cloning of EGF gene

A. Gel electrophoresis of transformant 's DNA



Lane C : PSK (3 kb)
Lane 1 : T-EGF-1
Lane 2 : T-EGF-2

B. Restriction Enzyme digestion of clone DNA

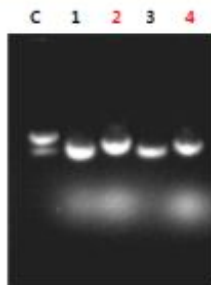


Lane M : 250 bp ladder
Lane 1 : PSK
Lane 2 : PSK one cut
Lane 3 : T-EGF-1
Lane 4 : T-EGF-1(*Sma*I cut)
Lane 5 : T-EGF-2
Lane 6 : T-EGF-2(*Sma*I cut)

(㉒) Erythropoietin

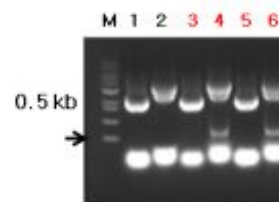
T-vector cloning of EPO gene

A. Gel electrophoresis of transformant 's DNA



Lane C : PSK (3 kb)
Lane 1 : T-EPO-1
Lane 2 : T-EPO-2
Lane 3 : T-EPO-3
Lane 4 : T-EPO-4

B. Restriction Enzyme digestion of clone DNA



Lane M : 1 kb ladder
Lane 1 : PSK
Lane 2 : PSK one cut
Lane 3 : T-EPO-2
Lane 4 : T-EPO-2(*Sma*I cut)
Lane 5 : T-EPO-4
Lane 6 : T-EPO-4(*Sma*I cut)

대장균 형질전환체로부터 alkaline lysis 방법에 의해 추출된 plasmid DNA는 전기영동하에서 size selection에 의해 control DNA보다 커진 클론들을 선별하고, 각각의 유용유전자 DNA 단편을 확인하였으며, DNA 시퀀싱에 의하여 벡터에 삽입된 유전자의 서열을 최종적으로 확인되었다. 유용 유전자들 (hGH, PLSP3, CSF, Surfactant protein, EGF, EPO)을 분리하여 Fig. 84, 85, 86의 클로닝 전략에 따라 재조합 DNA를 구성 하여 단백질을 대량생산할 수 있는 새로운 host/vector 시스템 구축을 위하여 강력한 전사세기를 갖는 promoter와 효율적으로 세포외로 분비시키는 signal sequence를 조합하고 분석하였다.

(5) Laccase promoter를 포함하는 pCamLacP 벡터로 유용유전자 도입

(가) Human growth hormone

① 클로닝 전략

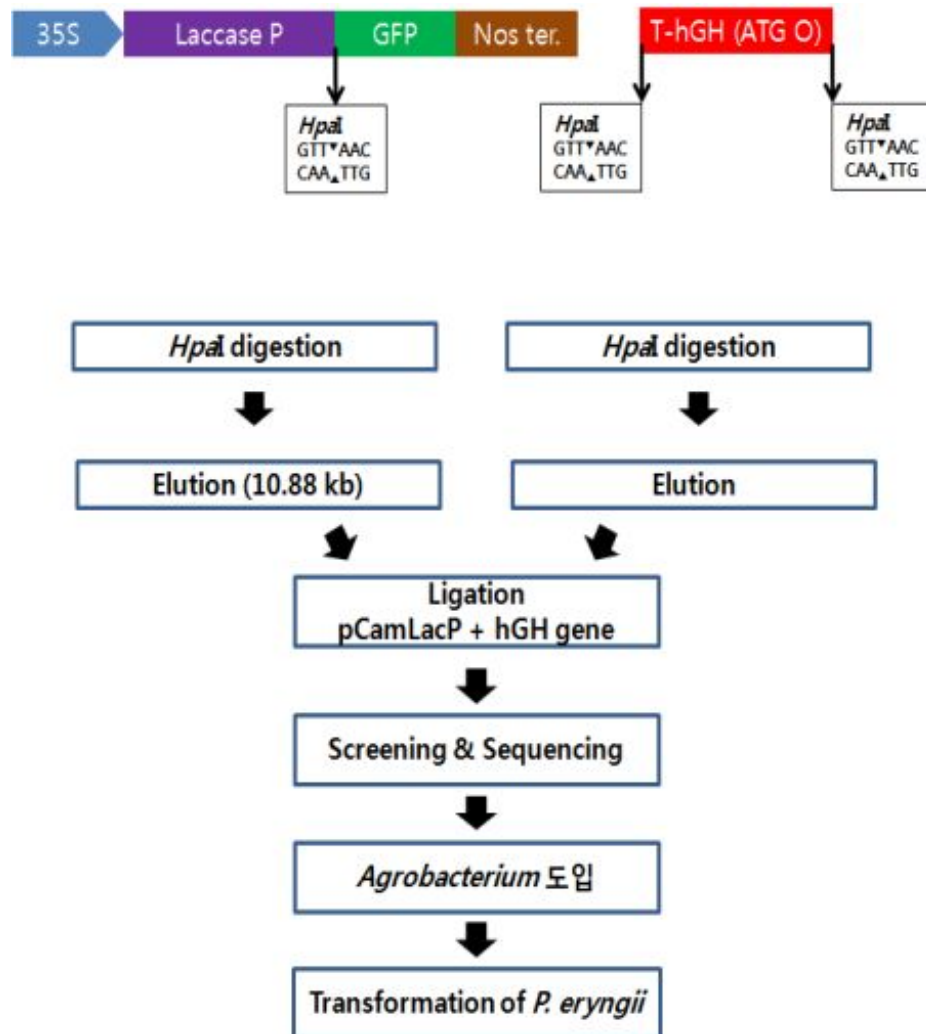


Fig. 87. Cloning strategy of hGH gene into pCamLacP containing Laccase promoter

Fig. 87에서 보는 바와 같이 laccase promoter가 도입된 pCamLacP (10.88 kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.88 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 hGH는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPhGH 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 hGH reverse PCR primer: 5' GTT AAC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 88에서 보는 바와 같이 약 0.87 kb DNA 조각을 확인하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

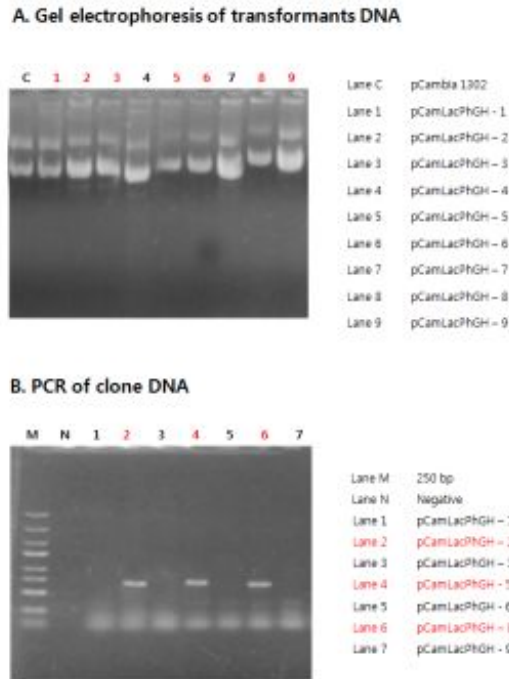


Fig. 88. Cloning of the hGH gene into pCamLacP vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

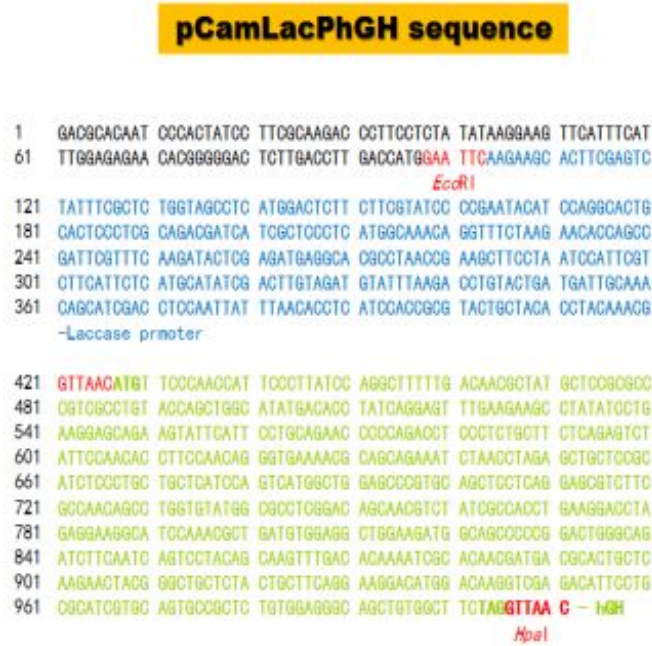


Fig. 89. DNA sequence analysis of pCamLacPhGH vector

구성된 pCamLacPhGH 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 89에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 hGH 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

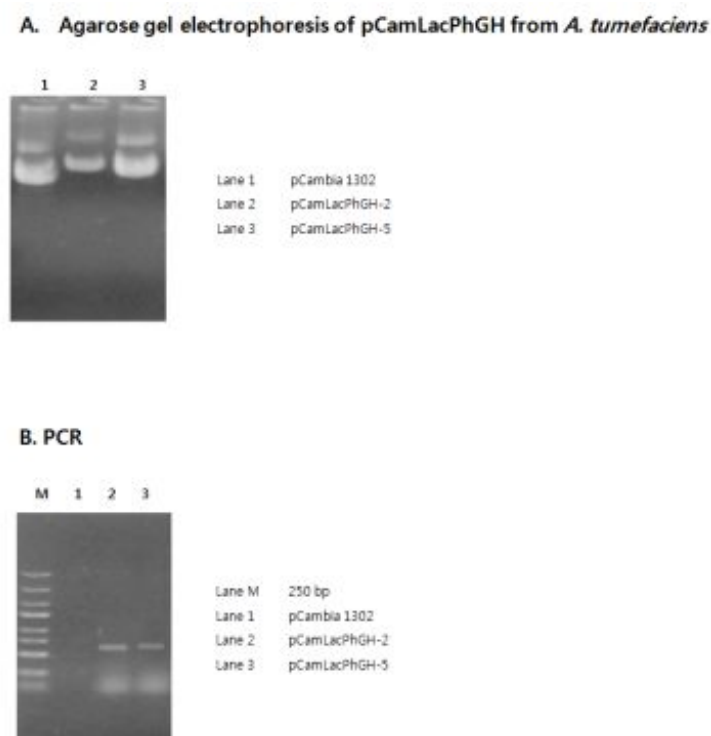


Fig. 90. Introduction of the pCamLacPhGH into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPhGH 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPhGH 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPhGH 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질 전환체를 확보한 다음, hGH Forward PCR primer와 Reverse PCR primer를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 90에서 보는 바와 같이 약 0.57 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

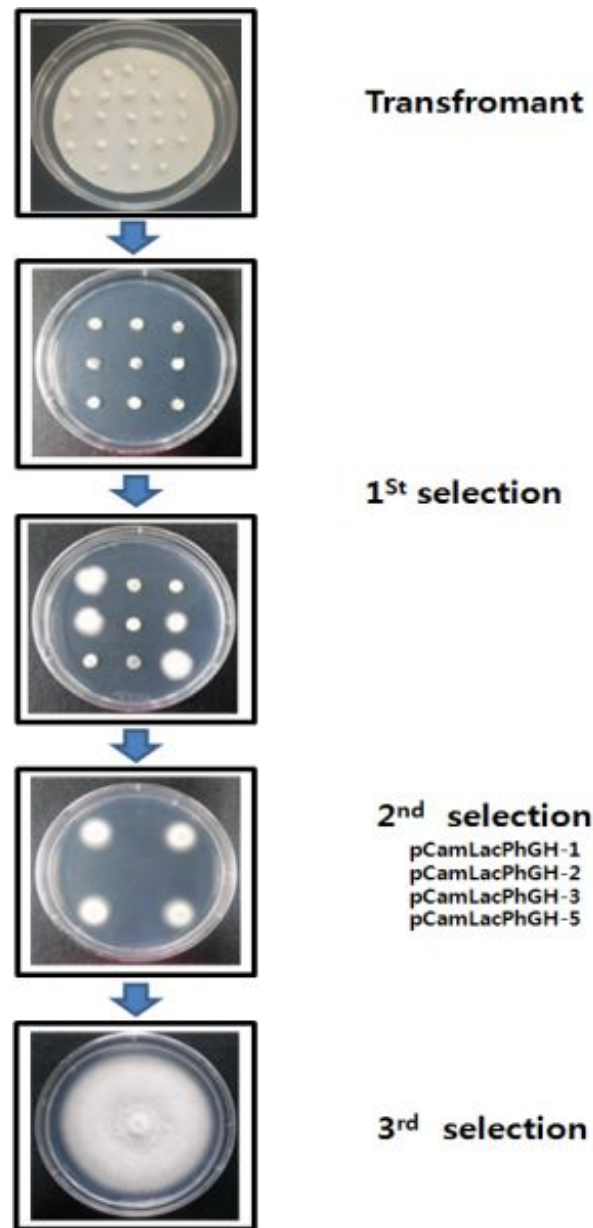


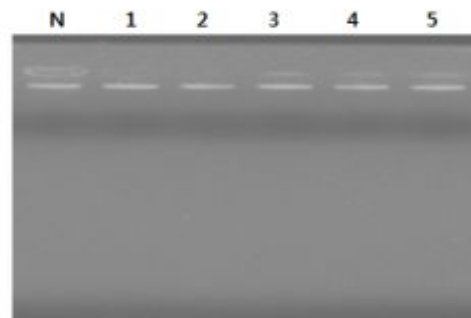
Fig. 91. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPhGH vector and Selection of transformants by antibiotic.

pCamLacPhGH vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPhGH vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 91에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방

법에 따라 genomic DNA를 분리하여 hGH-specific primer (forward 5' GTT AAC ATG TTC CCA ACC ATT CCC TT 3', reverse 5' GTT AAC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3')를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 570 bp 유전자를 확인하였고 (Fig. 92), laccase promoter에 의한 인간 성장 호르몬 단백질 (Human growth hormone)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

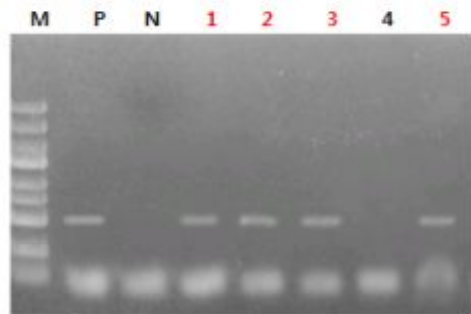
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

A. Extraction of Genomic DNA



Lane N	Negative
Lane 1	pCamLacPhGH-1
Lane 2	pCamLacPhGH-2
Lane 3	pCamLacPhGH-3
Lane 4	pCamLacPhGH-4
Lane 5	pCamLacPhGH-5

B. PCR of Genomic DNA



Lane M	250 bp
Lane P	positive
Lane N	Negative
Lane 1	pCamLacPhGH-1
Lane 2	pCamLacPhGH-2
Lane 3	pCamLacPhGH-3
Lane 4	pCamLacPhGH-4
Lane 5	pCamLacPhGH-5

Fig. 92. PCR analysis of hGH gene in mycelial transformant (pCamLacPhGH). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현

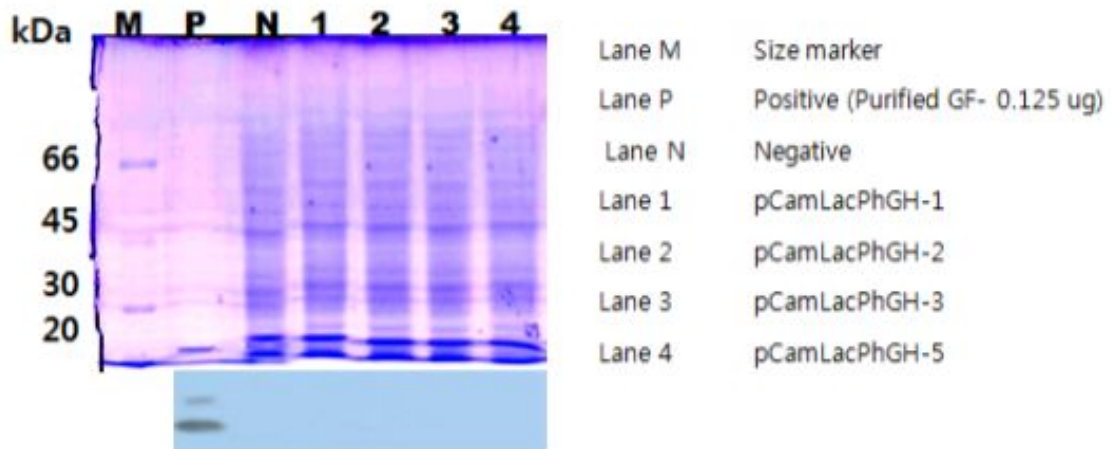


Fig. 93. Expression of the hGH from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPhGH vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPhGH vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 93에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 pCamLacPhGH vector가 도입된 새송이버섯 균사체에서 hGH가 발현되지 않았다.

(나) PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)

① 클로닝 전략

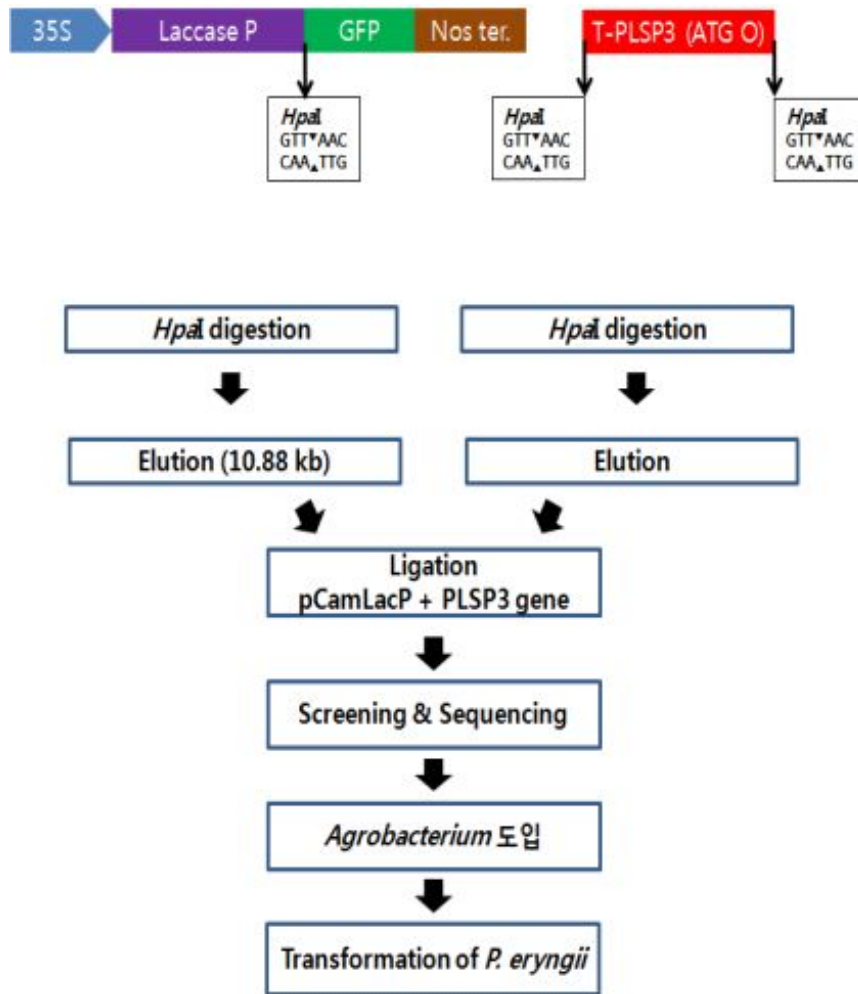


Fig. 94. Cloning strategy of PLSP3 gene into pCamLacP containing Laccase promoter

Fig. 94에서 보는 바와 같이 laccase promoter가 도입된 pCamLacP (10.88 kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.88 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 PLSP3는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPhGH 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 PLSP3 reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA GTT GAT GTT TCC TAT CCA GTC 3'를 이용하여PCR를 한 결과 Fig. 95에서 보는 바와 같이 약 1 kb DNA 조각을 확인하였다. 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

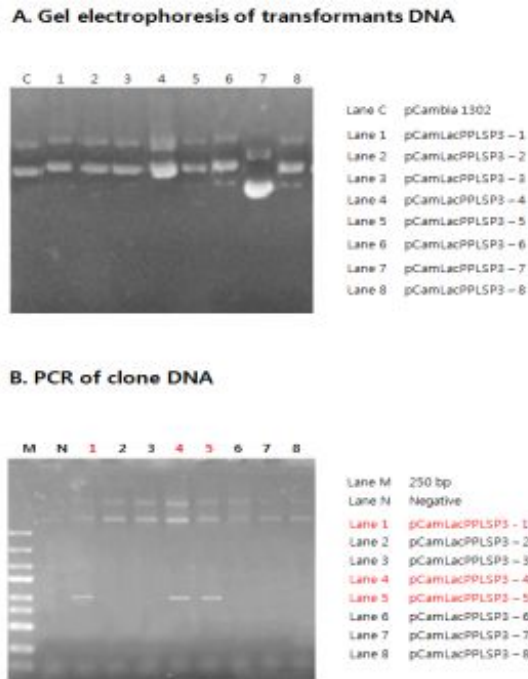


Fig. 95. Cloning of the PLSP3 gene into pCamLacP vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

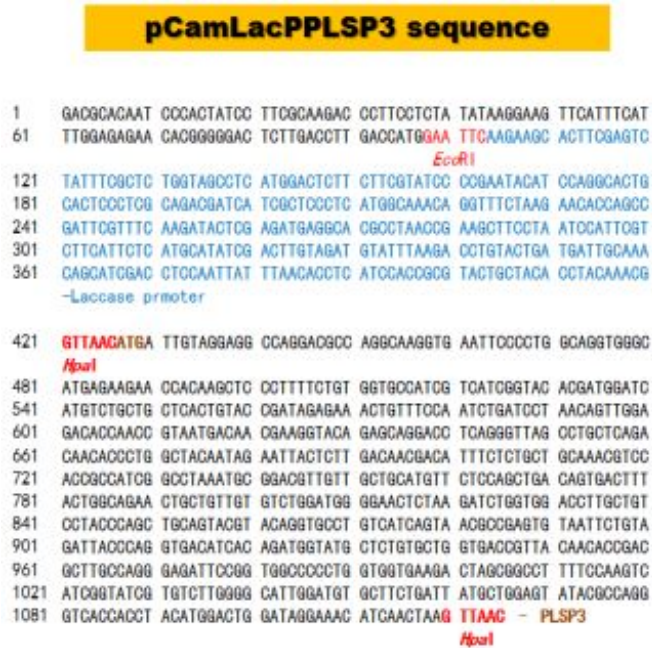


Fig. 96. DNA sequence analysis of pCamLacPPLSP3 vector.

구성된 pCamLacPPLSP3 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 96에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 PLSP3 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

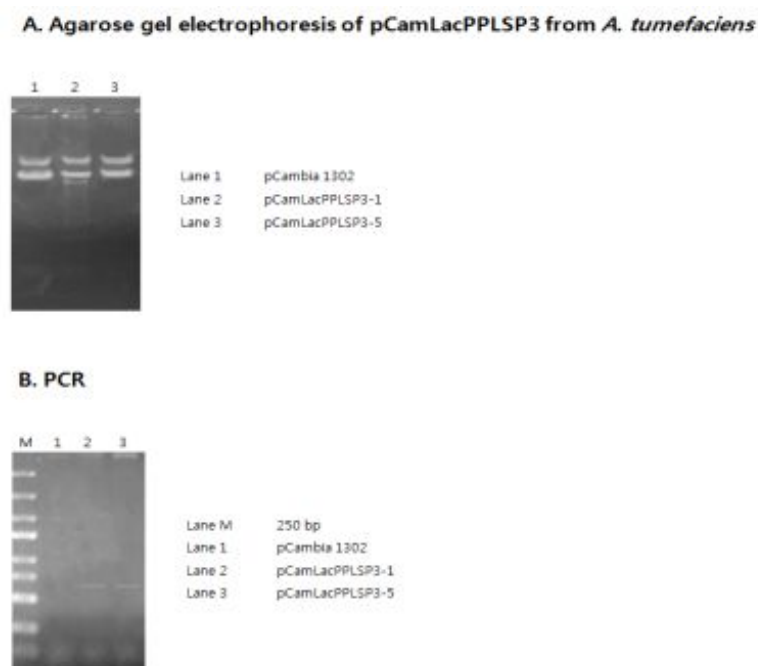


Fig. 97. Introduction of the pCamLacPPLSP3 into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPPLSP3 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPPLSP3 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPPLSP3 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, PLSP3 Forward PCR primer 5' GTT AAC ATG ATT GTA GGA GGC CAG GAC 3'와 Reverse PCR primer 5' GTT AAC TTA GTT GAT GTT TCC TAT CCA GTC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 97에서 보는 바와 같이 약 0.69 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

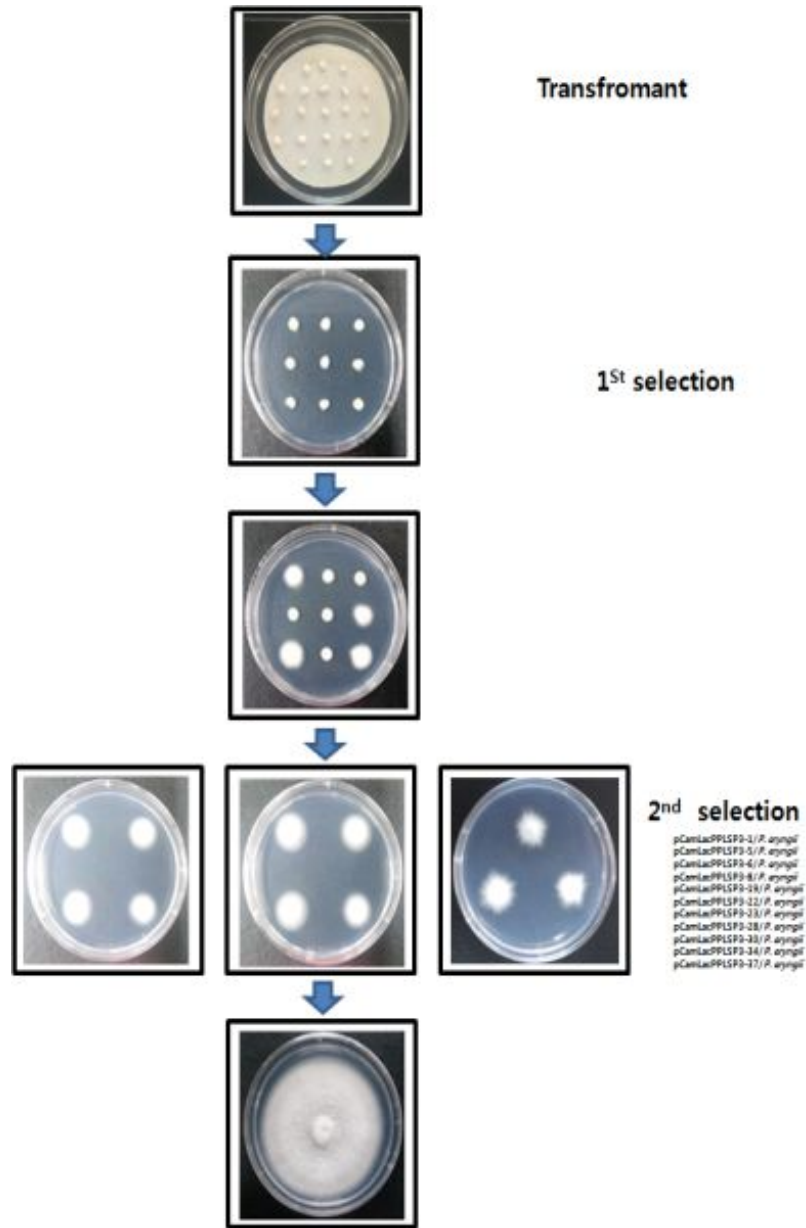


Fig. 98. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPPLSP3 vector and Selection of transformants by antibiotic.

pCamLacPPLSP3 vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPPLSP3 vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 98에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를

30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선발하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 PLSP3-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.69 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 99), laccase promoter에 의한 혈전용해제 단백질 (*Periserrula leucophryna* serine protease, PLSP3)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

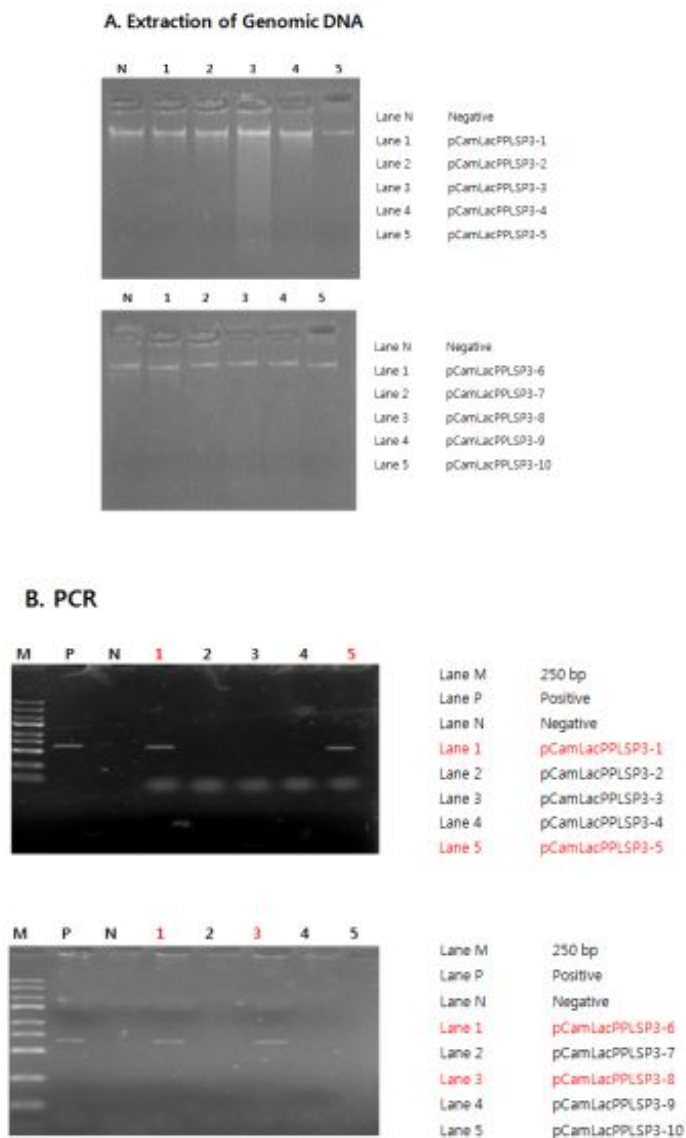


Fig. 99. PCR analysis of PLSP3 gene in mycelial transformant (pCamLacPPLSP3). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 PLSP3 유전자 발현

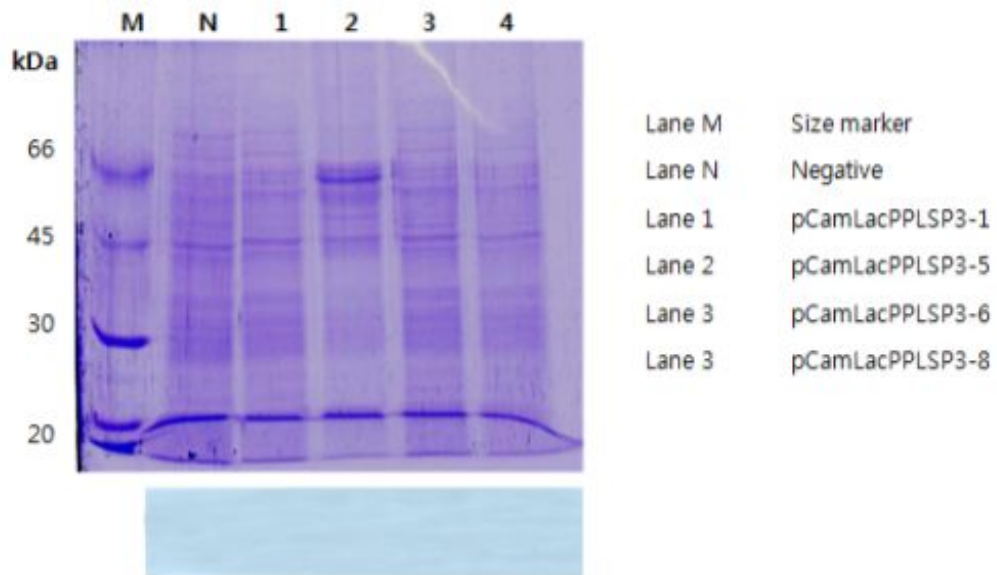


Fig. 100. Expression of the PLSP3 from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPPLSP3 vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPPLSP3 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 100에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 pCamLacPPLSP3 vector가 도입된 새송이버섯 균사체에서 PLSP3 단백질이 발현되지 않았다.

(다) Colony stimulating factor

① 클로닝 전략

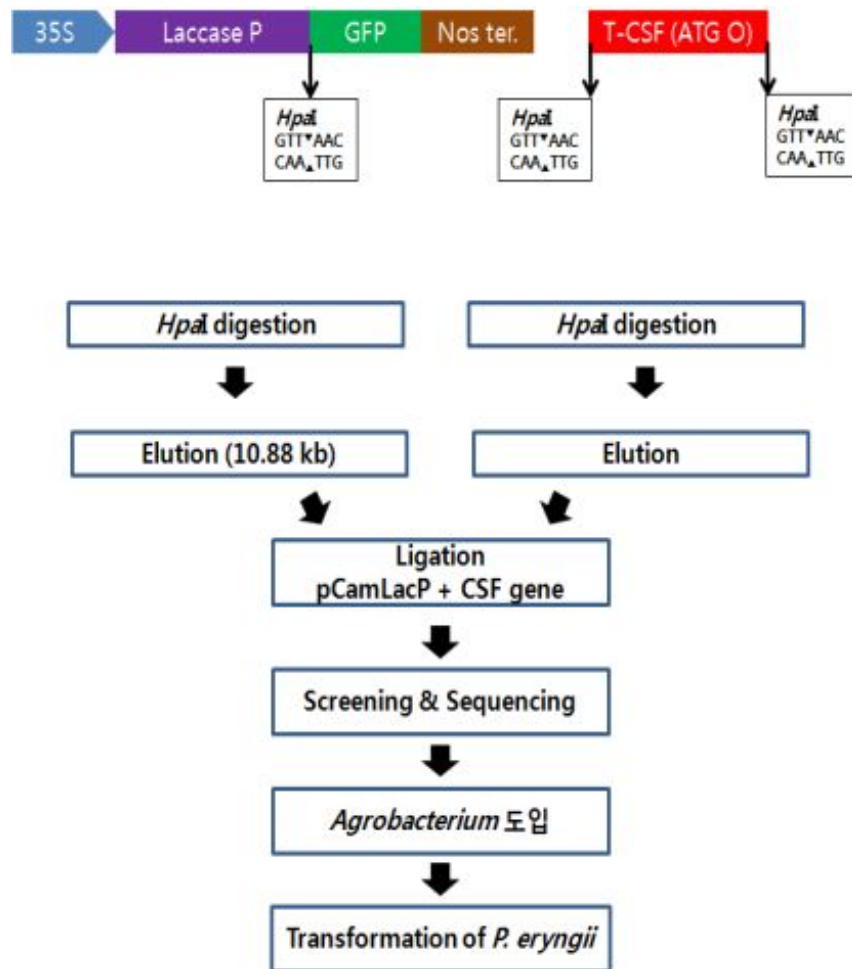


Fig. 101. Cloning strategy of CSF gene into pCamLacP containing Laccase promoter

Fig. 101에서 보는 바와 같이 laccase promoter가 도입된 pCamLacP (10.88 kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.88 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 CSF는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPhGH 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 CSF reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA TCA GGG CTG CGC AAG GTG G 3' 를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 102에서 보는 바와 같이 약 0.84 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

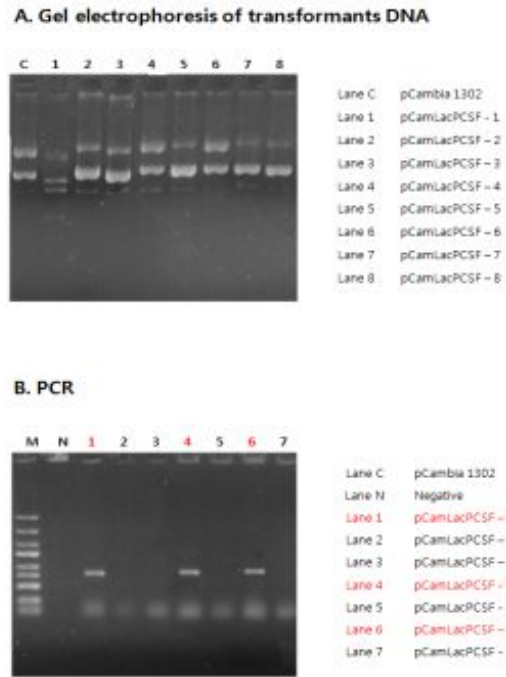


Fig. 102. Cloning of the CSF gene into pCamLacP vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

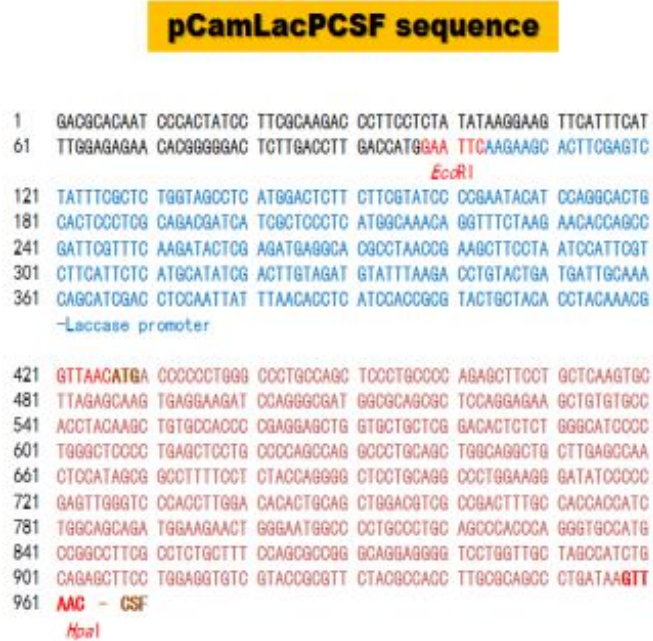


Fig. 103. DNA sequence analysis of pCamLacPCSF vector.

구성된 pCamLacPCSF 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 103에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 CSF 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

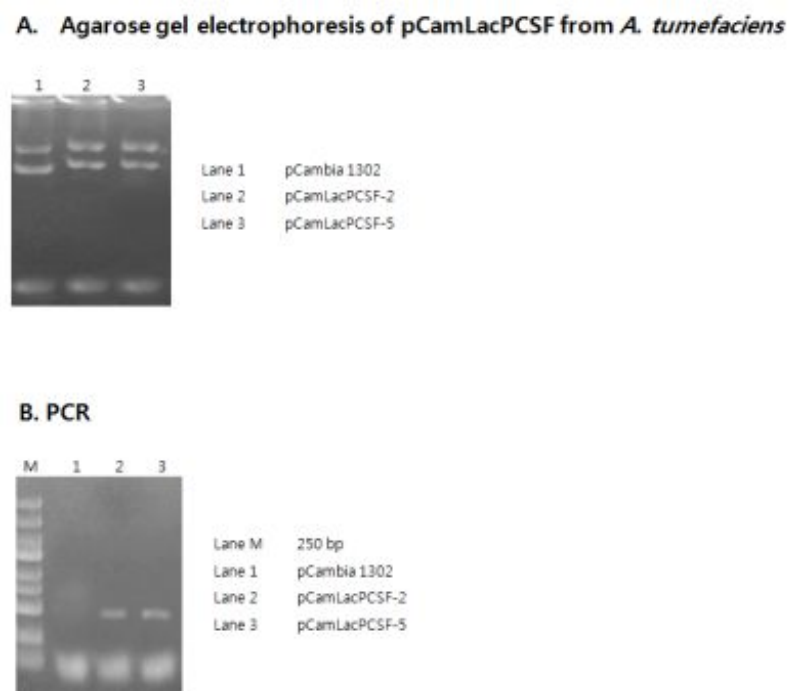


Fig. 104. Introduction of the pCamLacPCSF into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPCSF 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPCSF 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPCSF 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질 전환체를 확보한 다음, CSF Forward PCR primer (5' GTT AAC ATG ACC CCC CTG GGC CCT GC 3')와 Reverse PCR primer(5' GTT AAC TTA TCA GGG CTG CGC AAG GTG G 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 104에서 보는 바와 같이 약 0.53 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

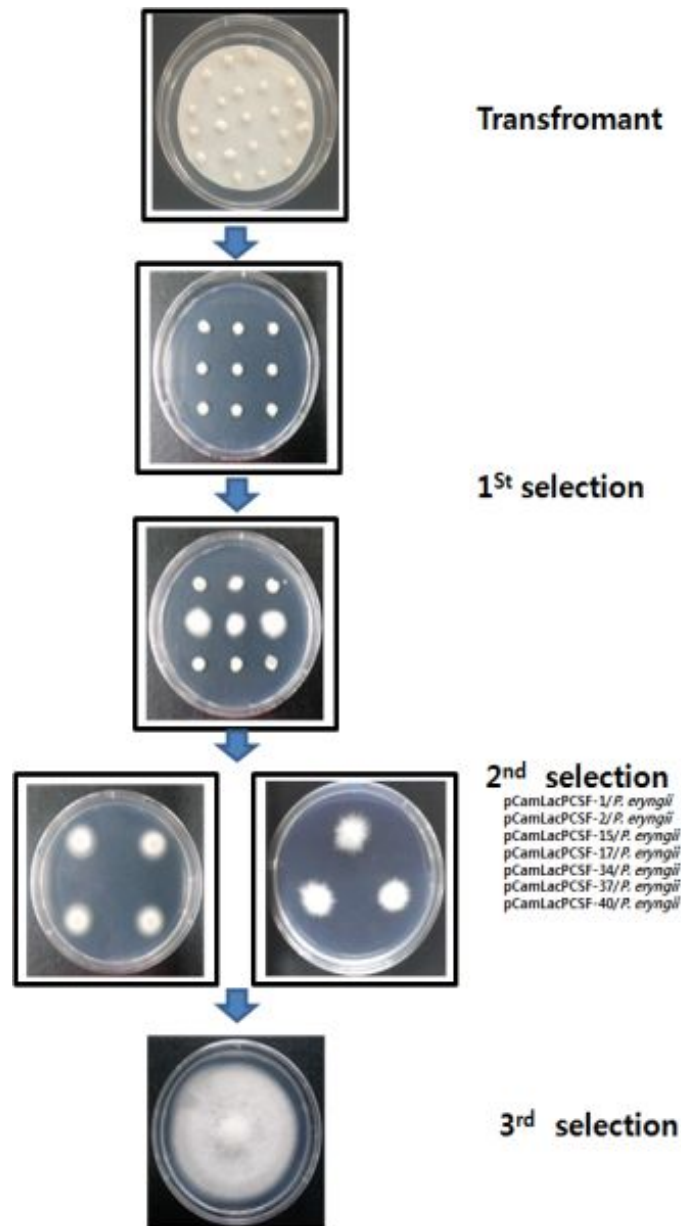


Fig. 105. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPCSF vector and Selection of transformants by antibiotic.

pCamLacPCSF vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPCSF vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 105에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮

겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선발하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 CSF-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 570 bp 유전자를 확인하였고 (Fig. 106), laccase promoter에 의한 과립구 군체 (콜로니) 자극인자 단백질 (Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

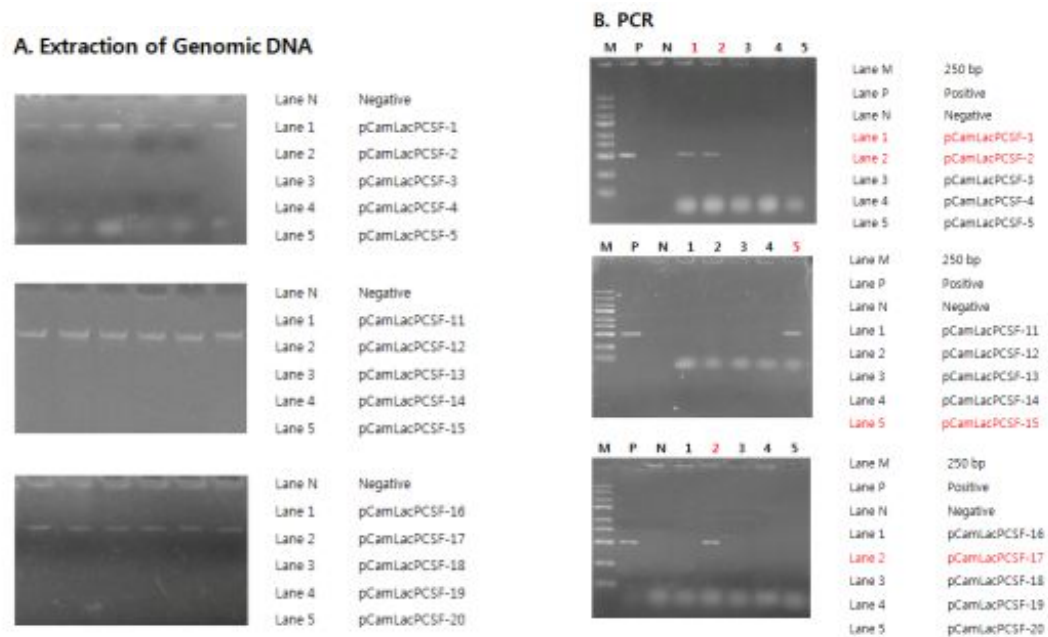


Fig. 106. PCR analysis of CSF gene in mycelial transformant (pCamLacPCSF). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 CSF 유전자 발현

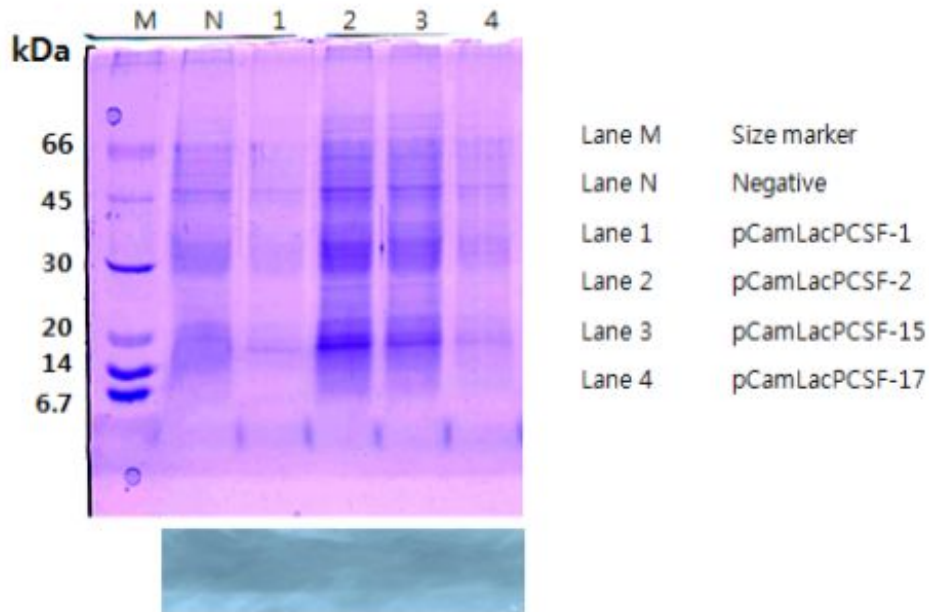


Fig. 107. Expression of the CSF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPCSF vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPCSF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4℃, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 107에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 CSF가 발현되지 않았다.

(라) Surfactant protein B

① 클로닝 전략

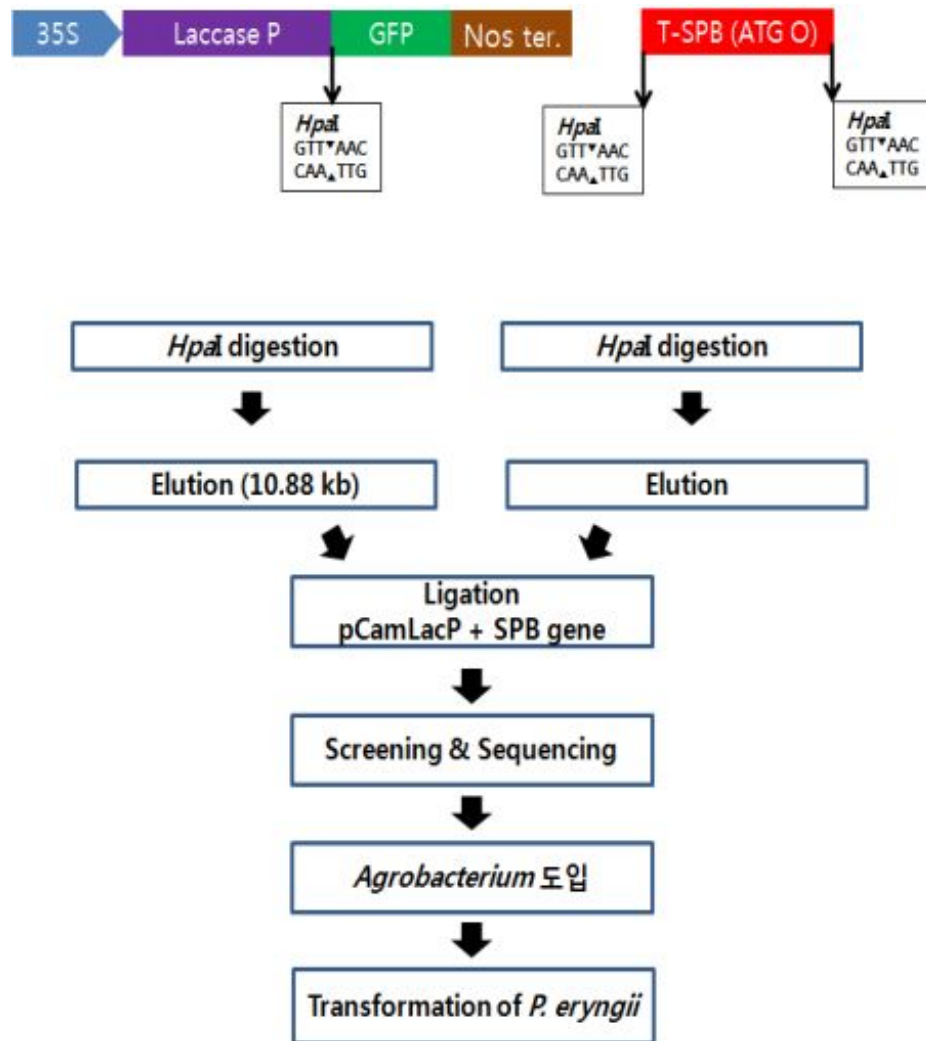


Fig. 108. Cloning strategy of SPB gene into pCamLacP containing Laccase promoter

Fig. 108에서 보는 바와 같이 laccase promoter가 도입된 pCamLacP (10.88 kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.88 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 SPB는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPSPB 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 SPB reverse PCR primer: 5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 109에서 보는 바와 같이 약 0.56 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

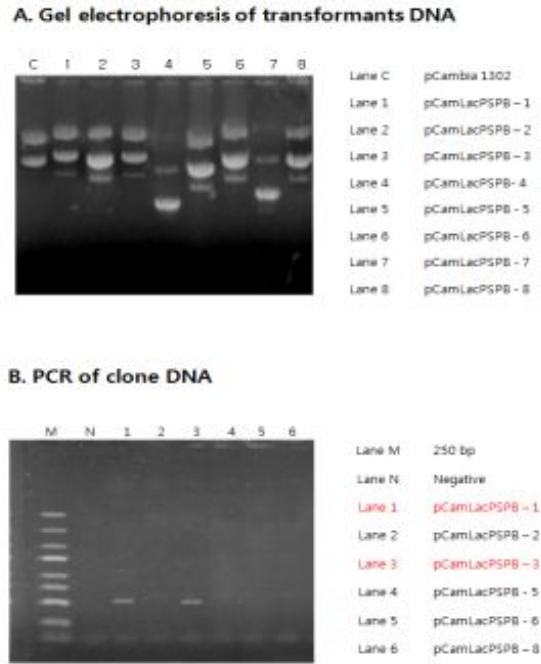


Fig. 109. Cloning of the SPB gene into pCamLacP vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

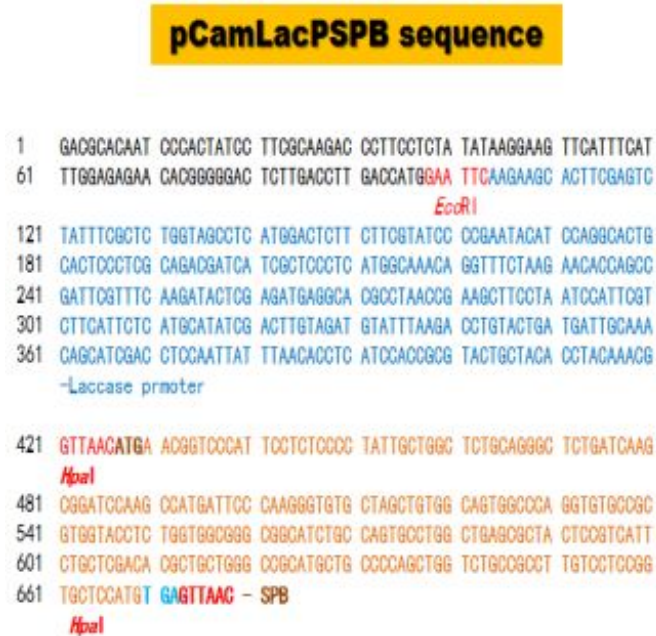


Fig. 110. DNA sequence analysis of pCamLacPSPB vector

구성된 pCamLacPSPB 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 110에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 SPB유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

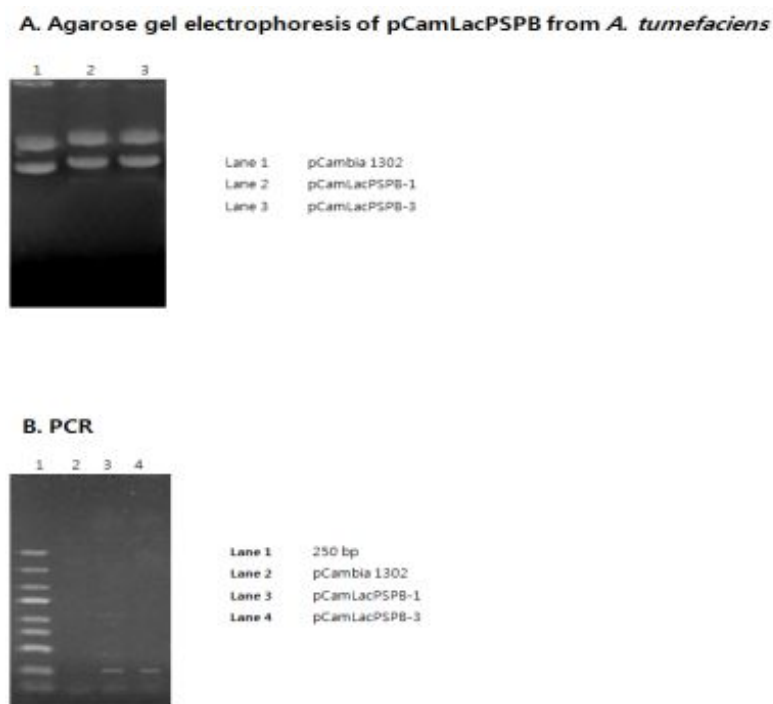


Fig. 111. Introduction of the pCamLacPSPB into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPSPB 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPSPB 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPSPB 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질 전환체를 확보한 다음, SPB Forward PCR primer (5' GTT AAC ATG AAC GGT CCC ATT CCT CTC 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 111에서 보는 바와 같이 약 0.24 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

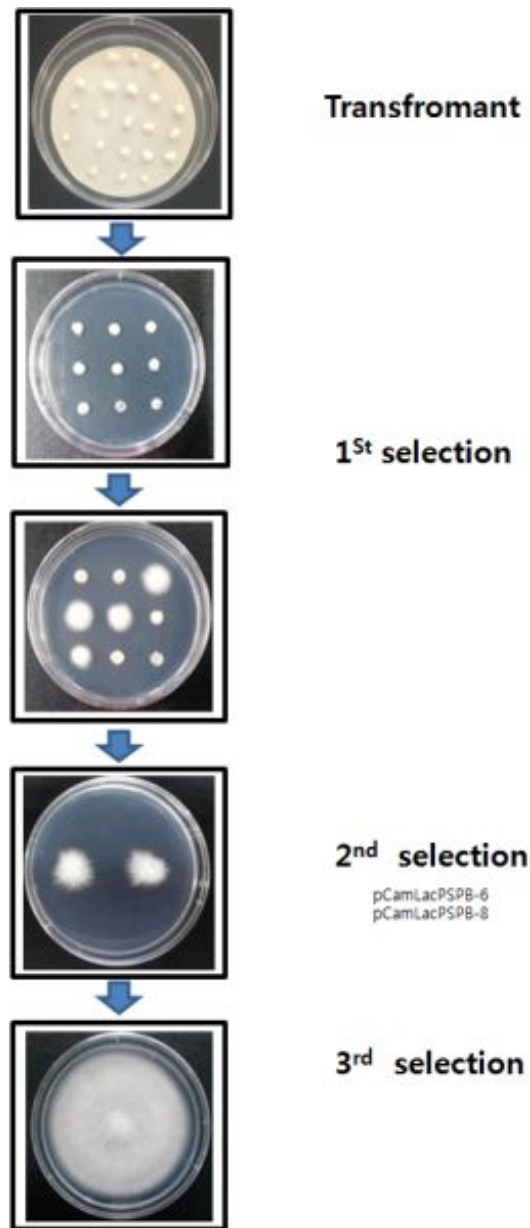


Fig. 112. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPSPB vector and Selection of transformants by antibiotic.

pCamLacPSPB vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPSPB vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 112에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮

겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선발하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 SPB-specific primer (SPB-F 5' GTT AAC ATG AAC GGT CCC ATT CCT CTC 3', SPB-R 5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3')를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 243 bp 유전자를 확인하였고 (Fig. 113), laccase promoter에 의한 표면활성제 단백질 B(Surfactant protein-B, SP-B)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

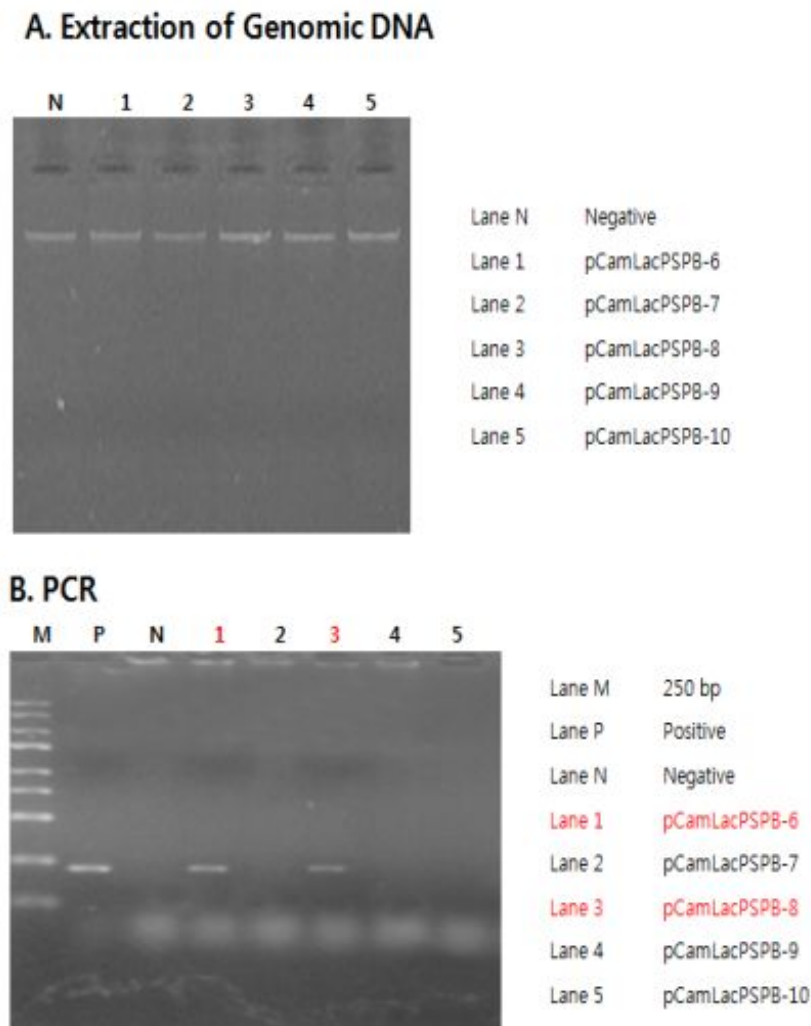


Fig. 113. PCR analysis of SPB gene in mycelial transformant (pCamLacPSPB). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 SPB 유전자 발현

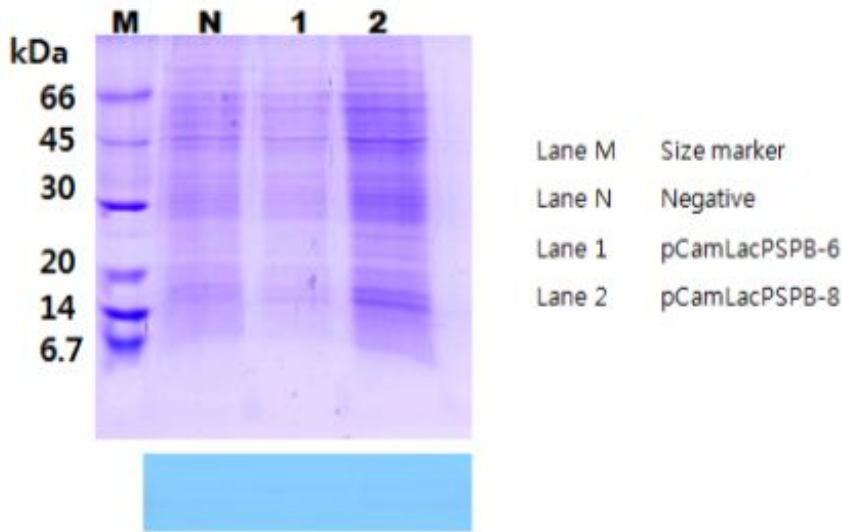


Fig. 114. Expression of the SPB from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSPB vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPSPB vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4℃, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 114에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 SPB 단백질이 발현되지 않았다.

(마) Epidermal growth factor

① 클로닝 전략

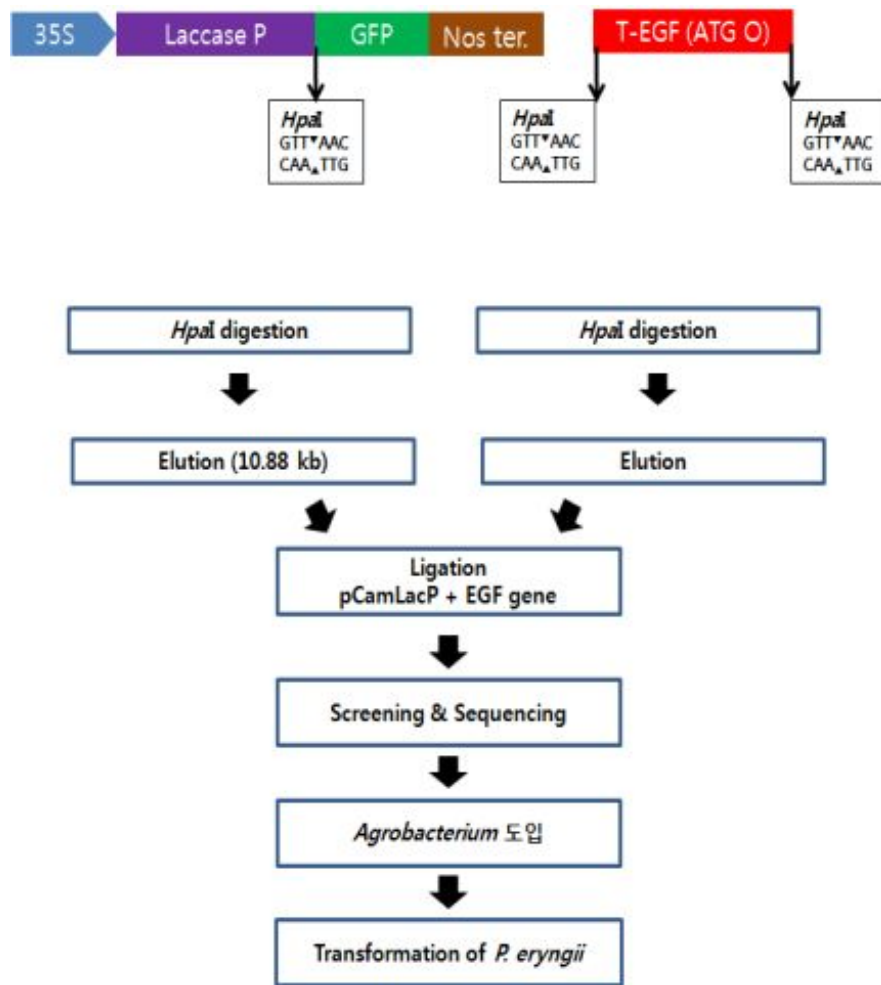


Fig. 115. Cloning strategy of EGF gene into pCamLacP containing Laccase promoter

Fig. 115에서 보는 바와 같이 laccase promoter가 도입된 pCamLacP (10.88 kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.88 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 EGF는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPEGF 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 EGF reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA GCG CAG TTC CCA CCA C 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 116에서 보는 바와 같이 약 0.87 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

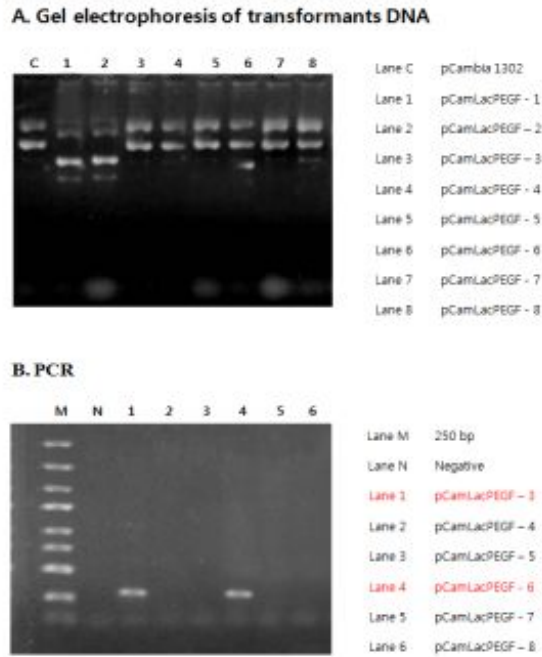


Fig. 116. Cloning of the EGF gene into pCamLacP vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

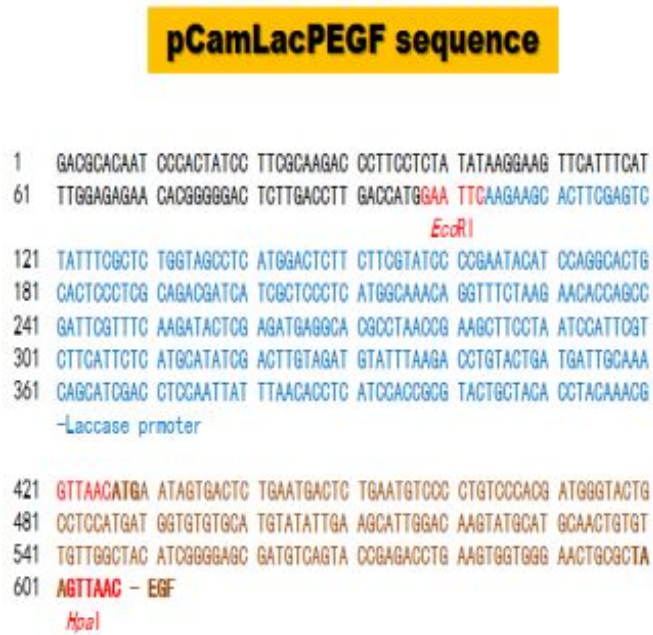
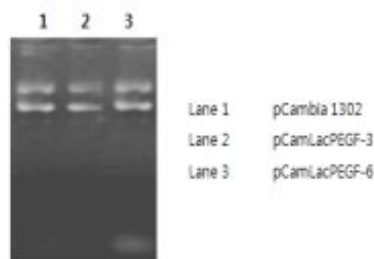


Fig. 117. DNA sequence analysis of pCamLacPEGF vector

구성된 pCamLacPEGF 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 117에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 EGF 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Agarose gel electrophoresis of pCamLacPEGF from *A. tumefaciens*



B. PCR

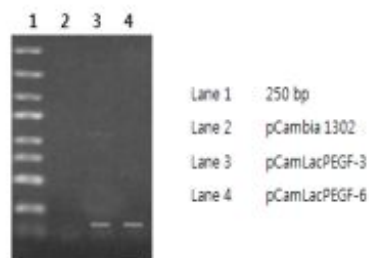


Fig. 118. Introduction of the pCamLacPEGF into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPEGF 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPEGF 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPEGF 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, EGF Forward PCR primer (5' GTT AAC ATG AAT AGT GAC TCT G 3')와 EGF Reverse PCR primer (5' GTT AAC TTA GCG CAG TTC CCA CCA C 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 118에서 보는 바와 같이 약 0.17 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

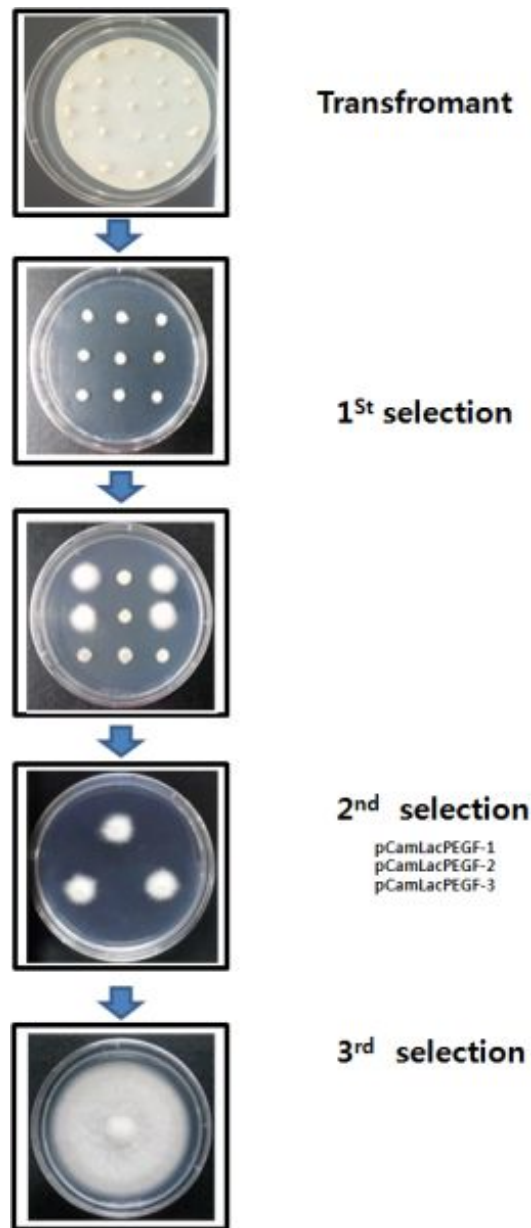


Fig. 119. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPEGF vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPEGF vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPEGF vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 119에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮

겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선발하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 EGF-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.17 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 120), laccase promoter에 의한 세포재생인자 (Epidermal growth factor) 의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

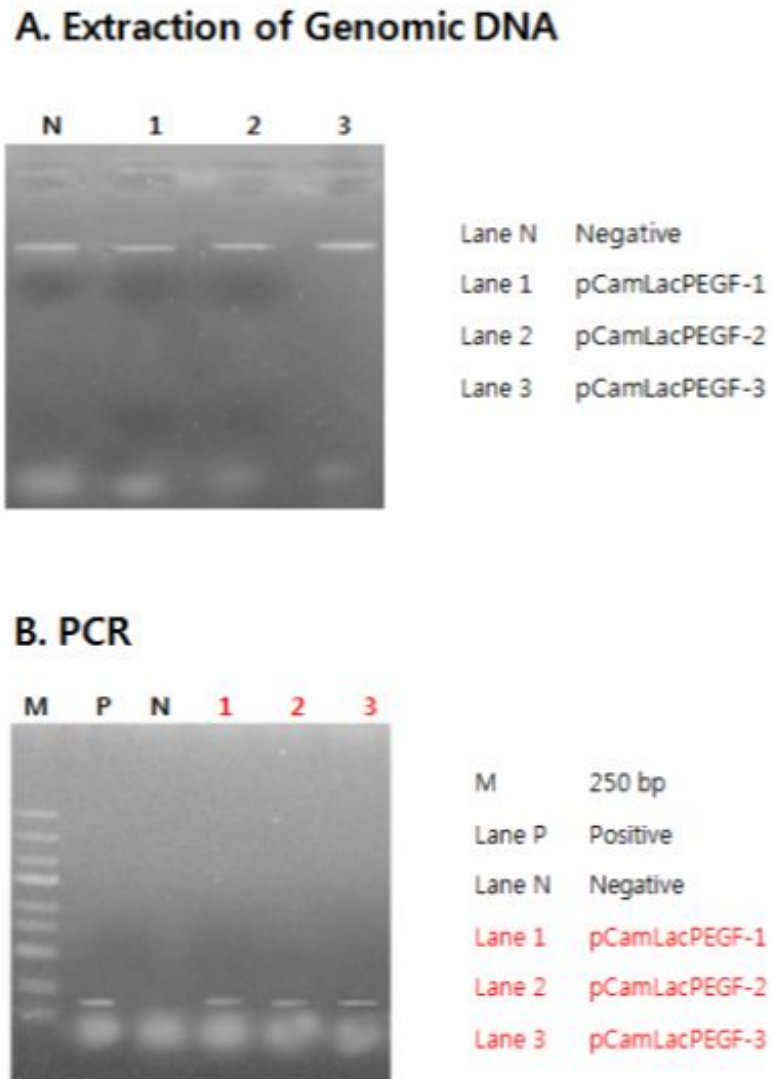


Fig. 120. PCR analysis of EGF gene in mycelial transformant (pCamLacPEGF). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 EGF 유전자 발현

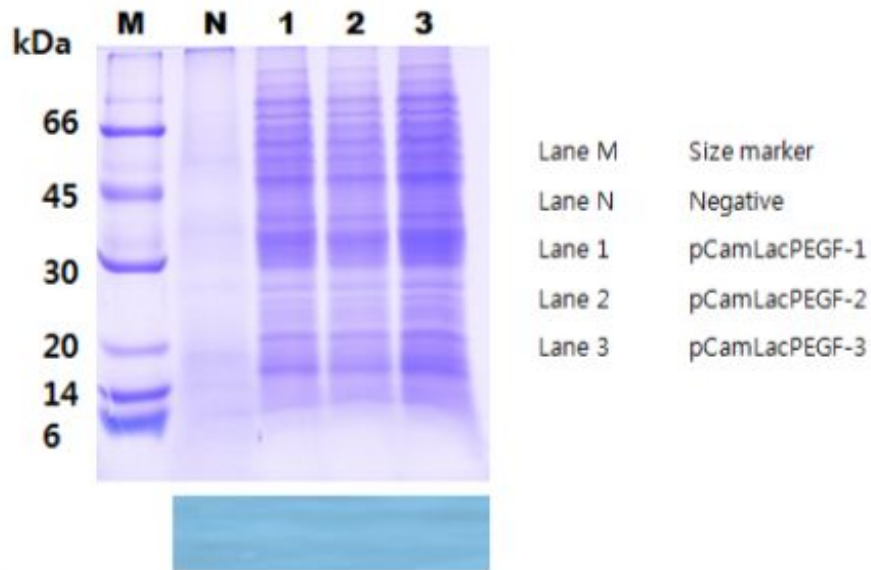


Fig. 121. Expression of the EGF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPEGF vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

pCamLacPEGF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4℃, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 121에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 EGF가 발현되지 않았다.

(바) Erythropoietin

① 클로닝 전략

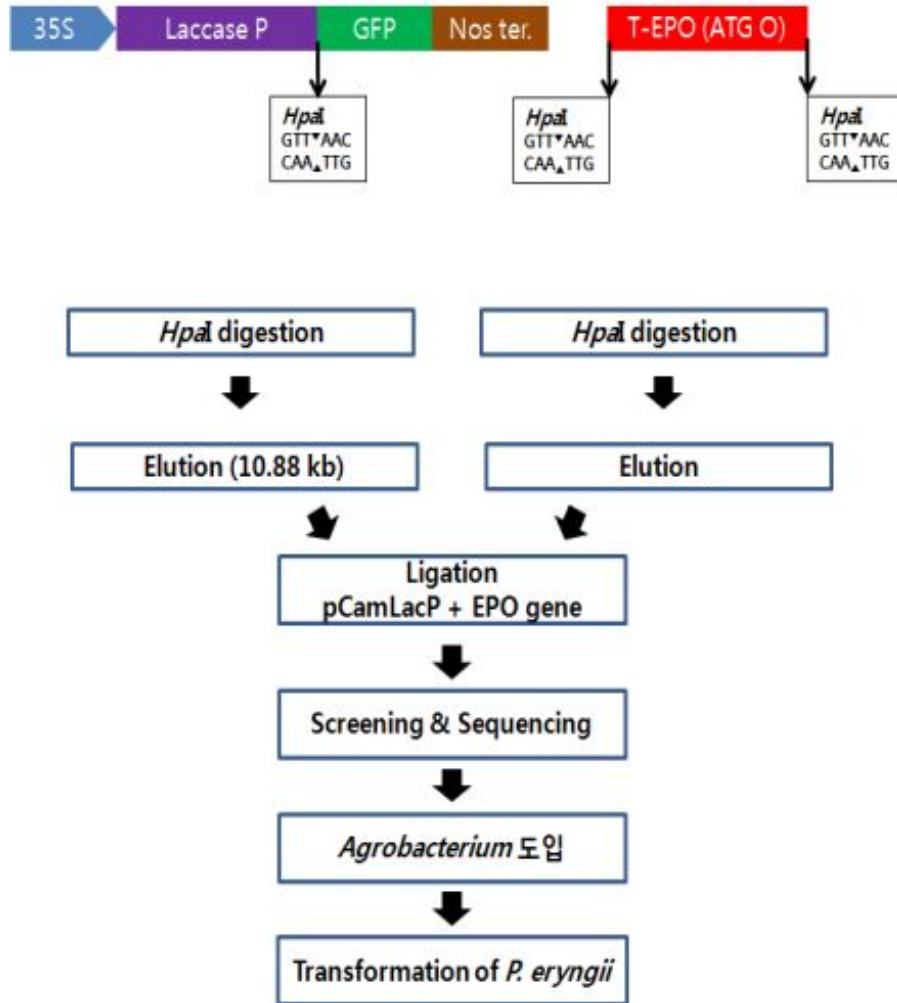


Fig. 122. Cloning strategy of EPO gene into pCamLacP containing Laccase promoter

Fig. 122에서 보는 바와 같이 laccase promoter가 도입된 pCamLacP (10.88 kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacP vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.88 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 EPO는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPEPO 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 EPO reverse PCR primer: 5' GTT AAC TCA TCT GTC CCC TGT CCT GC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 123에서 보는 바와 같이 약 0.82 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

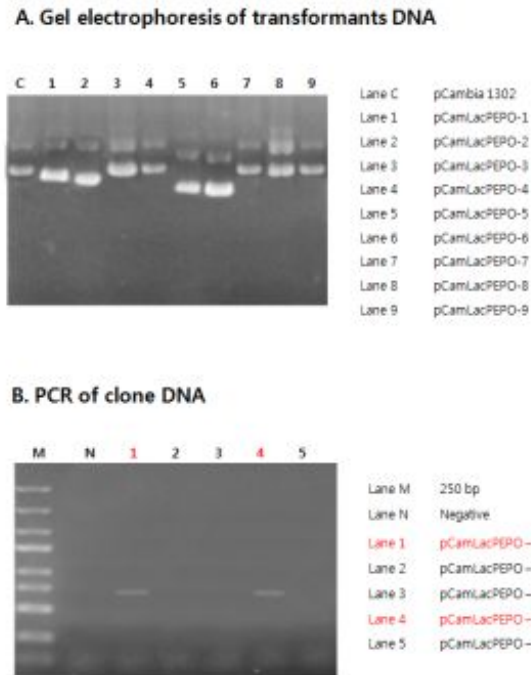


Fig. 123. Cloning of the EPO gene into pCamLacP vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

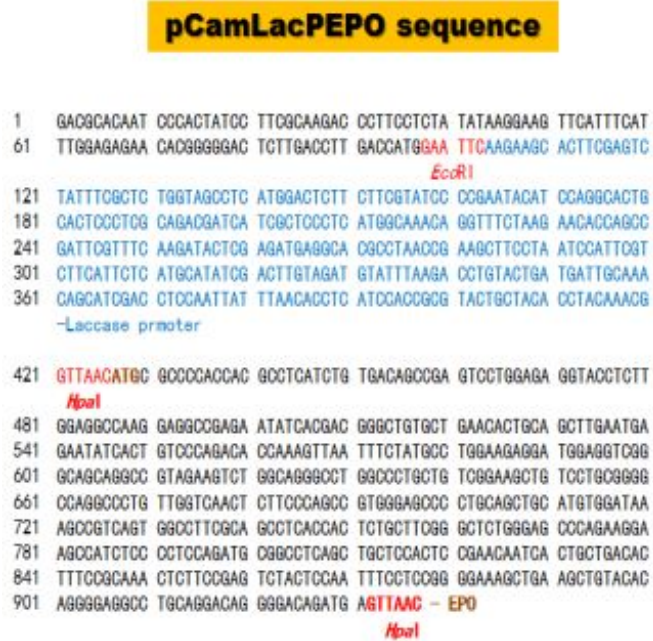


Fig. 124. DNA sequence analysis of pCamLacPEPO vector

구성된 pCamLacPEPO 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 124에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 EPO 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

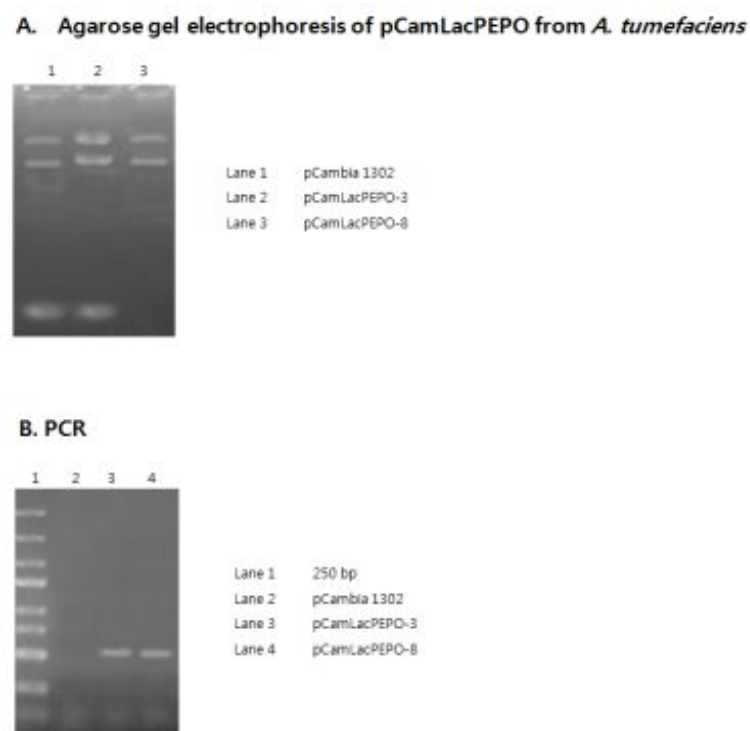


Fig. 125. Introduction of the pCamLacPEPO into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPEPO 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPEPO 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPEPO 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, EPO Forward PCR primer (5' GTT AAC ATG GCC CCA CCA CGC CTC AT 3')와 EPO Reverse PCR primer (5' GTT AAC TCA TCT GTC CCC TGT CCT GC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 125에서 보는 바와 같이 약 0.5 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

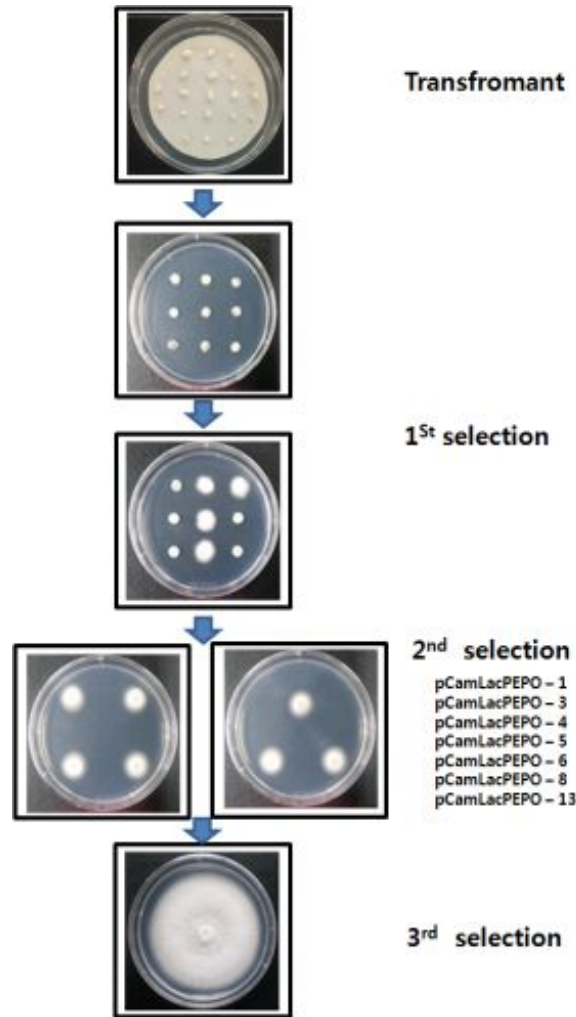


Fig. 126. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPEPO vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPEPO vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPEPO vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 126에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 EPO-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.5 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 127), laccase promoter에 의한 Erythropoietin (EPO) 단백질의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

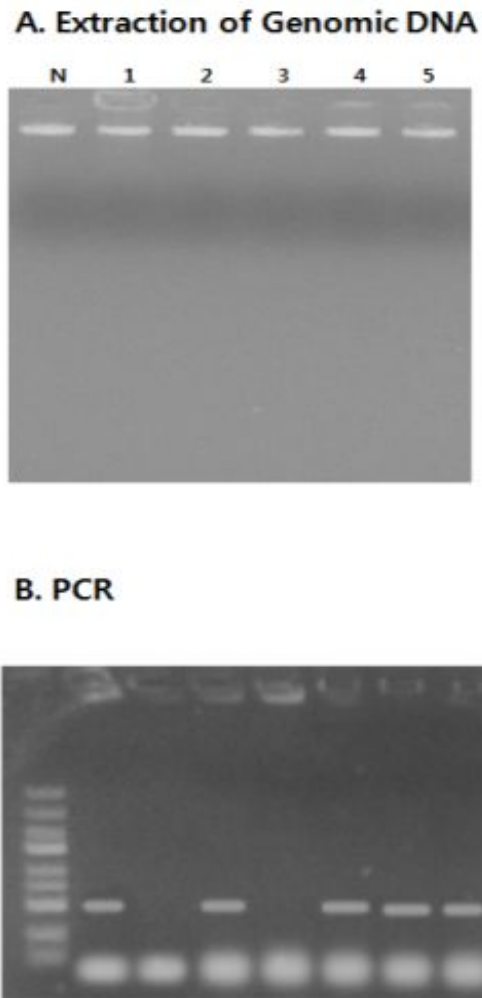


Fig. 127. PCR analysis of EPO gene in mycelial transformant (pCamLacPEPO). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 EPO 유전자 발현

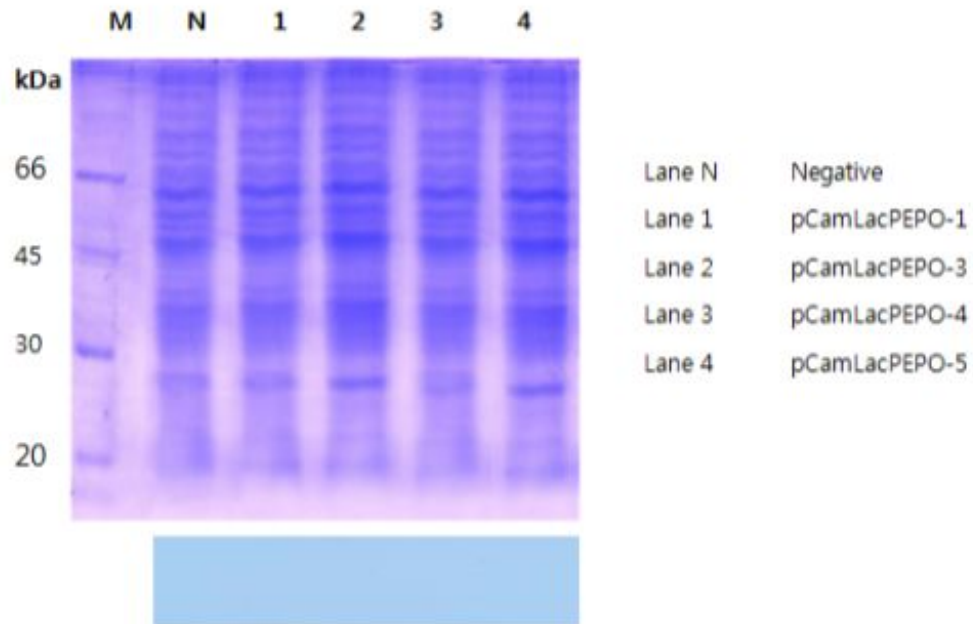


Fig. 128. Expression of the EPO from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPEPO vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPEPO vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 128에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 EPO가 발현되지 않았다.

(6) Lac promoter/분비서열을 포함하는 pCamLacPS 벡터로 유용유전자 도입

(가) Human growth hormone

① 클로닝 전략

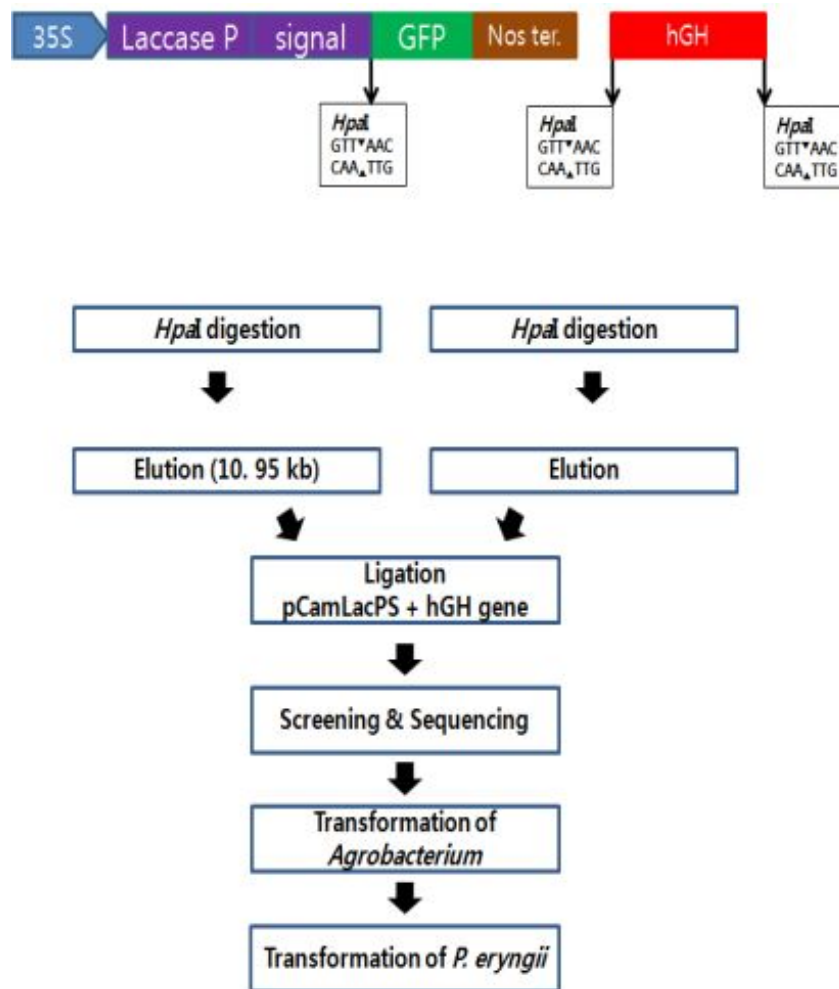


Fig. 129. Cloning strategy of hGH gene into pCamLacPS containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 129에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.95kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPS vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 hGH는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPS-hGH 발현벡터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 hGH reverse PCR primer: 5' GTT AAC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 130에서 보는 바와 같이 약 0.95 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

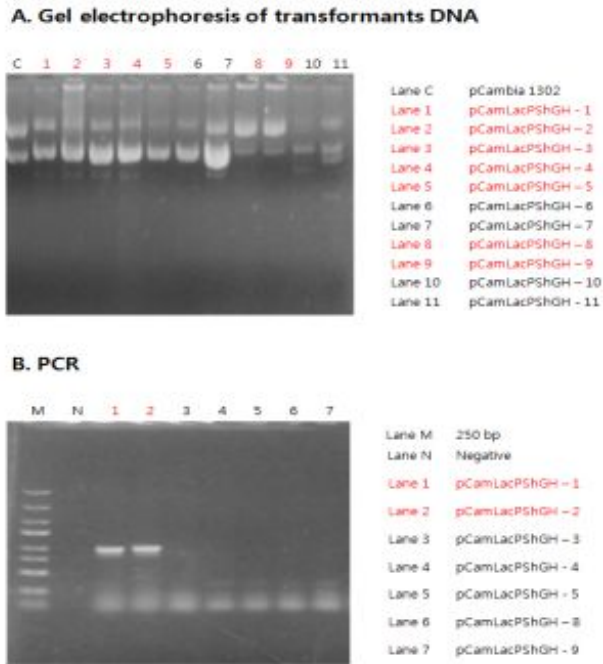


Fig. 130. Cloning of the hGH gene into pCamLacPS vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

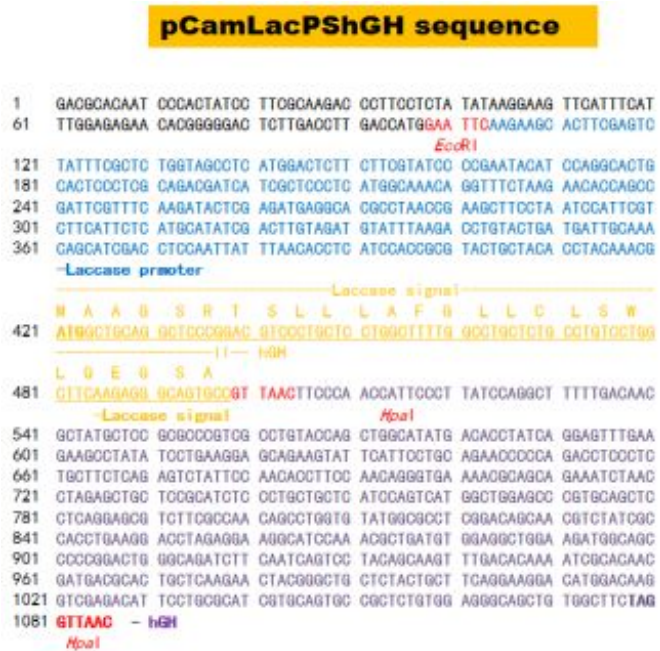
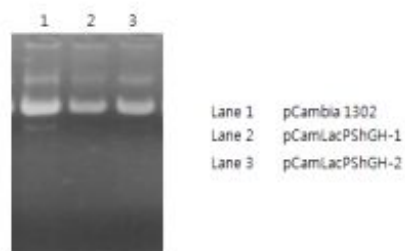


Fig. 131. DNA sequence analysis of pCamLacPShGH vector

구성된 pCamLacPShGH 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 131에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 신호서열 및 hGH 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Agarose gel electrophoresis of pCamLacPhGH from *A. tumefaciens*



B. PCR

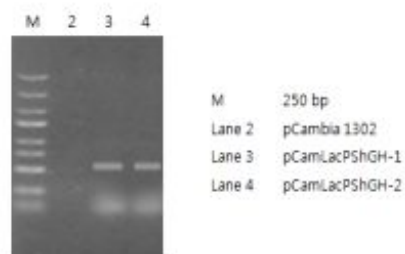


Fig. 132. Introduction of the pCamLacPShGH into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPShGH 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPShGH 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPShGH 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, hGH Forward PCR primer (5' GTT AAC TTC CCA ACC ATT CCC TTA TC 3')와 hGH Reverse PCR primer (5' GTT AAC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 132에서 보는 바와 같이 약 0.57 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

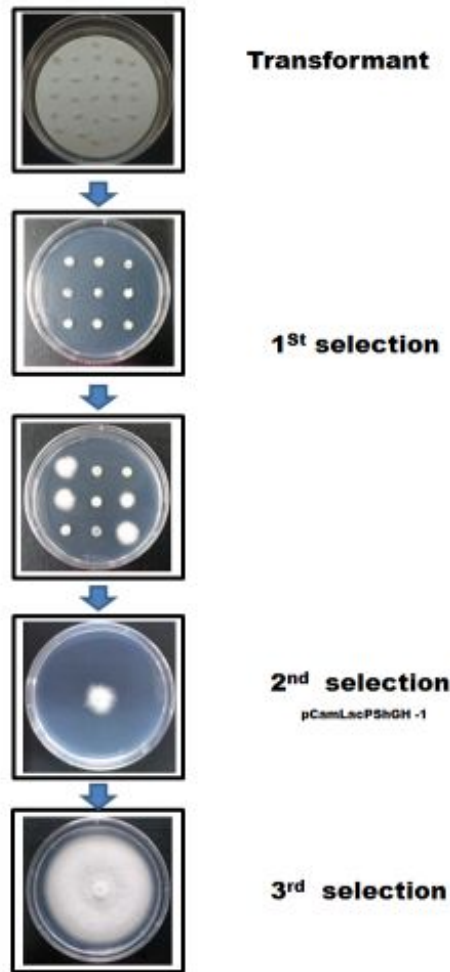


Fig. 133. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPShGH vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPShGH vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPShGH vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 133에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 hGH-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 570 bp 유전자를 확인하였고 (Fig. 134), laccase promoter에 의한 인간 성장 호르몬 단백질 (Human growth hormone)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

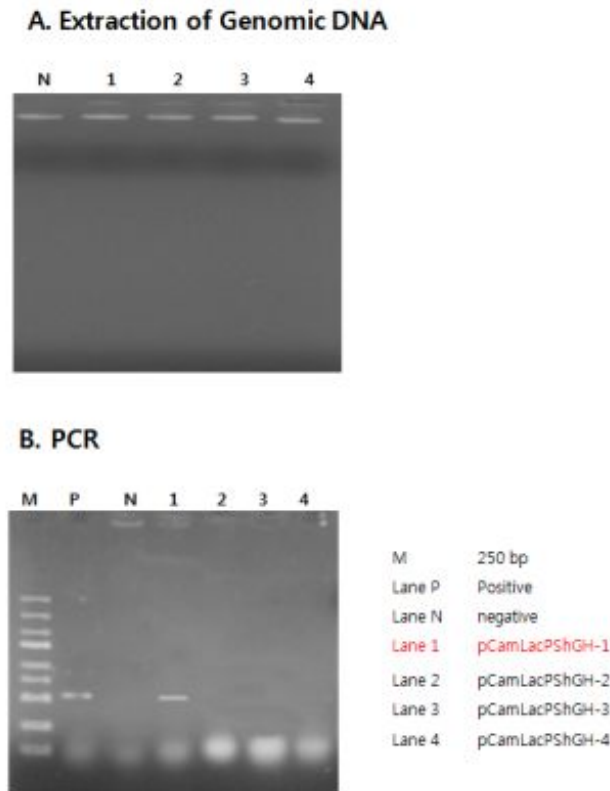


Fig. 134. PCR analysis of hGH gene in mycelial transformant (pCamLacPShGH). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현

pCamLacPShGH vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. SDS-PAGE를 통하여 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색한 결과 Fig. 135에서 보는바와 같이 약 23 kDa 정도 위치에서 발현된 hGH 밴드를 확인 할 수 있었다. SDS-PAGE gel 위에 분리된 단백질을 PVDF membrane에 transfer 한 후 2.5% skim milk (in TBST)로 blocking 하여 비특이적 반응을 차단하고 hGH 단백질에 특이성을 갖는 1차 항체를 처리한 다음, 1차 항체에 특이성을 가지면서 발색효소를 갖는 2차 항체를 처리한 후, 2차 항체에 결합된 효소의 기질로서 발색물질을 처리하여 hGH 항체에 특이성을 가지는 단백질을 분석하였다. 그 결과

SDS-PAGE hGH band 위치와 동일한 위치에서 특이성을 가지는 hGH 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. Fig. 129에서 보는 것처럼 pCamLacPShGH vector가 도입되지 않은 대조군 새송이버섯 균사체에서는 hGH 단백질을 생산하지 않았지만, pCamLacPShGH-1 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체에서 hGH가 발현되었다.

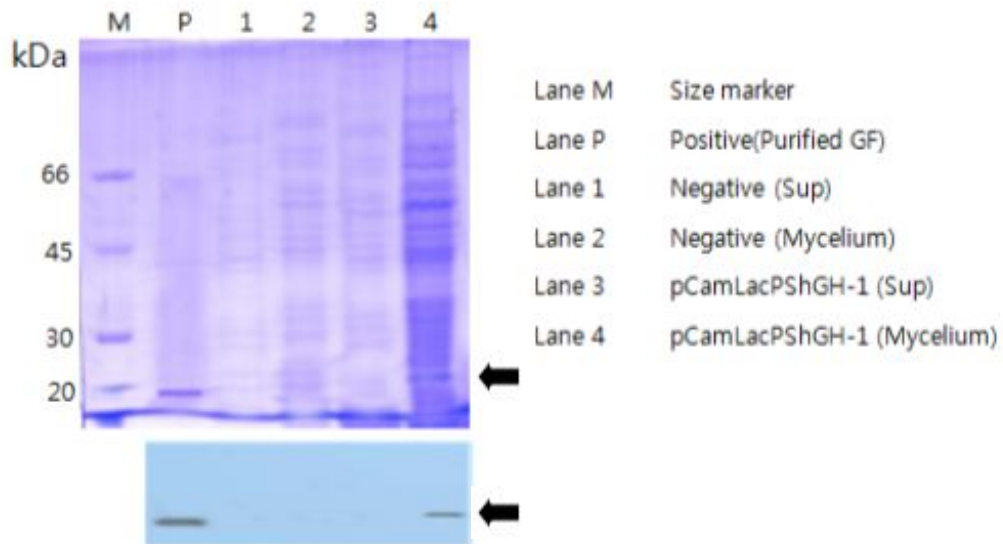


Fig. 135. Expression of the hGH from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPShGH vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

새송이버섯 균사체로 도입되어 발현된 hGH 단백질은 mature form이 191 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량이 21 kDa 정도의 크기이다. 그러나 SDS-PAGE 상에서 나타난 밴드의 위치는 약 23 kDa 위치인 것으로 보아 hGH 유전자 앞에 붙어있는 laccase signal sequence가 균사체내에서 적절한 peptidase에 의해 정확하게 processing 되지 않은 것으로 판단된다.

⑧ 새송이버섯 균사체 증식비교

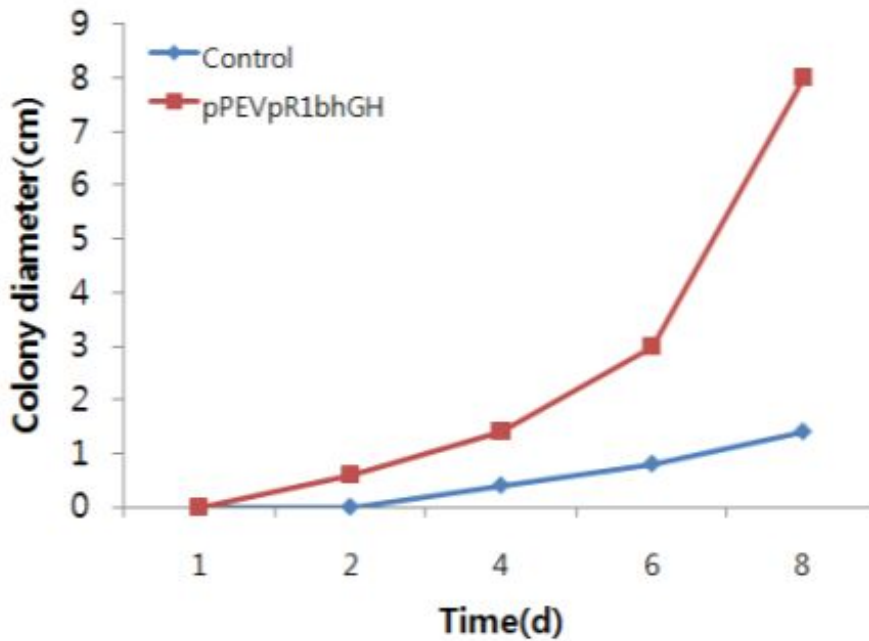
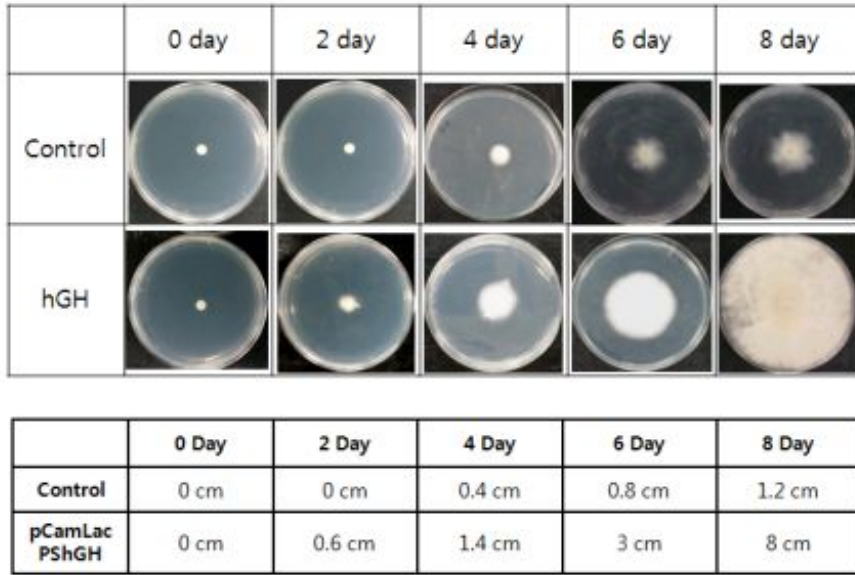
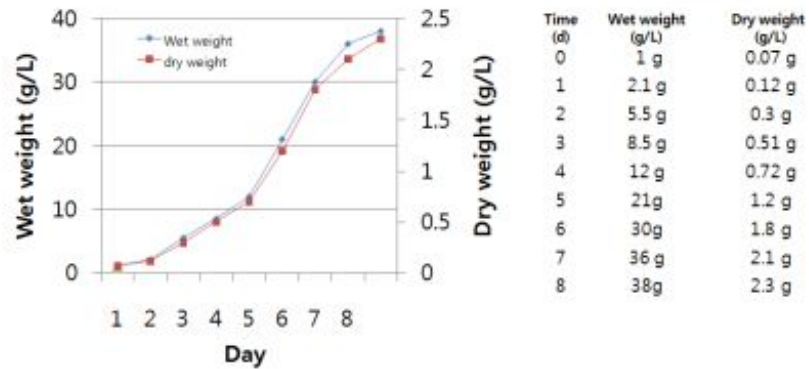


Fig. 136. Comparison of mycelial growth rates between the recombinant pCamLacPShGH and control *P. eryngii*.

Fig. 136에서 pCamLacPShGH vector 도입된 새송이버섯 균사체의 성장속도 비교는 페트리 접시에서 연구되었다. 페트리 접시 실험결과, hGH 유전자가 도입된 재조합 균사체의 성장속도가 대조군 균주 보다 대략 6 배 높은 것을 관찰하였다.

⑨ 새송이버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현

A



B

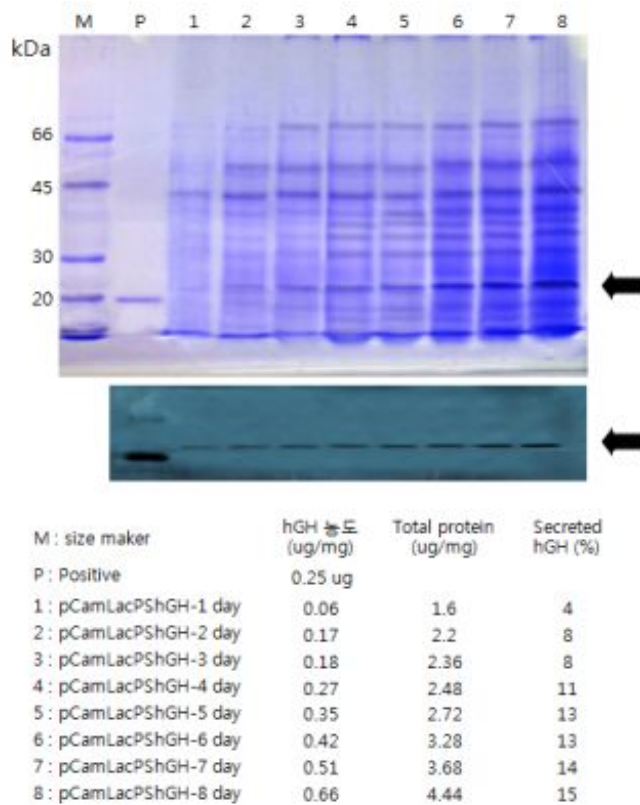


Fig. 137. Expression of the hGH from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPShGH-1 vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPShGH-1 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 8일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM

β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하여 단백질을 분석하였다. 그 결과 SDS-PAGE hGH band 위치와 동일한 위치에서 특이성을 가지는 hGH 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. 발현된 단백질 농도는 이미지 분석기로 측정하여 총 단백질에 대한 % 비율로 나타내었다. 그 결과 Fig. 137에서 보는 것처럼 pCamLacPShGH-1 vector가 도입된 형질전환체는 배양기간에 따라 총 단백질 중 13%(6일째), 14%(7일째), 15%(8일째)의 hGH 단백질을 생산하는 것으로 분석되었다.

(나) PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)

① 클로닝 전략

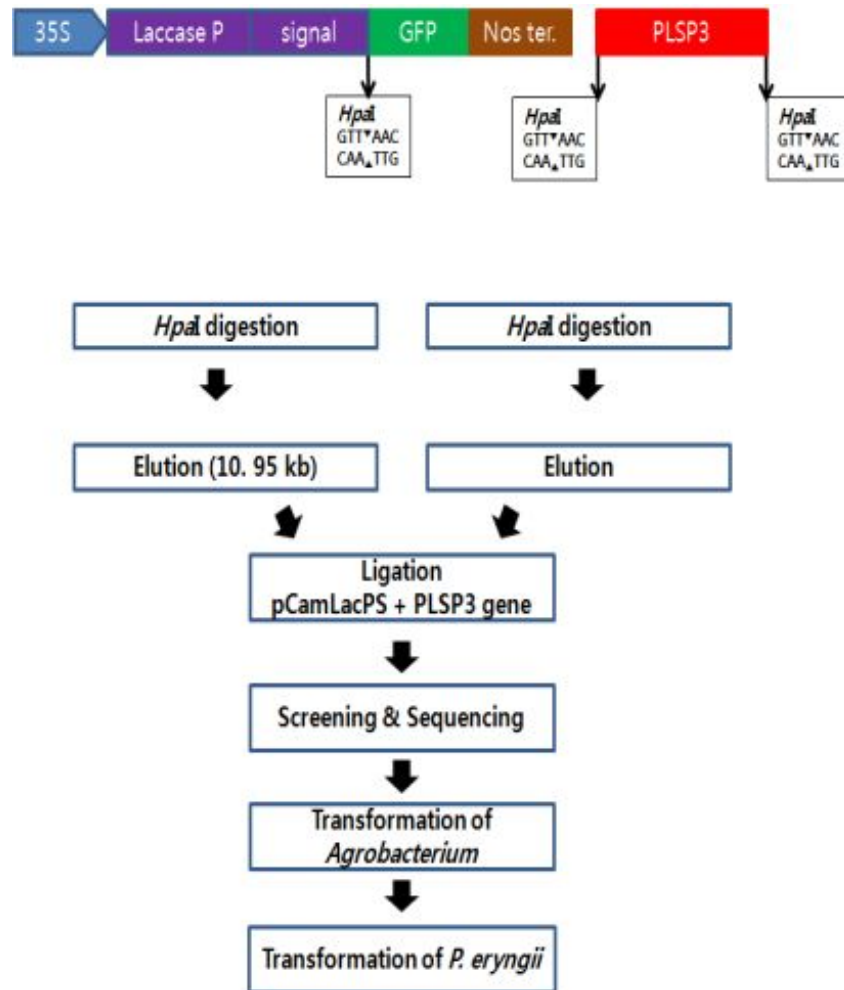


Fig. 138. Cloning strategy of PLSP3 gene into pCamLacPS containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 138에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.95kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPS vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 PLSP3는 *HpaI*으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPS_{hGH} 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 PLSP3 reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA GTT GAT GTT TCC TAT CCA GTC 3' PCR를 한 결과 Fig. 139에서 보는 바와 같이 약 1.07 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

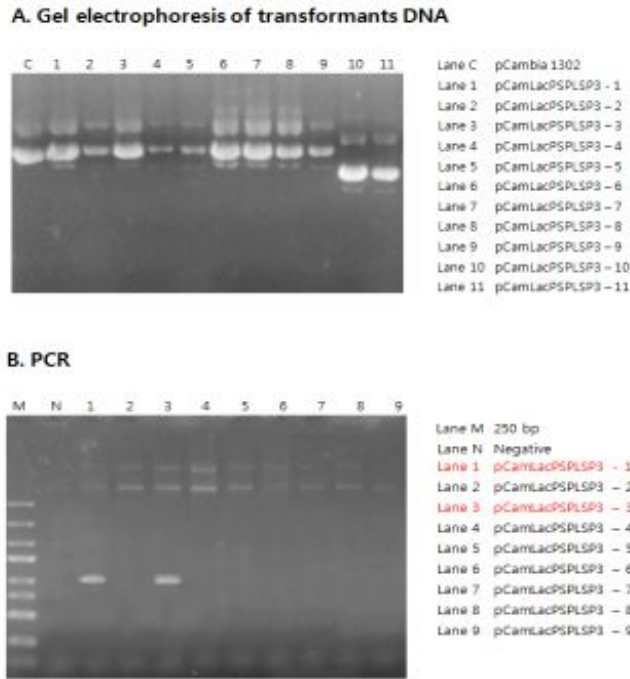


Fig. 139. Cloning of the PLSP3 gene into pCamLacPS vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

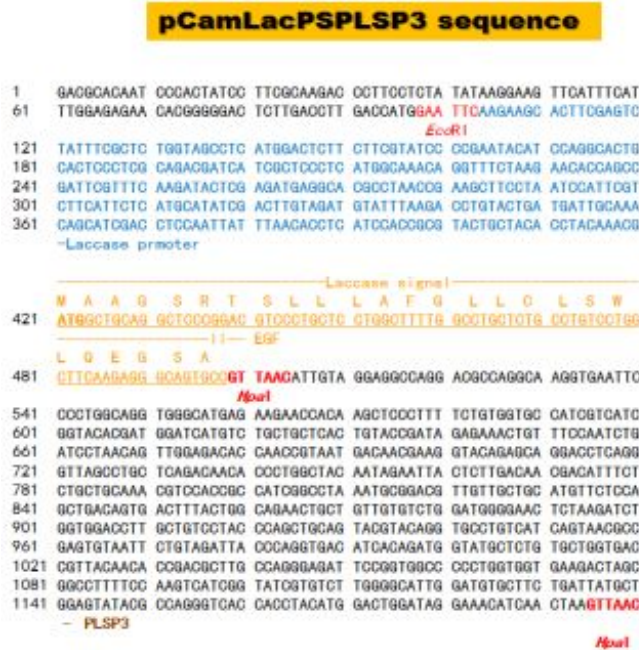


Fig. 140. DNA sequence analysis of pCamLacPSPLSP3 vector

구성된 pCamLacPSPLSP3 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 140에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 신호서열 및 PLSP3 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

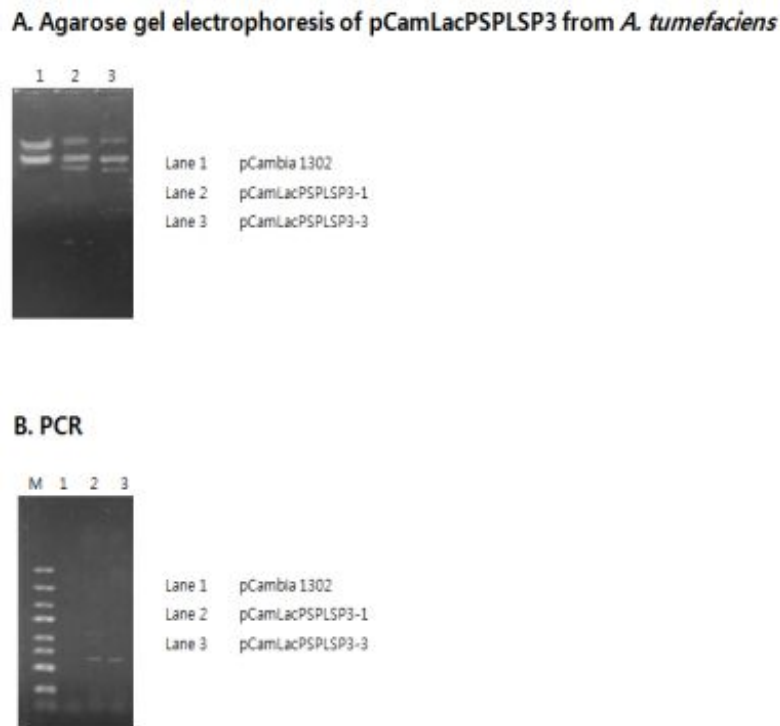


Fig. 141. Introduction of the pCamLacPSPLSP3 into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPSPLSP3 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPSPLSP3 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPSPLSP3 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, PLSP3 Forward PCR primer (5' GTT AAC ATT GTA GGA GGC CAG GAC GCC 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TTA GTT GAT GTT TCC TAT CCA GTC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 141에서 보는 바와 같이 약 0.69 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

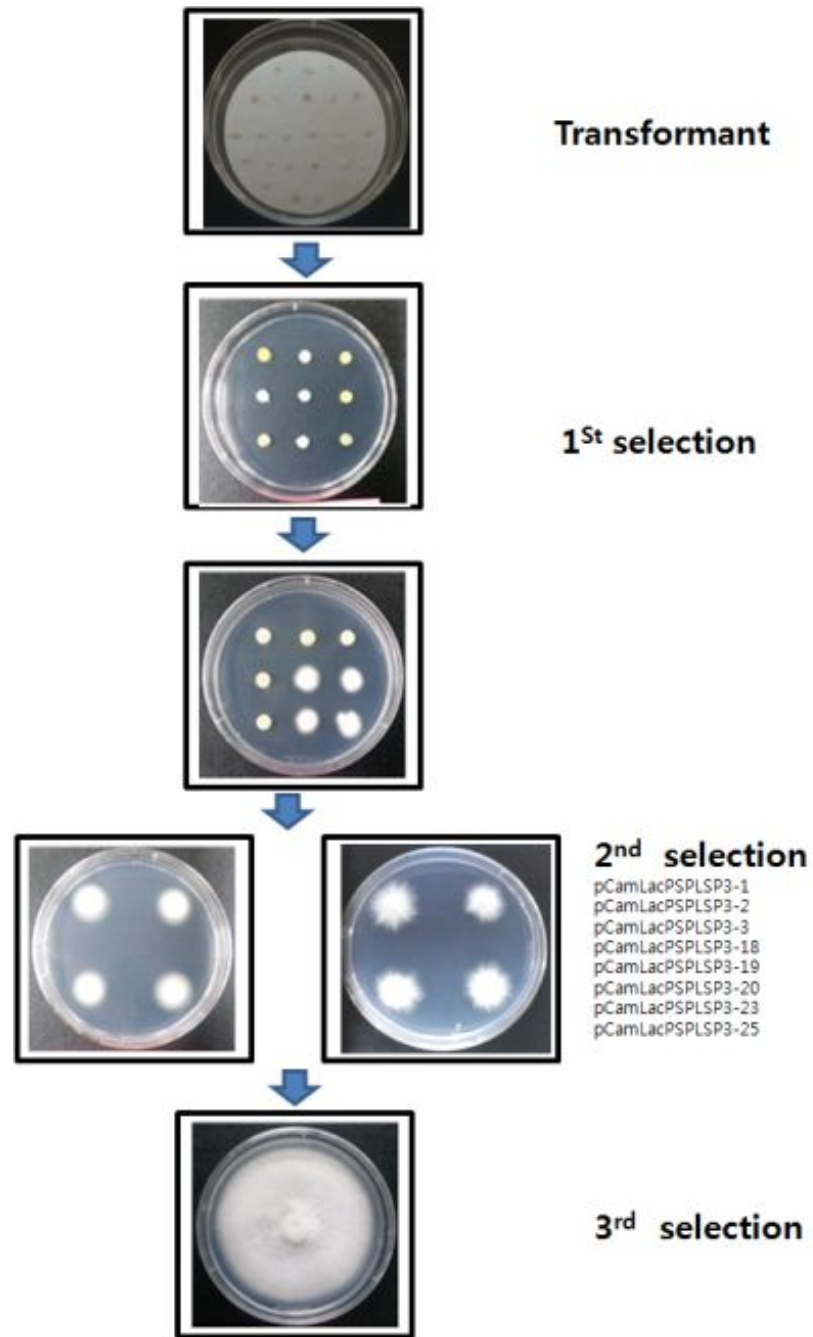


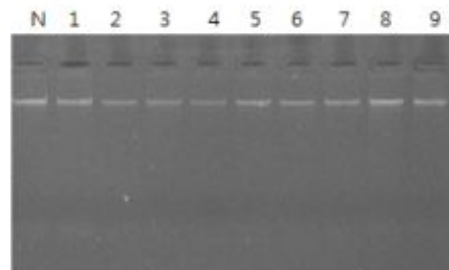
Fig. 142. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPSPLSP3 vector and Selection of transformants by antibiotic.

pCamLacPSPLSP3 vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPSPLSP3 vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행

하여 Fig. 142에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선발하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 PLSP3-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.69 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 143), 혈전용해제 단백질 (*Periserrula leucophryna* serine protease, PLSP3)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

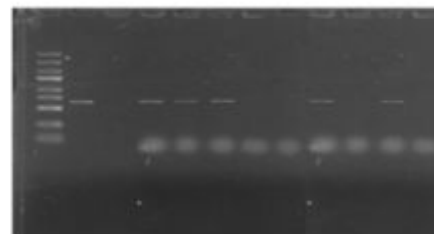
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

A. Extraction of Genomic DNA



Lane N	Negative (<i>P. eryngii</i>)
Lane 1	pCamLacPSPLSP3-18
Lane 2	pCamLacPSPLSP3-19
Lane 3	pCamLacPSPLSP3-20
Lane 4	pCamLacPSPLSP3-21
Lane 5	pCamLacPSPLSP3-22
Lane 6	pCamLacPSPLSP3-23
Lane 7	pCamLacPSPLSP3-24
Lane 8	pCamLacPSPLSP3-25
Lane 9	pCamLacPSPLSP3-26

B. PCR



Lane M	250 bp
Lane P	Positive
Lane N	Negative
Lane 1	pCamLacPSPLSP3-18
Lane 2	pCamLacPSPLSP3-19
Lane 3	pCamLacPSPLSP3-20
Lane 4	pCamLacPSPLSP3-21
Lane 5	pCamLacPSPLSP3-22
Lane 6	pCamLacPSPLSP3-23
Lane 7	pCamLacPSPLSP3-24
Lane 8	pCamLacPSPLSP3-25
Lane 9	pCamLacPSPLSP3-26

Fig. 143. PCR analysis of PLSP3 gene in mycelial transformant (pCamLacPSPLSP3). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 PLSP3 유전자 발현

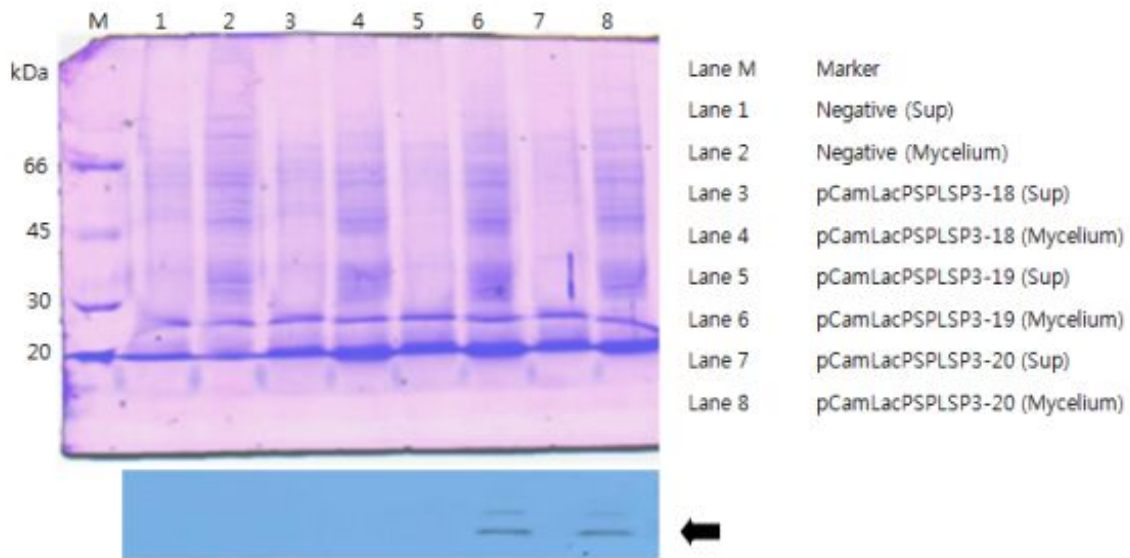


Fig. 144. Expression of the PLSP3 from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSPLSP3 vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPSPLSP3 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. 그 결과 Fig. 144에서 보는 것처럼 pCamLacPSPLSP3-19, 20 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체에서 PLSP3가 발현되었다.

⑧ 새송이버섯 균사체 증식비교

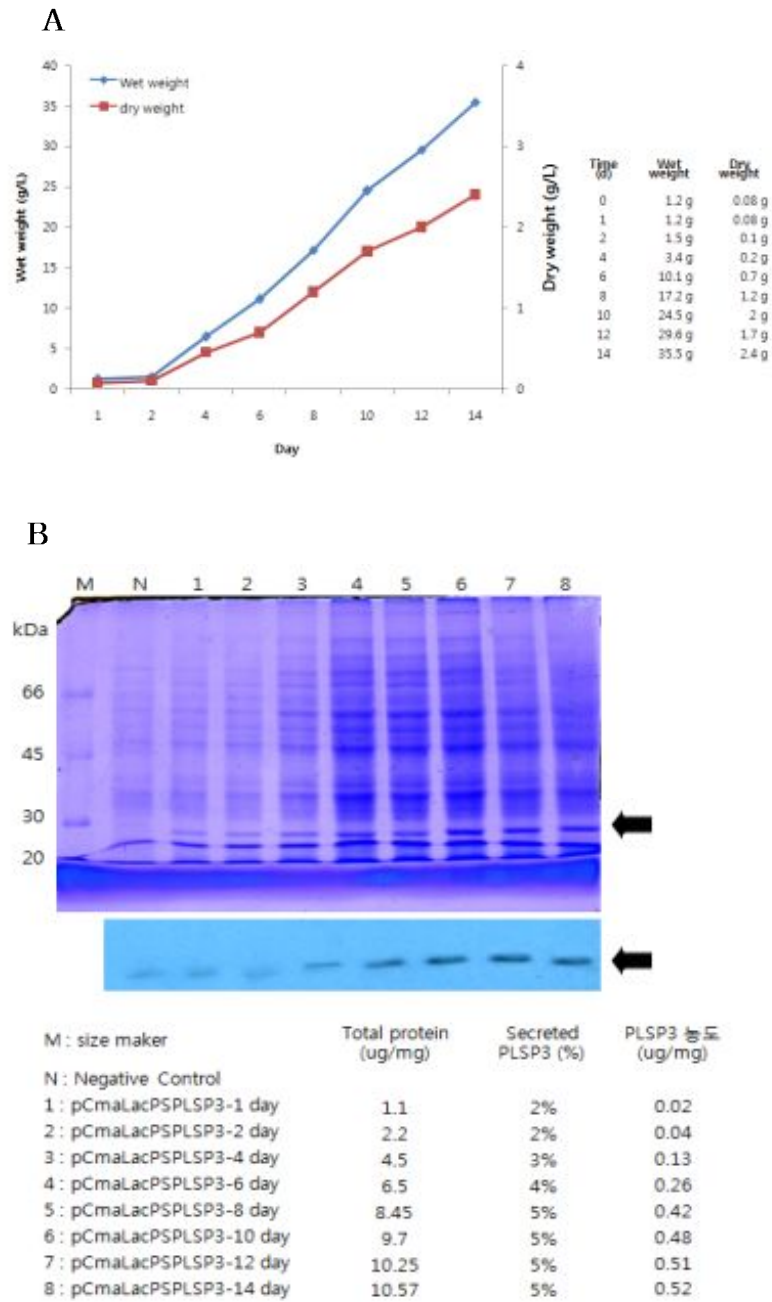


Fig. 145. Time profile of mycelia production in 10 L airlift type fermenter. (A) Dry weight and wet weight. (B) Expression of the PLSP3 from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSPLSP3 vector in 10 L fermenter. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

pCamLacPSPLSP3 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 14일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하여 단백질을 분석하였다. 그 결과 특이성을 가지는 PLSP3 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. 발현된 단백질 농도는 이미지 분석기로 측정하여 총 단백질에 대한 % 비율로 나타내었다. 그 결과 Fig. 145에서 보는 것처럼 pCamLacPSPLSP3 vector가 도입된 형질전환체는 배양기간에 따라 총 단백질 중 5%(14일째)의 PLSP3 단백질을 생산하는 것으로 분석되었다.

(다) Colony stimulating factor

① 클로닝 전략

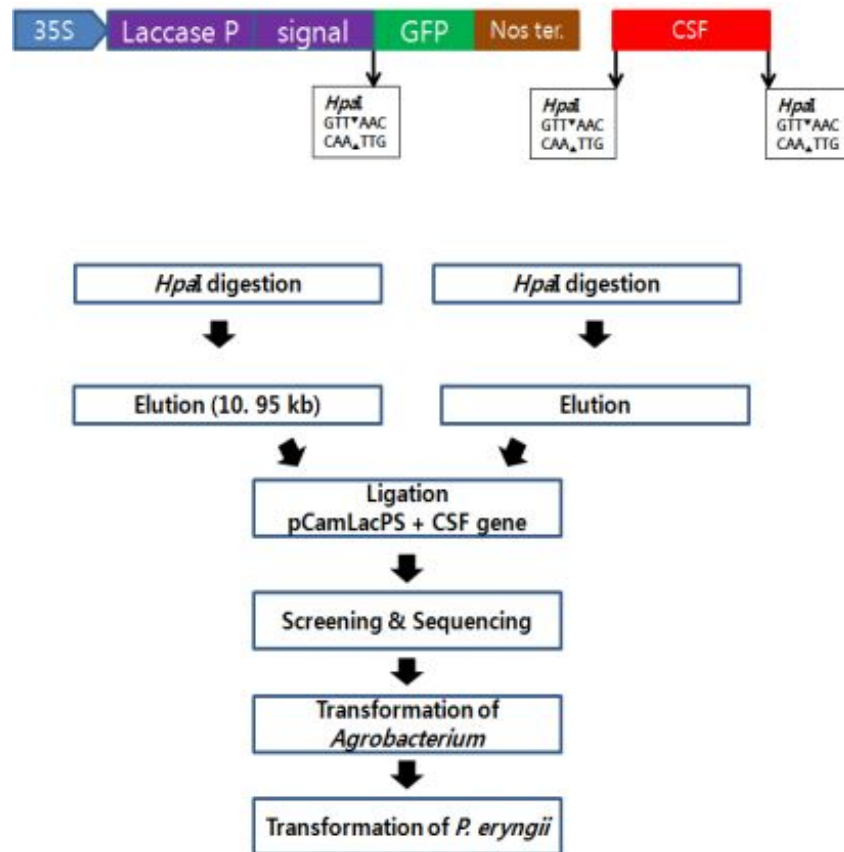


Fig. 146. Cloning strategy of CSF gene into pCamLacPS containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 146에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.95kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPS vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 CSF는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPSCSF 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 CSF reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA TCA GGG CTG CGC AAG GTG G 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 147에서 보는 바와 같이 약 0.9 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

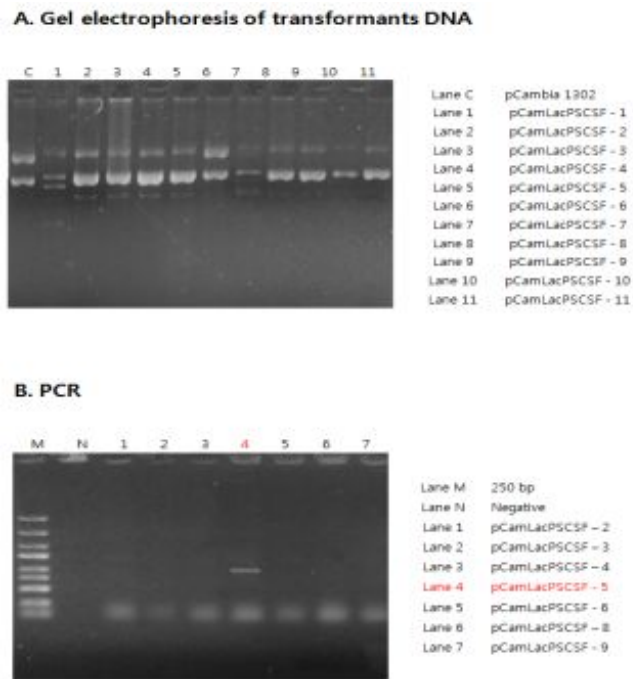


Fig. 141. Cloning of the CSF gene into pCamLacPS vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

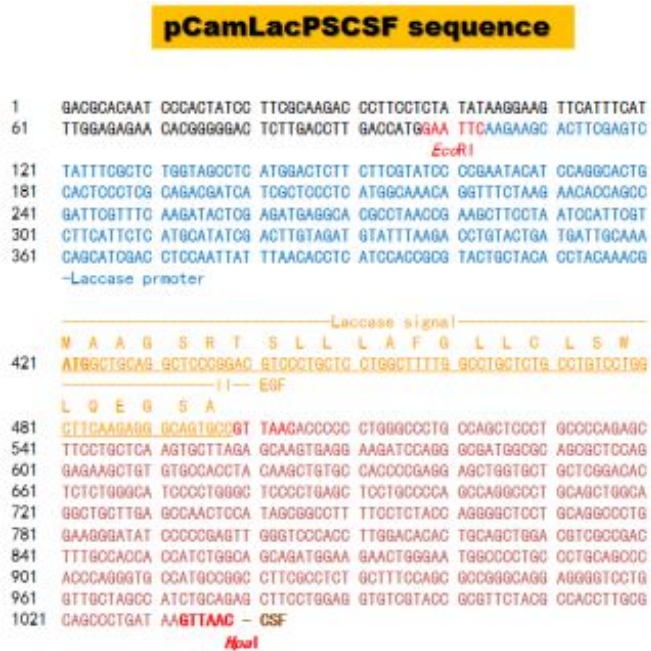
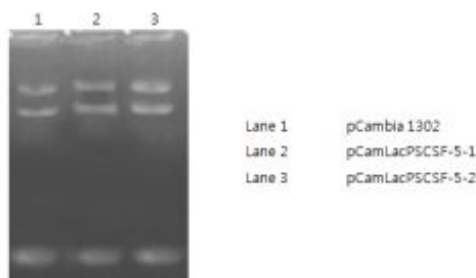


Fig. 148. DNA sequence analysis of pCamLacPSCSF vector.

구성된 pCamLacPSCSF 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 148에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 신호서열 및 CSF 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Agarose gel electrophoresis of pCamLacPSCSF from *A. tumefaciens*



B. PCR

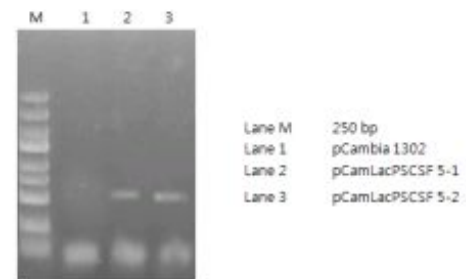


Fig. 149. Introduction of the pCamLacPSCSF into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPSCSF 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPSCSF 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPSCSF 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CSF Forward PCR primer (5' GTT AAC ACC CCC CTG GGC CCT GCC AG 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TTA TCA GGG CTG CGC AAG GTG G 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 149에서 보는 바와 같이 약 0.52 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

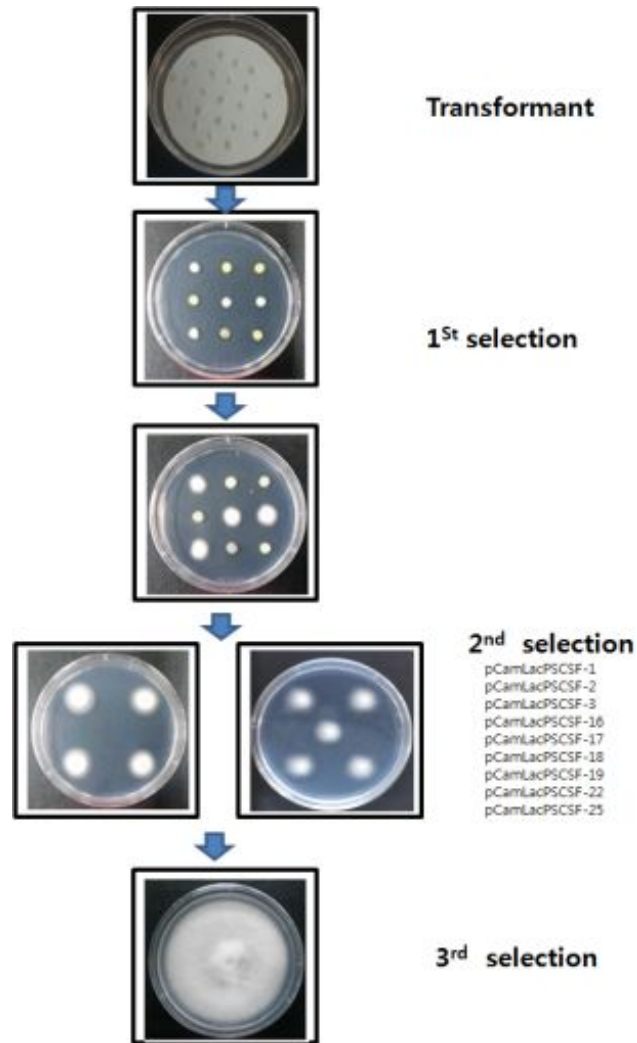


Fig. 150. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPSCSF vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPSCSF vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPSCSF vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 150에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 CSF-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.52 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 151), laccase promoter에 의한 과립구 군체 (콜로니) 자극인자 단백질 (Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

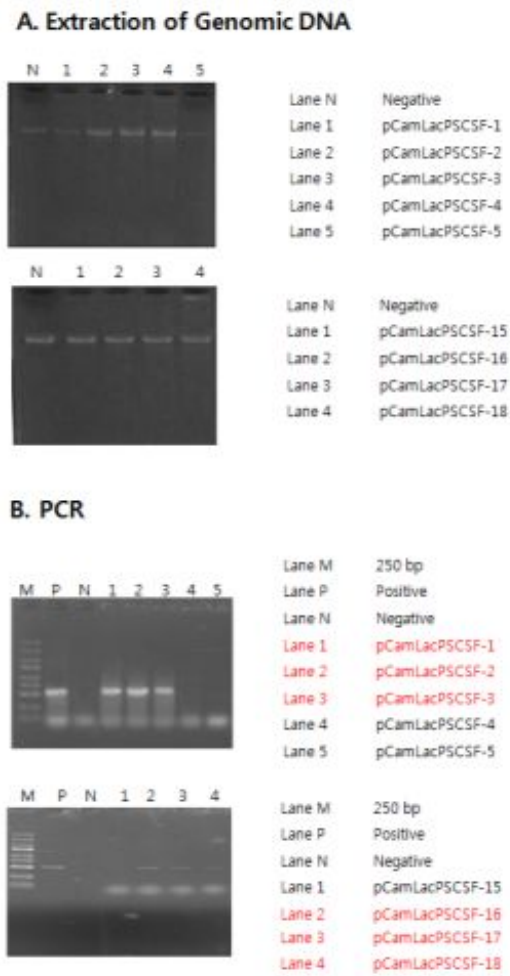


Fig. 151. PCR analysis of CSF gene in mycelial transformant (pCamLacPSCSF). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 CSF 유전자 발현

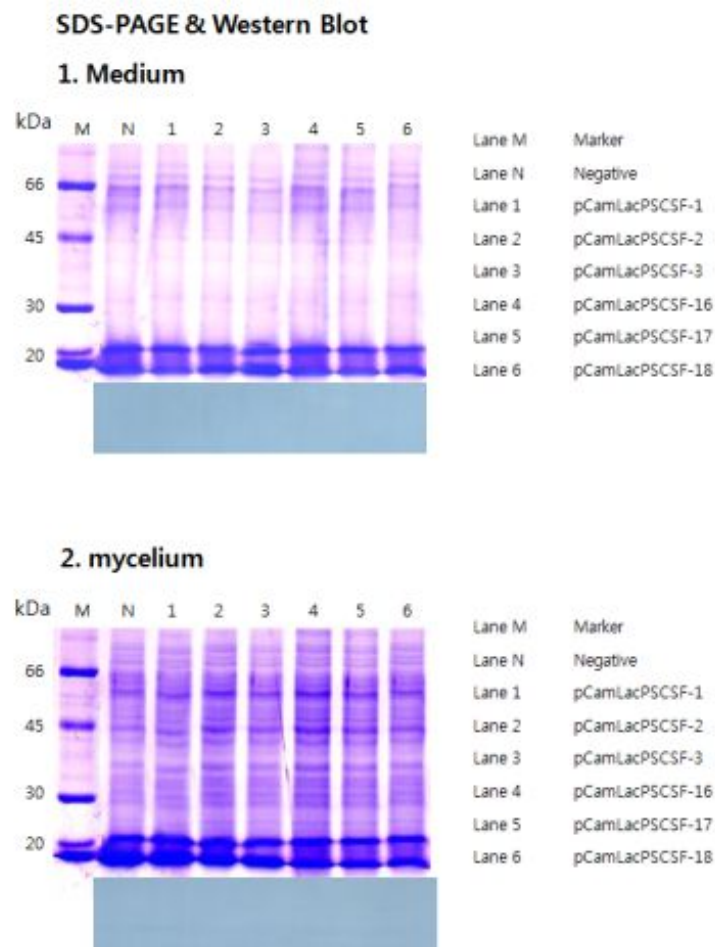


Fig. 152. Expression of the CSF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSCSF vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPSCSF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 152에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 CSF가 발현되지 않았다.

(라) Surfactant protein B

① 클로닝 전략

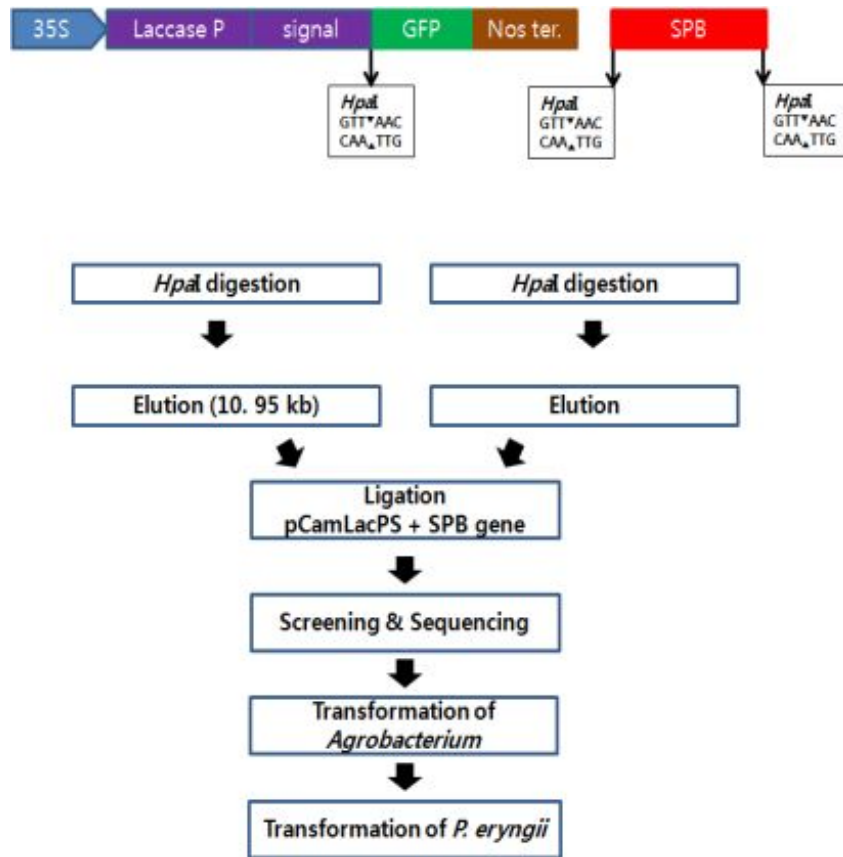


Fig. 153. Cloning strategy of SPB gene into pCamLacPS containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 153에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.95kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPS vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 SPB는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPSSPB 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 SPB reverse PCR primer: 5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 154에서 보는 바와 같이 약 0.62 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

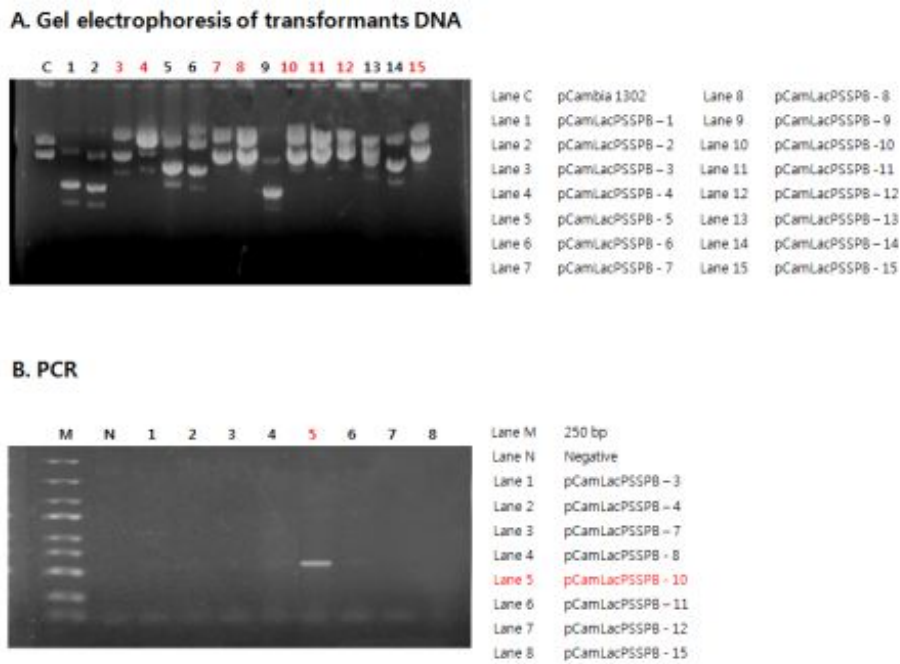


Fig. 154. Cloning of the SPB gene into pCamLacPS vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

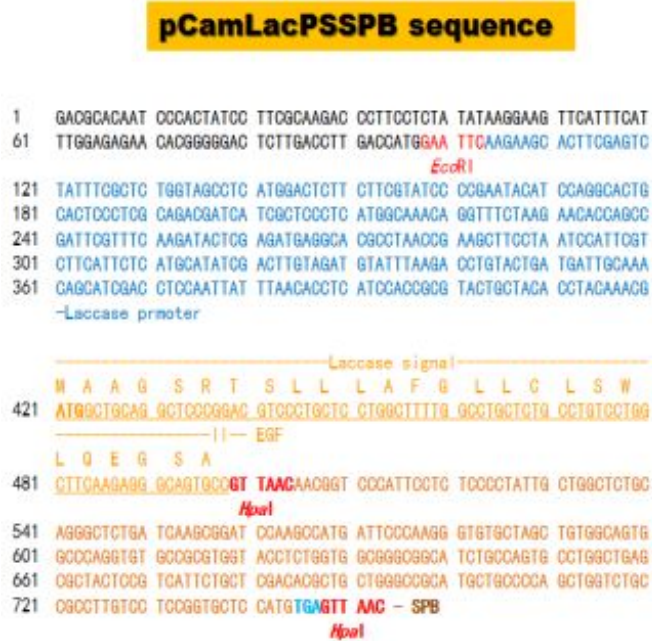


Fig. 155. DNA sequence analysis of pCamLacPSSPB vector

구성된 pCamLacPSSPB 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 155에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 신호서열 및 SPB 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

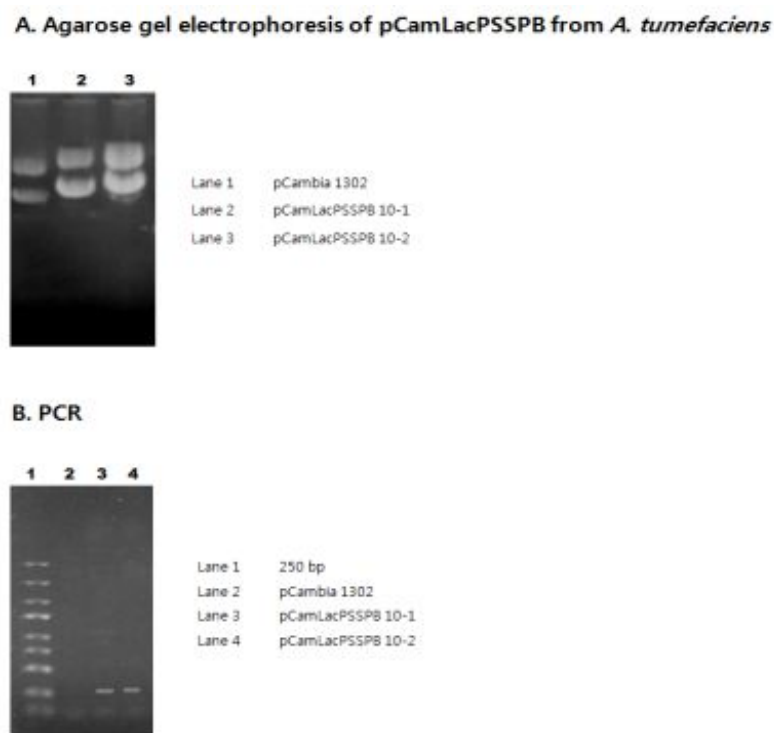


Fig. 156. Introduction of the pCamLacPSSPB into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPSSPB 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPSSPB 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPSSPB 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, SPB Forward PCR primer (5' GTT AAC AAC GGT CCC ATT CCT CTC CCC 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 156에서 보는 바와 같이 약 0.24 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

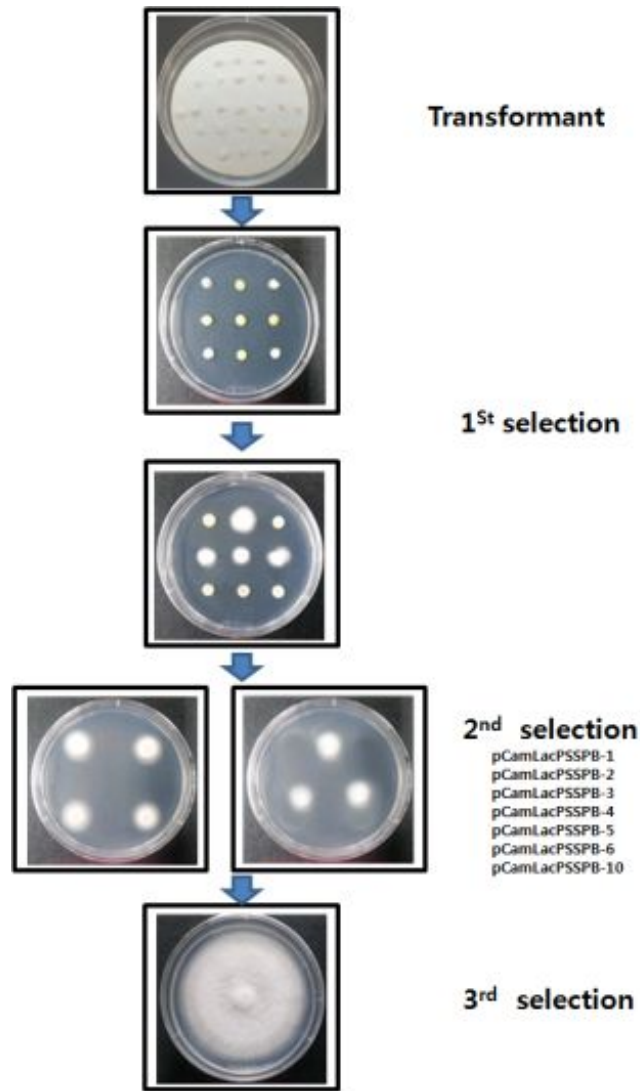
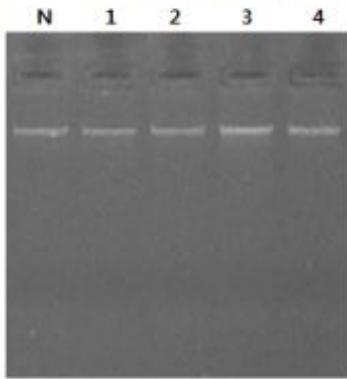


Fig. 157. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPSSPB vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPSSPB vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPSSPB vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 157에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 SPB-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.24 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 158), laccase promoter에 의한 표면활성제 단백질 B(Surfactant protein-B, SP-B)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

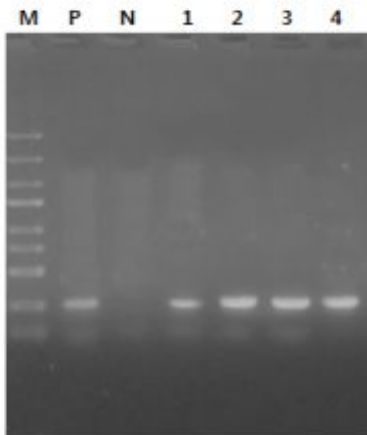
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

A. Extraction of Genomic DNA



Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPSSPB-1
Lane 2 pCamLacPSSPB-2
Lane 3 pCamLacPSSPB-3
Lane 4 pCamLacPSSPB-4

B. PCR



Lane M 250 bp
Lane P Positive
Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPSSPB-1
Lane 2 pCamLacPSSPB-2
Lane 3 pCamLacPSSPB-3
Lane 4 pCamLacPSSPB-4

Fig. 158. PCR analysis of SPB gene in mycelial transformant (pCamLacPSSPB). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 SPB 유전자 발현

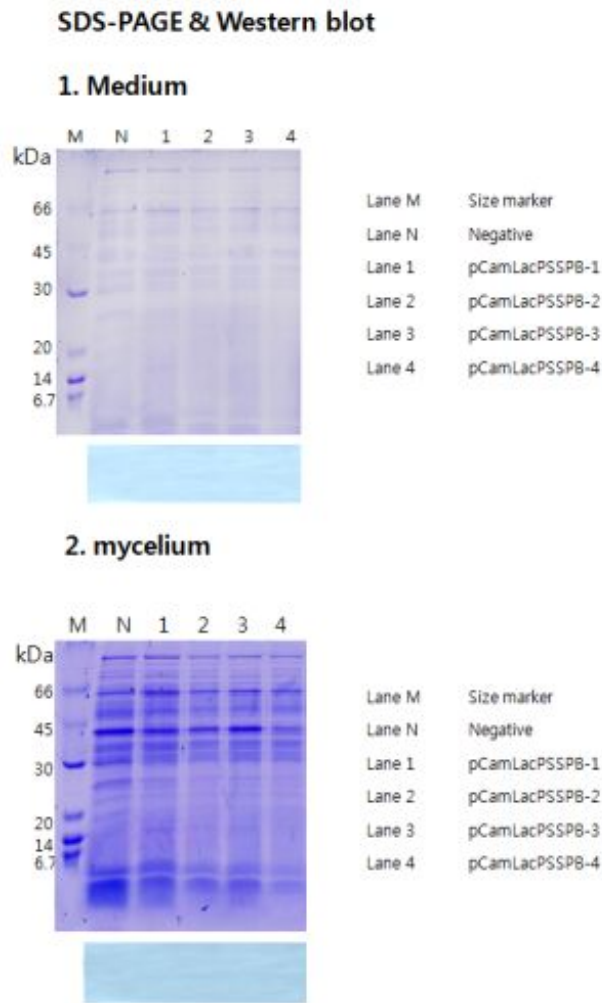


Fig. 159. Expression of the SPB from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSSPB vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPSSPB vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 159에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 SPB가 발현되지 않았다.

(마) Epidermal growth factor

① 클로닝 전략

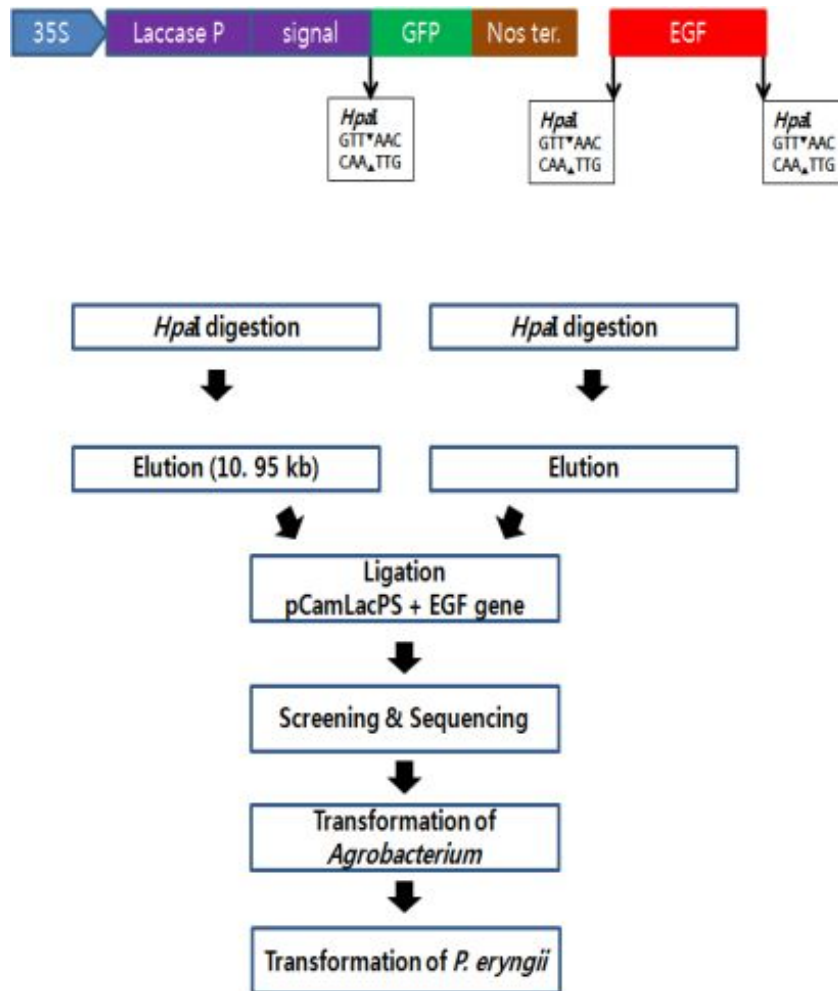


Fig. 160. Cloning strategy of EGF gene into pCamLacPS containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 160에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.95kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPS vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 EGF는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPSEGF 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 EGF reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA GCG CAG TTC CCA CCA C 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 161에서 보는 바와 같이 약 0.54 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

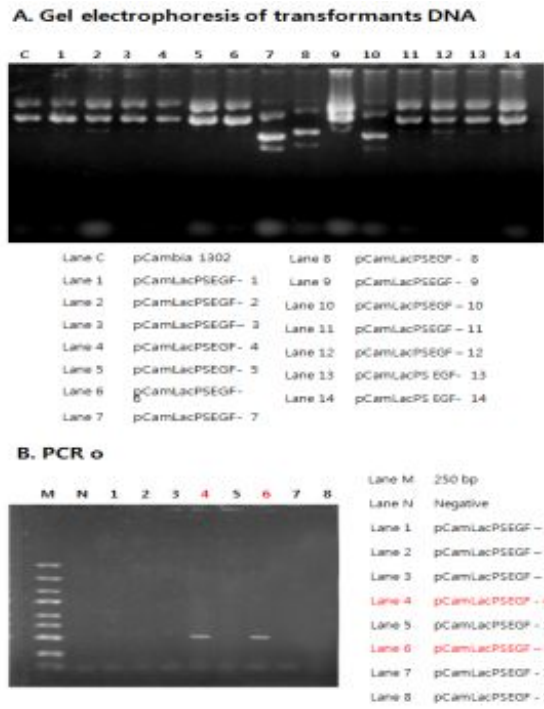


Fig. 161. Cloning of the EGF gene into pCamLacPS vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

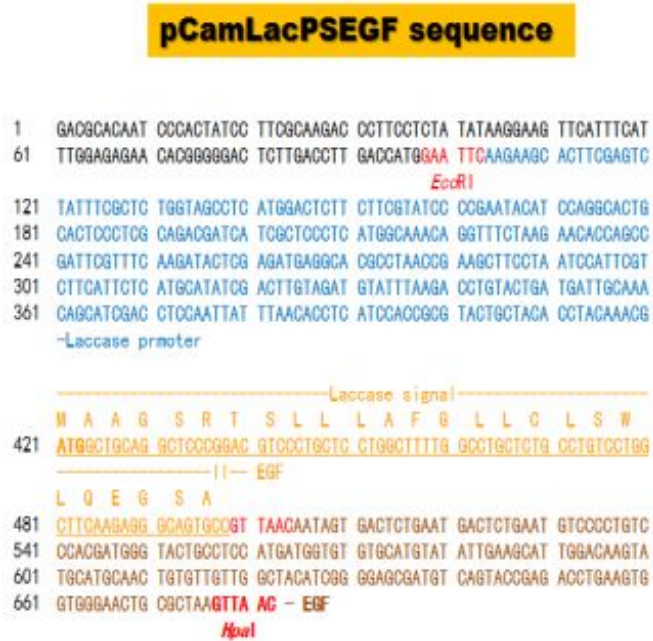


Fig. 162. DNA sequence analysis of pCamLacPSEGF vector

구성된 pCamLacPSEGF 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 162에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 신호서열 및 EGF유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

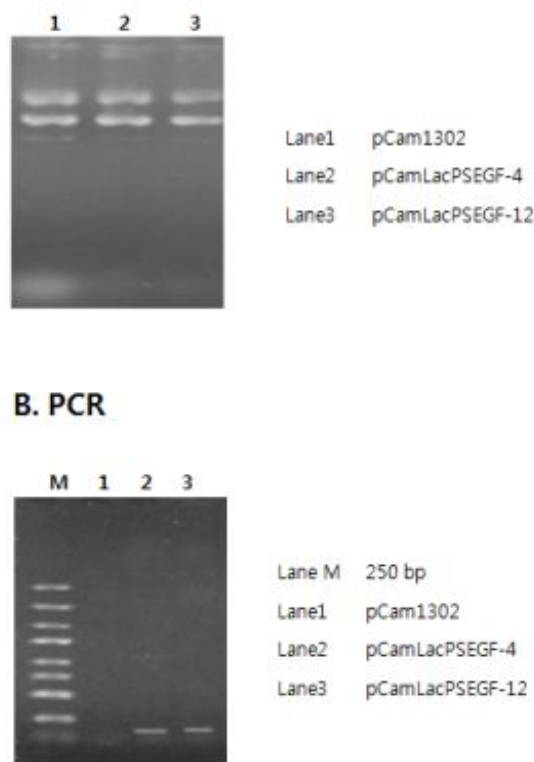


Fig. 163. Introduction of the pCamLacPSEGF into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPSEGF 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPSEGF-4, 12 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPSEGF 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, EGF Forward PCR primer (5' GTT AAC AAT AGT GAC TCT GAA 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TTA GCG CAG TTC CCA CCA C 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 163에서 보는 바와 같이 약 0.17 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별



Fig. 164. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPSEGF vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPSEGF vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPSEGF vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 164에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 EGF-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.17 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 165), laccase promoter에 의한 세포재생인자 (Epidermal growth factor)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

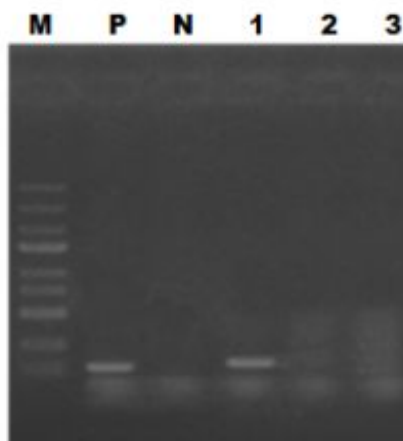
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

A. Extraction of Genomic DNA



Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPSEGF-1
Lane 2 pCamLacPSEGF-2
Lane 3 pCamLacPSEGF-3

B. PCR



M 250 bp
Lane P Positive
Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPSEGF-1
Lane 2 pCamLacPSEGF-2
Lane 3 pCamLacPSEGF-3

Fig. 165. PCR analysis of EGF gene in mycelial transformant (pCamLacPSEGF). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 EGF 유전자 발현

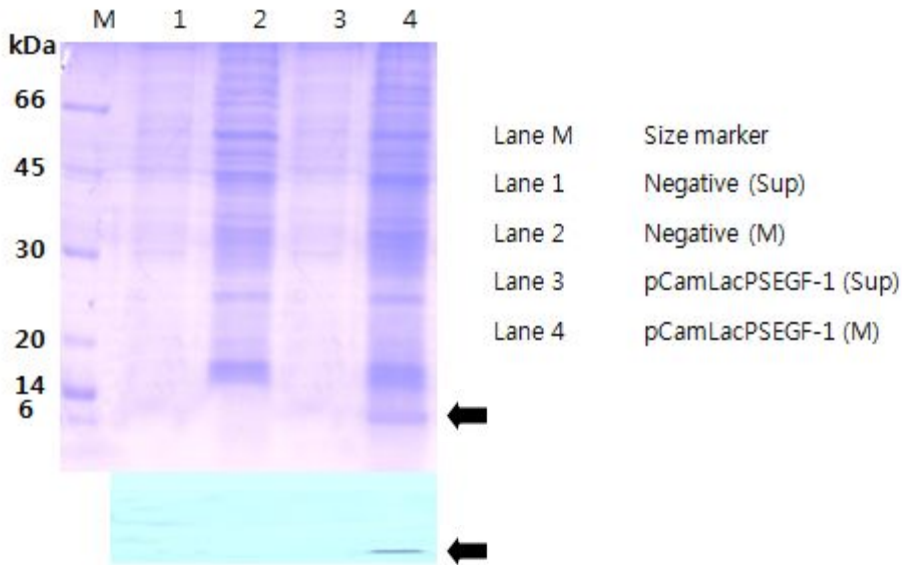
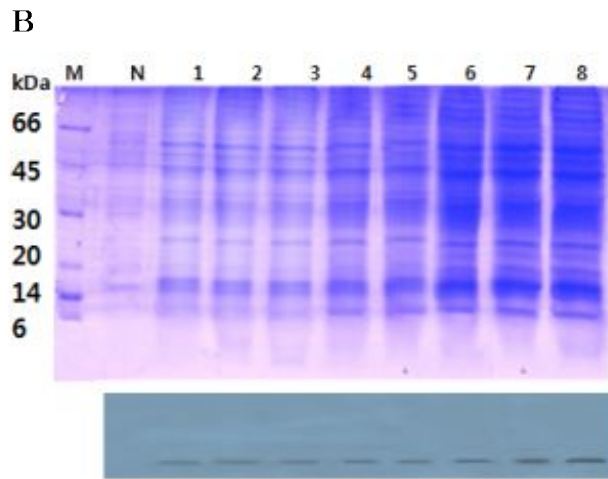
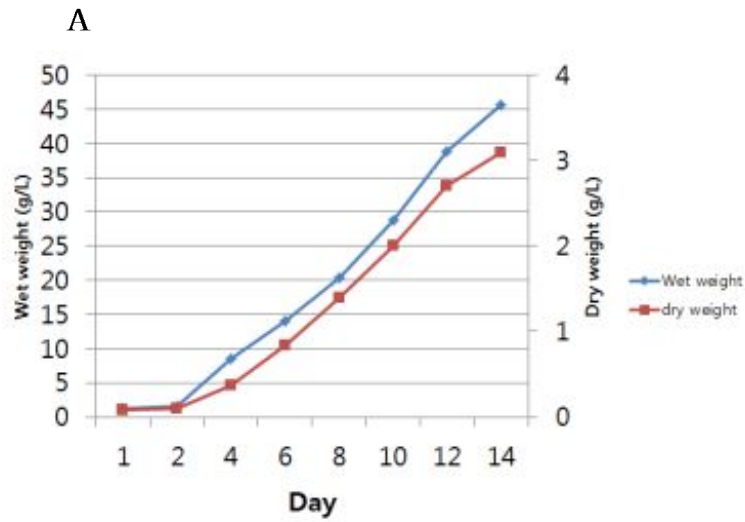


Fig. 166. Expression of the EGF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSEGF vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPSEGF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig.166에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석, 대조군 새송이버섯 균사체는 EGF 단백질을 생산하지 않았지만, pCamLacPSEGF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체에서 EGF 단백질은 발현 되었다. 새송이버섯 균사체로 도입되어 발현된 EGF 단백질은 유전자 앞에 붙어있는 laccase signal sequence가 균사체내에서 적절한 peptidase에 의해 정확하게 processing 되지 않은 것으로 판단된다.

⑧ 새송이버섯 균사체 증식비교



M: size maker	EGF 농도 (ug/mg)	Total protein (ug/mg)	Secreted EGF (%)
N: Negative Cntrol			
1: pCmaLacPSEGF-1 day	0.04	2.1	2%
2: pCmaLacPSEGF-2 day	0.08	4.3	2%
3: pCmaLacPSEGF-4 day	0.12	6.25	3%
4: pCmaLacPSEGF-6 day	0.17	8	3%
5: pCmaLacPSEGF-8 day	0.28	9.5	3%
6: pCmaLacPSEGF-10 day	0.44	11	4%
7: pCmaLacPSEGF-12 day	0.57	11.45	5%
8: pCmaLacPSEGF-14 day	0.625	12.5	5%

Fig. 167. Time profile of mycelia production in 10 L airlift type fermenter. (A) Dry weight and wet weight. (B) Expression of the EGF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSEGF vector in 10 L fermenter. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

pCamLacPSEGF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 14일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4℃, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하여 단백질을 분석하였다. 그 결과 특이성을 가지는 EGF단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. 발현된 단백질 농도는 이미지 분석기로 측정하여 총 단백질에 대한 % 비율로 나타내었다. 그 결과 Fig. 167에서 보는 것처럼 pCamLacPSEGF vector가 도입된 형질 전환체는 배양기간에 따라 총 단백질 중 4%(10일째), 5%(12일째), 5%(14일째)의 EGF 단백질을 생산하는 것으로 분석되었다.

(바) Erythropoietin

① 클로닝 전략

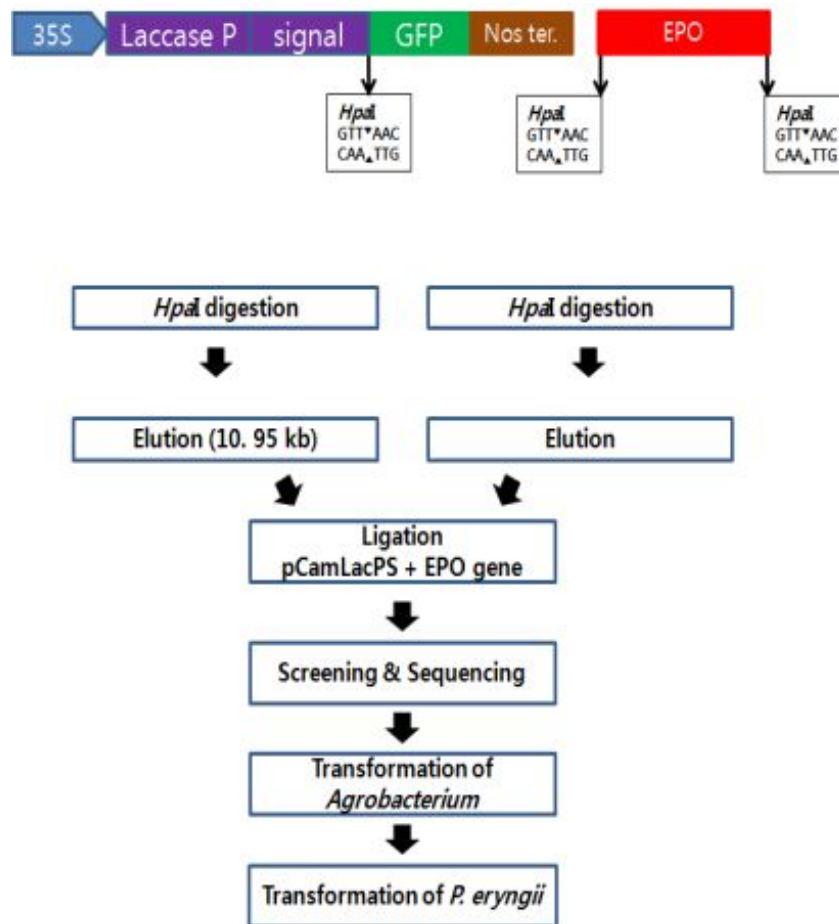
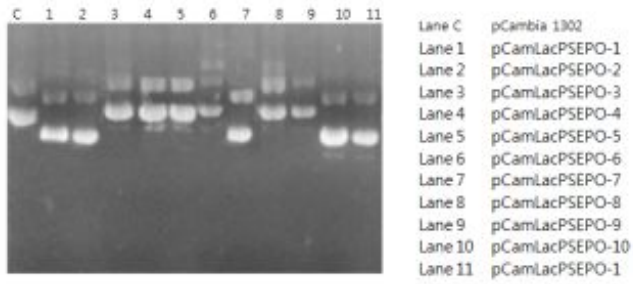


Fig. 168. Cloning strategy of EPO gene into pCamLacPS containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 168에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.95kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPS vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 EPO는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPSEPO 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 EPO reverse PCR primer: 5' GTT AAC TCA TCT GTC CCC TGT CCT GC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 169에서 보는 바와 같이 약 0.88 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

A. Gel electrophoresis of transformants DNA



B. PCR

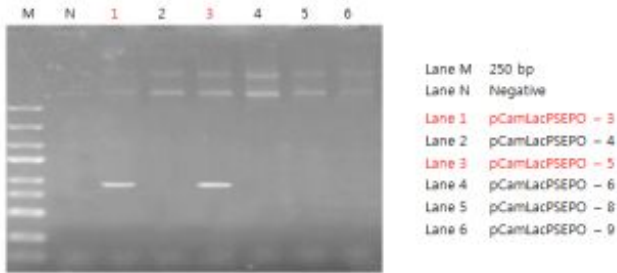


Fig. 169. Cloning of the EPO gene into pCamLacPS vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

pCamLacPSEPO sequence

```

1   GAGGCACAAT OCCACTATCC TTGCAAGAC CCTTCCTCTA TATAAGBAAB TTCATTTTCAT
61  TTGGAGAGAA CADGGBGGAC TCCTTGACCTT GACCATGGAA TTCAGAAAGC ACTTCGAGTC
      EcdRI
121 TATTTGCGTC TGGTAGCCTC ATGGACTGTT CTTCGTATCC CDBAATACAT CAGGCACTG
181 CACTCCCTCG CAGACGATCA TGCTCCCTC ATGGCAACA GGTTCATAAG AACACCAAGC
241 GATTGTTTTG AAGATACTCG AGATGAGGCA DGDCTAACCG AAGCTTCCTA ATCCATTGCT
301 CTTCATTCTC ATGCATATCG ACTTGTAGAT GTATTTAAGA CCTGTACTGA TGATTGCAAA
361 CAGCATCGAC CTCGAATTAT TTAACACCTC ATCGACCGCG TACTGTCTAG CCTACAAACG
-Laccase promoter

      Laccase signal
M A A G S R I S L L L A F Q L L C L S W
421 ATGCTGCGAG GCTCCGAGC GTCCCTGCTC GTGGCTTTTG GCTTGTCTG CTTGTCTG
      EGF
L Q E Q S A
481 CTTCAABAGG GCAGTCCGT TAACCGCCCC ACCACGCTC ATCTGTGACA GCGAGTCTCT
      AhaI
541 GAGAGGTAC CTCTTGGAGG CCAAGGAGGC DGAGAATATC ACGACGGGCT GTGCTGAACA
601 CTGACGCTTG AATGAGAATA TCACTGTCCC AGACACCAA GTTAATTTCT ATGCTGGA
661 GAGGATGGAG GTGCGGCAGC AGGCCGTAGA AGTCTGCGAG GGCCTGCGCC TGCTGTGGA
721 AGCTGTCTCG CCGGCGCAGG CCTGTGTTGT CAACTCTTCC CAGCGGTGG AGCCCTGCA
781 GCTGCATGTG GATAAAGCGG TCAGTGGGCT TCGACGCTC ACCACTGTG TTAGGGCTCT
841 GGGAGCCAG AAGGAAGCCA TCTCCCTCC AGATGCGGCC TCAGCTGCTC CACTCGAAC
1021 AATCACTGCT GACACTTTCC GCAAACTCTT CCBAGTCTAC TCCAATTTCC TCGGGGAAA
1081 GCTGAAGGTG TACACAGGGG AGGCTGCGAG GACAGGGGAC AGATGAGTTA AC - EPO
      AhaI
    
```

Fig. 170. DNA sequence analysis of pCamLacPSEPO vector.

구성된 pCamLacPSEPO 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여

Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 170에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 신호서열 및 EPO 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

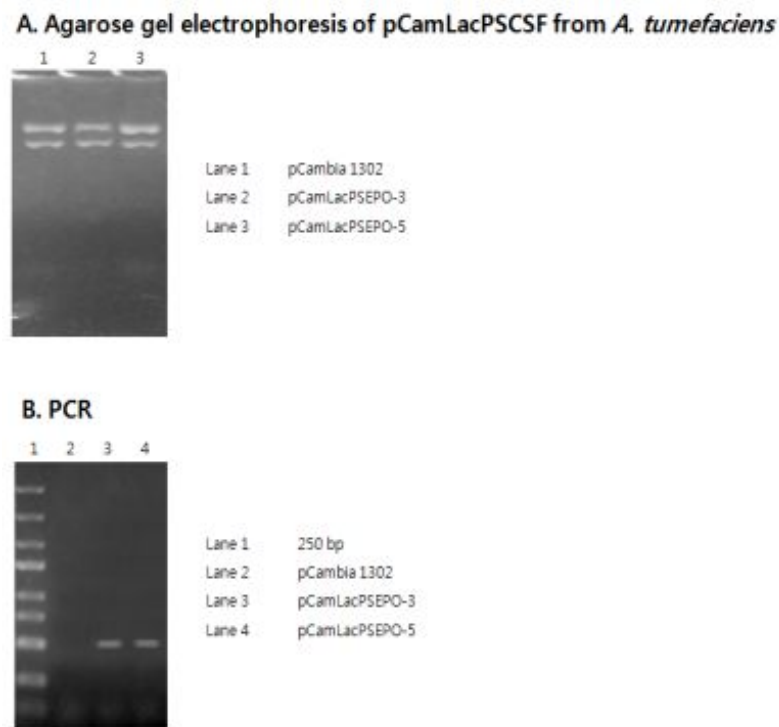


Fig. 171. Introduction of the pCamLacPSEPO into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPSEPO 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPSEPO 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPSEPO 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, EPO Forward PCR primer (5' GTT AAC ATG GCC CCA CCA CGC CTC AT 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TCA TCT GTC CCC TGT CCT GC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 171에서 보는 바와 같이 약 0.5 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별



Fig. 172. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPSEPO vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPSEPO vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPSEPO vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 172에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선발하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 EPO-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 591 bp 유전자를 확인하였고 (Fig. 173), laccase promoter와 signal sequence에 의한 Erythropoietin (EPO) 단백질의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

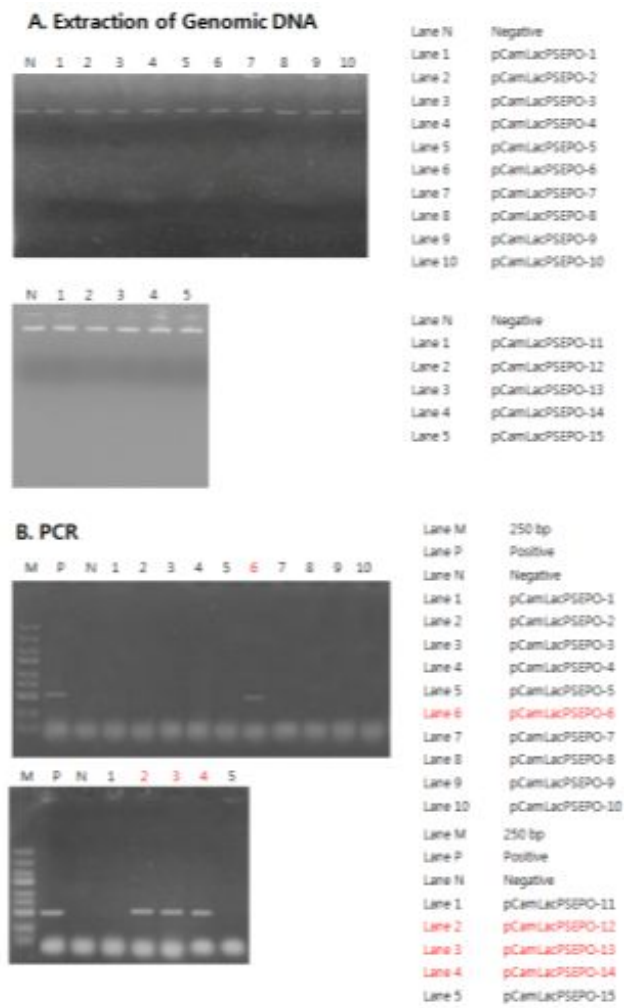


Fig. 173. PCR analysis of EPO gene in mycelial transformant (pCamLacPSEPO). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 EPO 유전자 발현

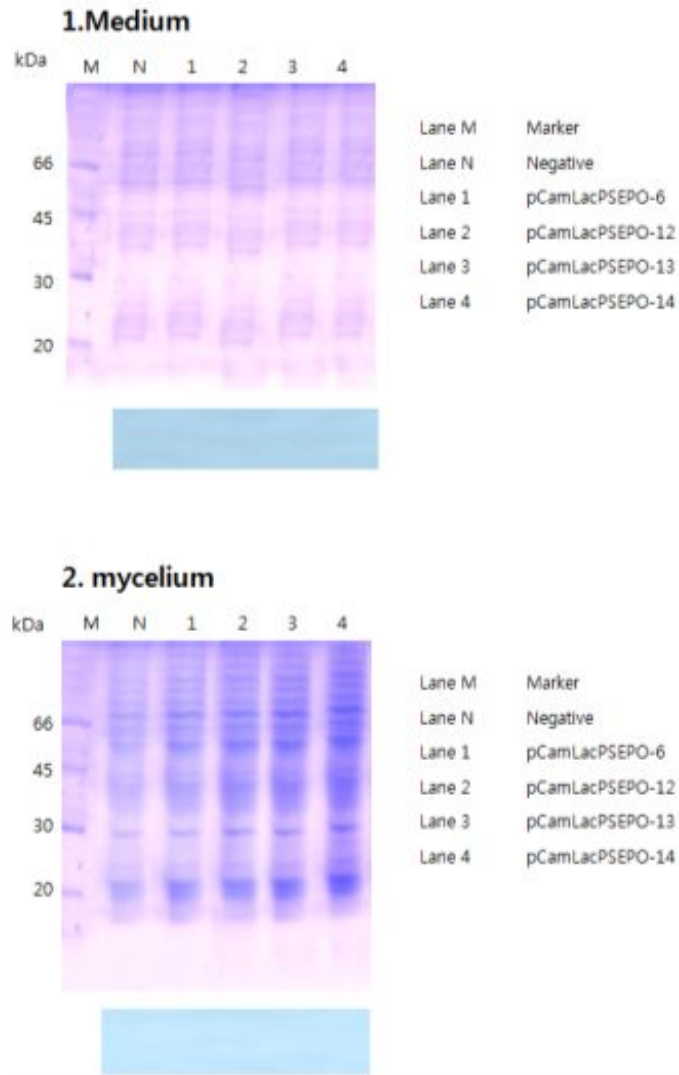


Fig. 174. Expression of the EPO from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSEPO vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

pCamLacPSEPO vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 174에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 SPB가 발현되지 않았다.

(7) Lac promoter/pR1b 분비서열을 포함하는 pCamLacPpR1b 벡터로 유용유전자 도입

(가) Human growth hormone

① 클로닝 전략

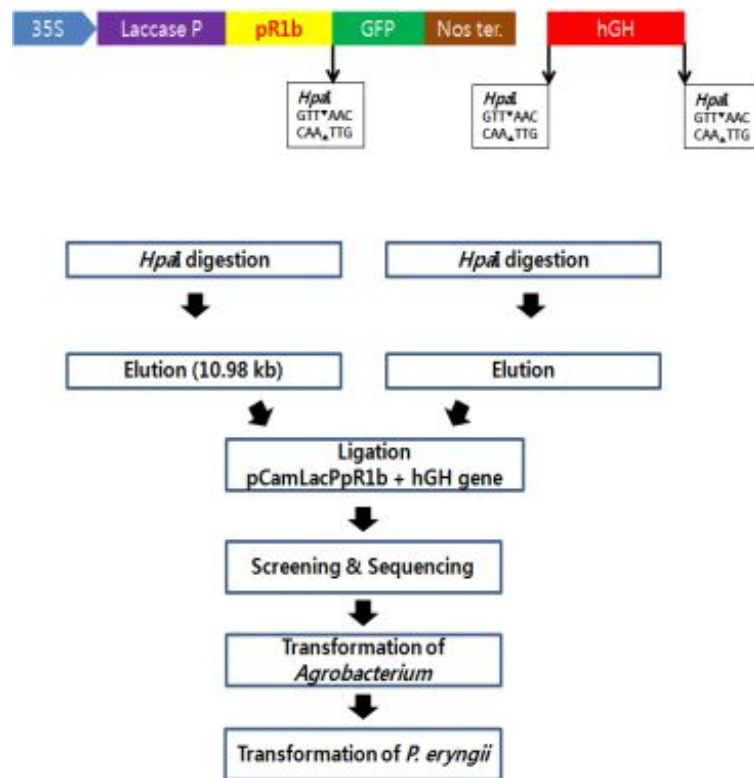


Fig. 175. Cloning strategy of hGH gene into pCamLacPpR1b containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 175에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPpR1b (10.98kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPpR1b vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.98 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 hGH는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPpR1bhGH 발현벡터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 hGH reverse PCR primer: 5' GTT AAC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 176에서 보는 바와 같이 약 1 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

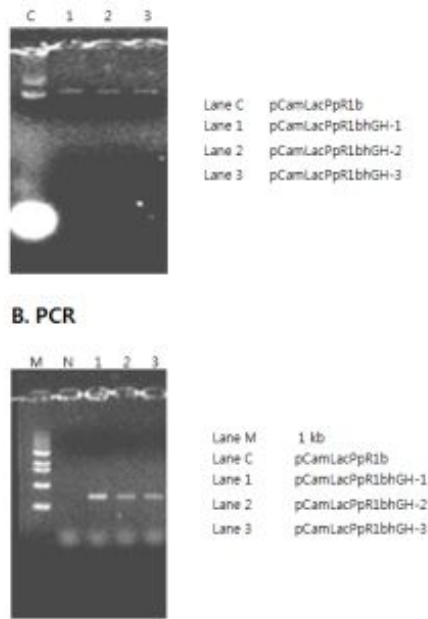


Fig. 176. Cloning of the hGH gene into pCamLacPpR1b vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

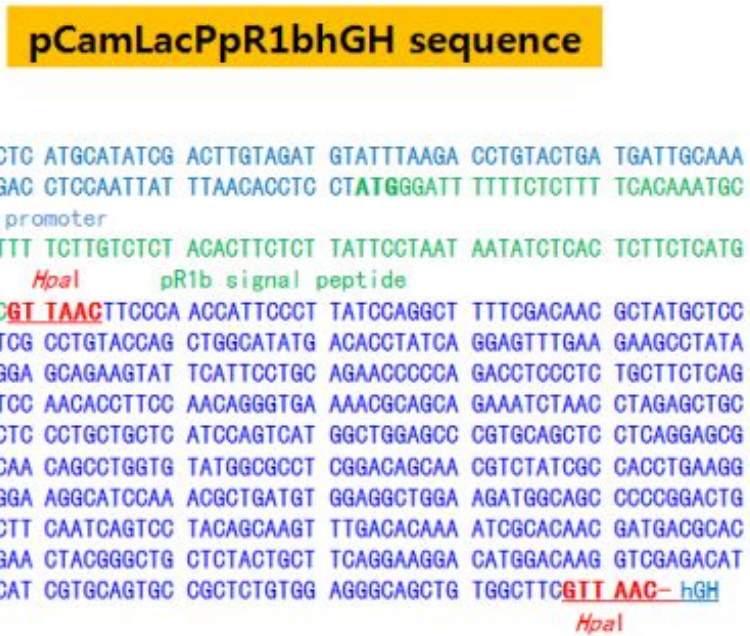
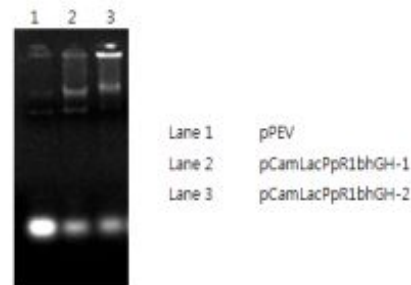


Fig. 177. DNA sequence analysis of pCamLacPpR1bhGH vector

구성된 pCamLacPpR1bhGH 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 177에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 pR1b 신호서열 및 hGH 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Gel electrophoresis of pCamLacPpR1bhGH from *A. tumefaciens*



B. PCR

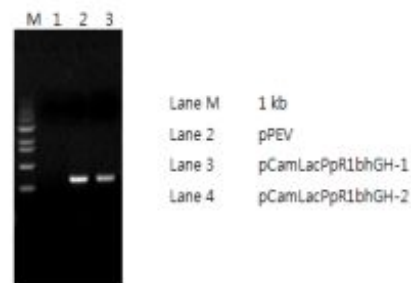


Fig. 178. Introduction of the pCamLacPpR1bhGH into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPpR1bhGH 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPpR1bhGH 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPpR1bhGH 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, hGH Forward PCR primer (5' GTT AAC TTC CCA ACC ATT CCC TTA TC 3')와 hGH Reverse PCR primer (5' GTT AAC CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 178에서 보는 바와 같이 약 0.57 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

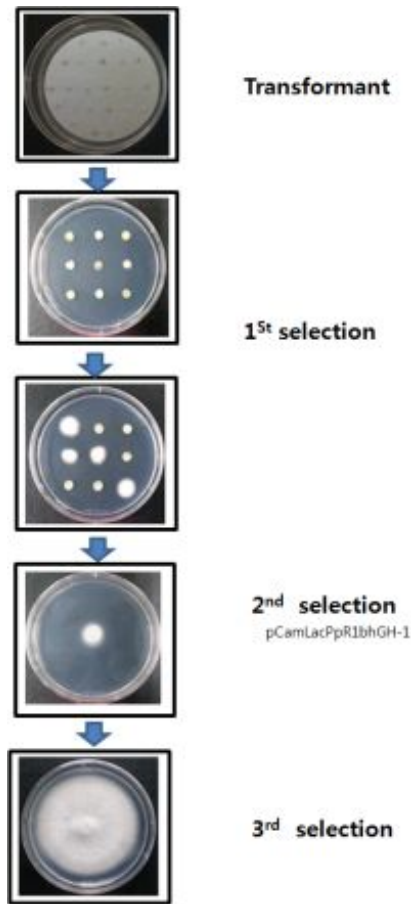


Fig. 179. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPpR1bhGH vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPpR1bhGH vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPpR1bhGH vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 179에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 hGH-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 570 bp 유전자를 확인하였고 (Fig. 180), laccase promoter 및 분비서열에 의한 인간 성장 호르몬 단백질 (Human growth hormone)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

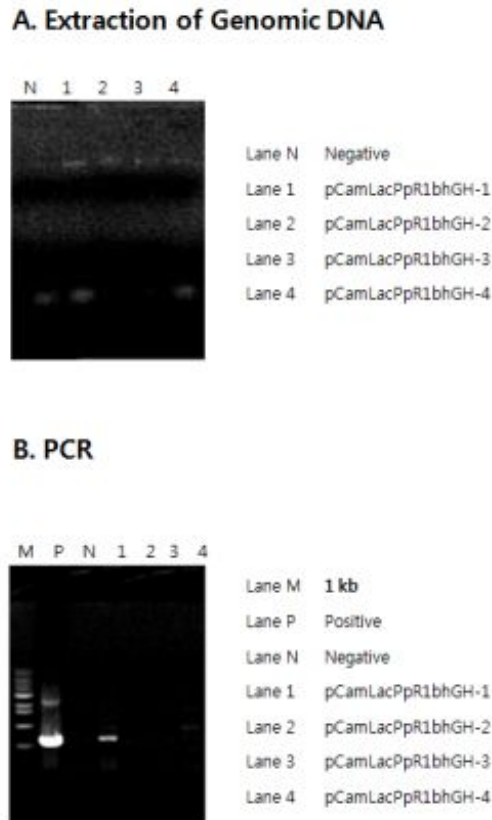


Fig. 180. PCR analysis of hGH gene in mycelial transformant (pCamLacPpR1bhGH). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현

pCamLacPpR1bhGH vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. SDS-PAGE를 통하여 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색한 결과 Fig. 181에서 보는바와 같이 약 23 kDa 정도 위치에서 발현된 hGH 밴드를 확인 할 수 있었다. SDS-PAGE gel 위에 분리된 단백질을 PVDF membrane에 transfer 한 후 2.5% skim milk (in TBST)로 blocking 하여 비특이적 반응을 차단하고 hGH 단백질에 특이성을 갖는 1차 항체를 처리한 다음, 1차 항체에 특이성을 가지면서 발색효소를 갖는 2차 항체를 처리한 후, 2차 항체에 결합된 효소의 기질로서 발색물질을 처리하여 hGH 항체에 특이성을 가지는 단백질을 분석하였다. 그 결과

SDS-PAGE hGH band 위치와 동일한 위치에서 특이성을 가지는 hGH 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. Fig. 174에서 보는 것처럼 pCamLacPpR1bhGH vector가 도입되지 않은 새송이버섯 균사체에서는 hGH 단백질을 생산하지 않았지만, pCamLacPpR1bhGH vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체에서 hGH가 발현되었다.

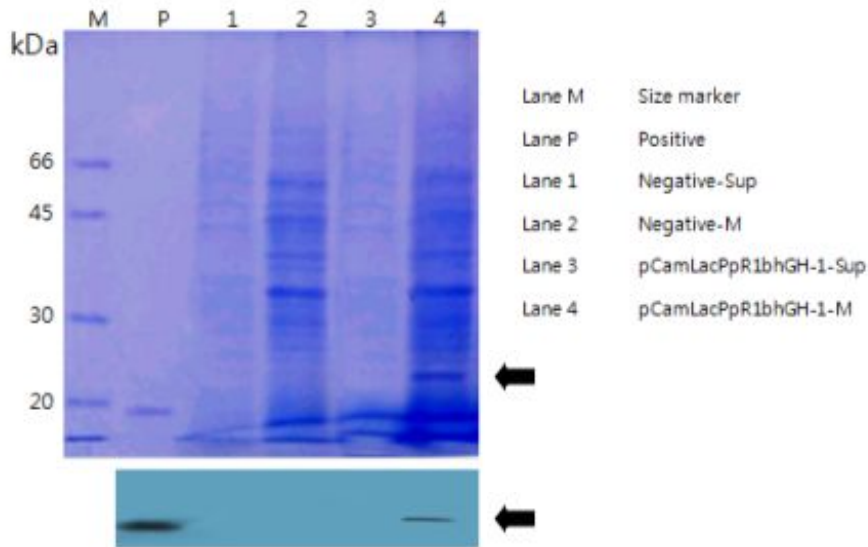


Fig. 181. Expression of the hGH from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bhGH vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

새송이버섯 균사체로 도입되어 발현된 hGH 단백질은 mature form이 191 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량이 21 kDa 정도의 크기이다. 그러나 SDS-PAGE 상에서 나타난 밴드의 위치는 약 24 kDa 위치인 것으로 보아 hGH 유전자 앞에 붙어있는 pR1b signal sequence가 균사체내에서 적절한 peptidase에 의해 정확하게 processing 되지 않은 것으로 판단된다.

⑧ 새송이버섯 균사체 증식비교

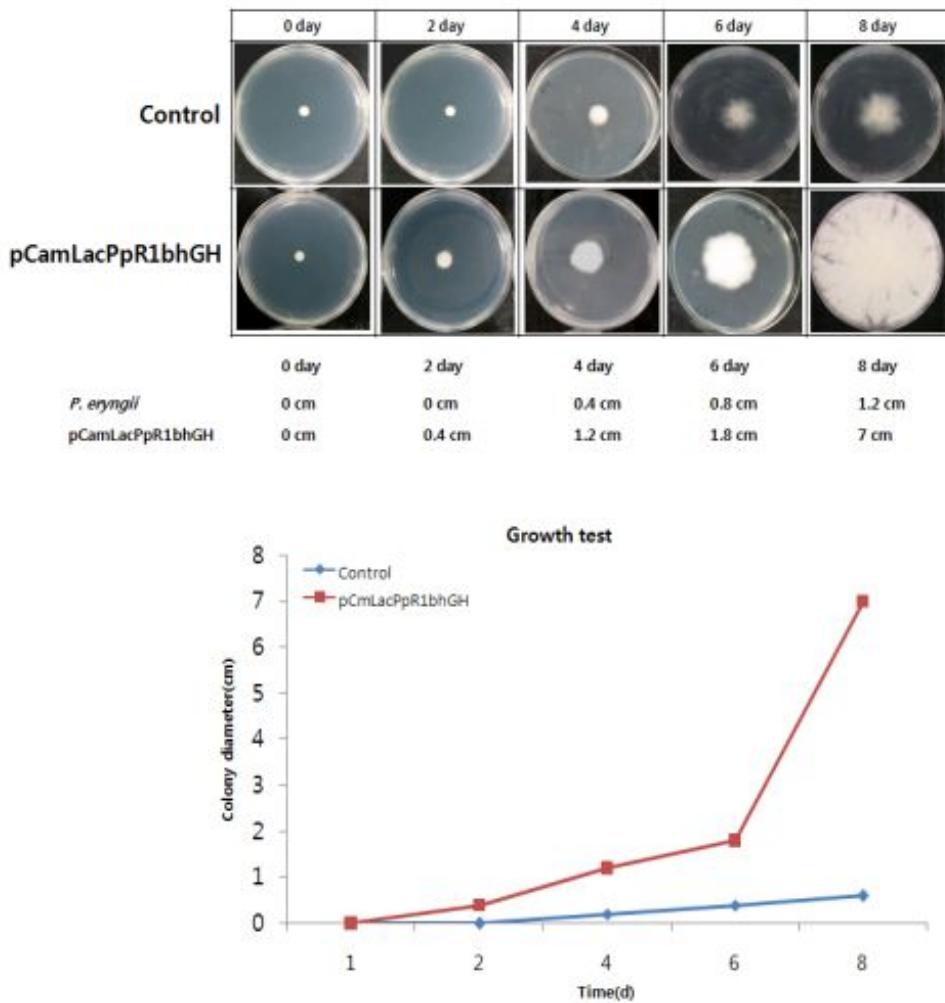
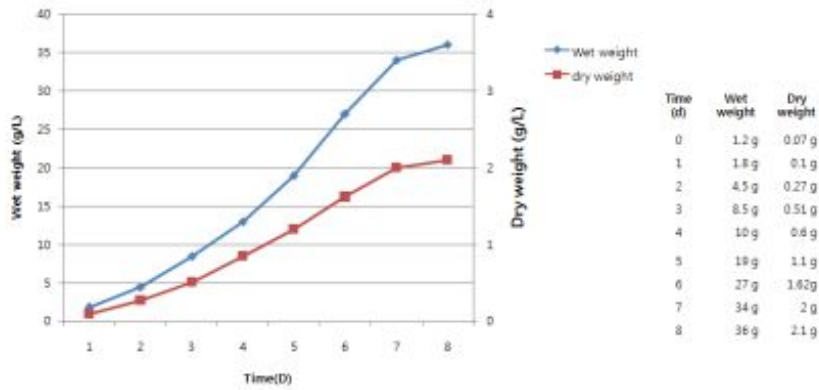


Fig. 182. Comparison of mycelial growth rates between the recombinant pCamLacPpR1bhGH and control *P. eryngii*.

Fig. 136에서 pCamLacPpR1bhGH vector 도입된 새송이버섯 균사체의 성장속도 비교는 페트리 접시에서 연구되었다. 페트리 접시 실험결과, hGH 유전자가 도입된 재조합 균사체의 성장속도가 대조균 균주 보다 대략 5.8배 높은 것을 관찰하였다.

⑨ 새송이버섯 균사체에서 hGH 유전자 발현

A



B

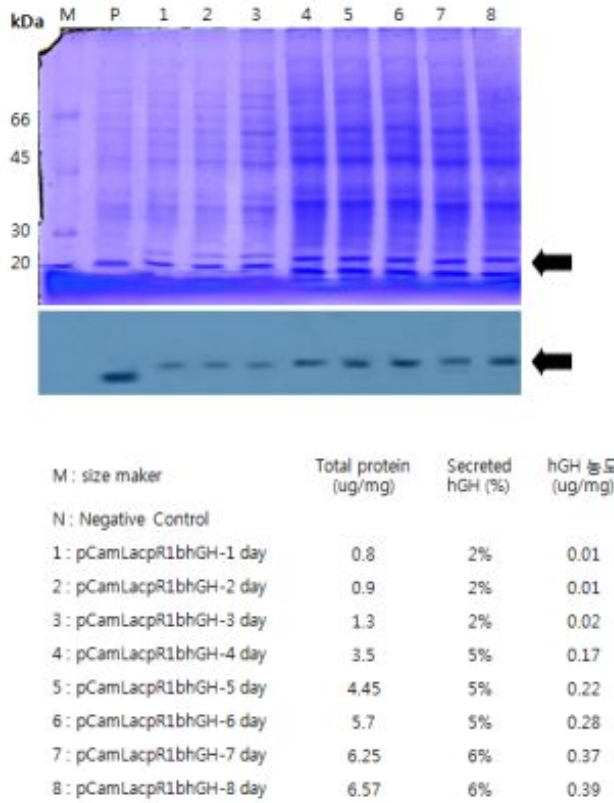


Fig. 183. Time profile of mycelia production in 10 L airlift type fermenter. (A) (A) Dry weight and wet weight. (B) Expression of the hGH from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bhGH vector in 10 L fermenter. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

pCamLacPpR1bhGH vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 8일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4℃, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하여 단백질을 분석하였다. 그 결과 SDS-PAGE hGH band 위치와 동일한 위치에서 특이성을 가지는 hGH 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. 발현된 단백질 농도는 이미지 분석기로 측정하여 총 단백질에 대한 % 비율로 나타내었다. 그 결과 Fig. 183에서 보는 것처럼 pCamLacPpR1bhGH vector가 도입된 형질전환체는 배양기간에 따라 총 단백질 중 5%(6일째), 6%(8일째)의 hGH 단백질을 생산하는 것으로 분석되었다. .

(나) PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)

① 클로닝 전략

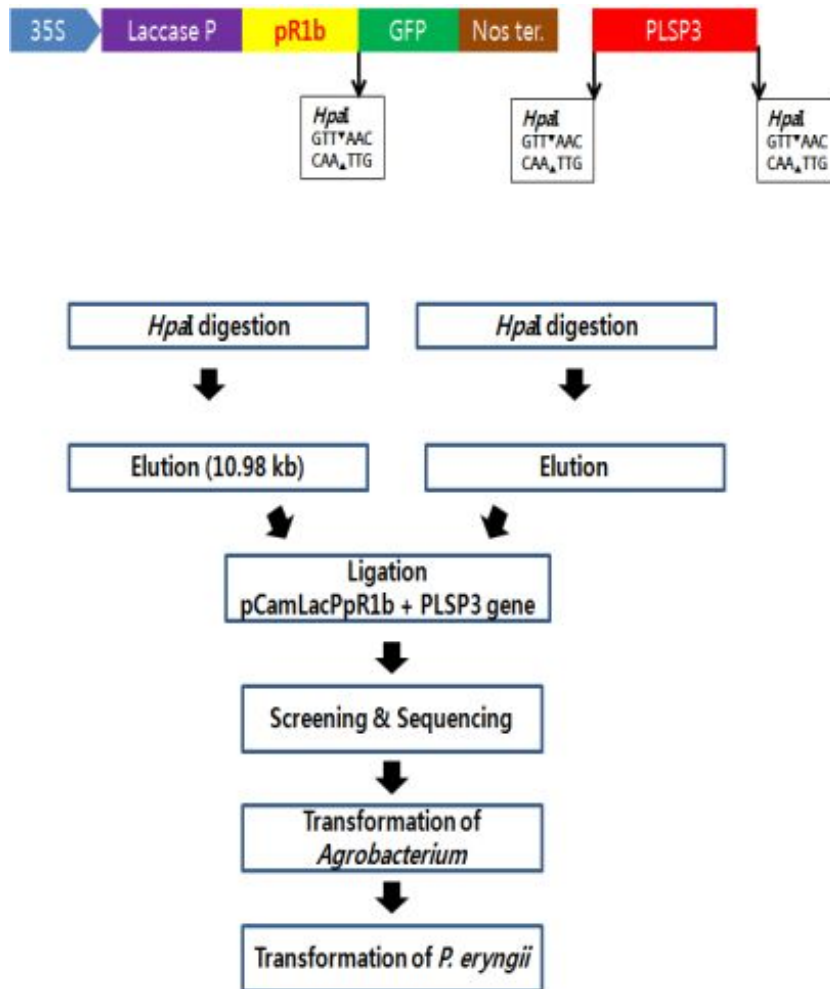


Fig. 184. Cloning strategy of PLSP3 gene into pCamLacPpR1b containing laccase promoter and pR1b signal sequence.

Fig. 184에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.98kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPpR1b vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.98 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 PLSP3는 *HpaI*으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPpR1bhGH 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 PLSP3 reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA GTT GAT GTT TCC TAT CCA GTC 3' PCR를 한 결과 Fig. 185에서 보는 바와 같이 약 1.1 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

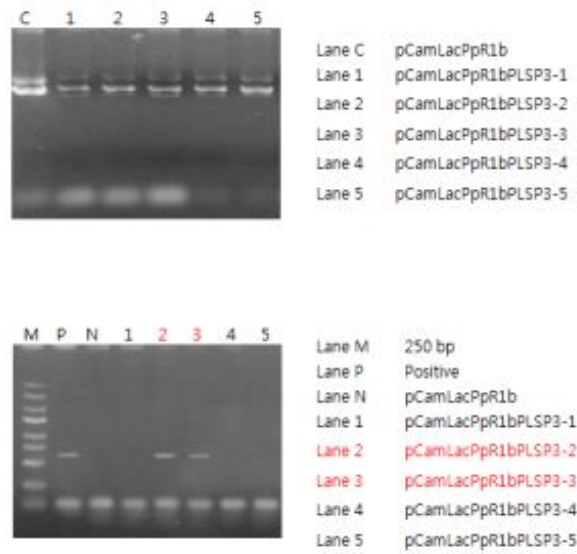


Fig. 185. Cloning of the PLSP3 gene into pCamLacPpR1b vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

```

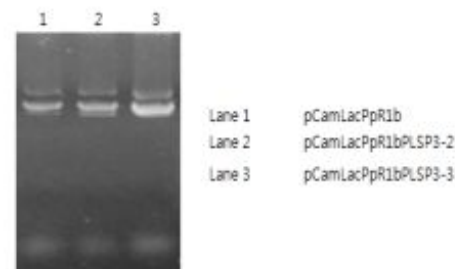
1   CTTCAATTCTC ATGCATATCG ACTTGTAGAT GTATTTAAGA CCTGTACTGA TGATTGCAAA
61  CAGCATCGAC GTCCAATTAT TTAACACCTC CTATGGGATT TTTTCTCTTT TCACAAATGC
    Laccase promoter
121 CCTCATTITTT TCTTGTCTCT ACACITCTCT TATTGCTAAT AATATCTCAC TCTTCTCATG
    HpaI      pR1b signal peptide
181 CCCAAAACGT TAACATTGTA GGAGGCCAGG ACGCCAGGCA AGGTGAATTC CCCTGGCAGG
241 TGGGCATGAG AAGAACCACA AGCTCCCTTT TCTGTGGTGC CATCGTCATC GGTACACGAT
301 GGATCATGTC TGCTGCTCAC TGTACCGATA GAGAACTGT TTCCAATCTG ATCCTAACAG
361 TTGGAGACAC AACCGTAATG ACAACGAAGG TACAGAGCAG GACCTCAGGG TTAGCCTGCT
421 GAGACAACAC CCTGGCTACA ATAGAATTAC TCTTGACAAC GACATTTCTC TGCTGCAAAC
481 GTCCACCGCC ATCGGCCTAA ATGCGGACGT TGTGCTGCA TGTCTCCAG CTGACAGTGA
541 CTTTACTGGC AGAAGTCTG TGTGTCTGG ATGGGAACT CTAAGATCTG GTGGACCTTG
601 CTGTCCTACC CAGCTGCAGT ACGTACAGG GCCTGTCATC AGTAACGCCG AGTGTAAATC
661 TGTAGATTAC CCAGGTGACA TCACAGATGG TATGCTCTGT GCTGGTGACC GTTACAACAC
721 CGACGCTTGC CAGGGAGATT CCGGTGGCCC CCTGGTGGTG AAGACTAGCG GCCTTTTCCA
781 AGTCATCGGT ATCGTGTCTT GGGGCATTGG ATGTGCTTCT GATTATGCTG GAGTATACGC
841 CAGGGTCACC ACCTACATGG ACTGGATAGG AAACATCAAC TAAGTTAAG - PLSP3
    HpaI
  
```

Fig. 186. DNA sequence analysis of pCamLacPpR1bPLSP3 vector

구성된 pCamLacPpR1bPLSP3 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 187에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 pR1b 신호서열 및 PLSP3 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Gel electrophoresis of pCamLacPpR1bPLSP3 from *A. tumefaciens*



B. PCR

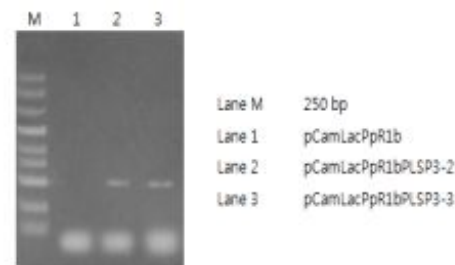


Fig. 187. Introduction of the pCamLacPpR1bPLSP3 into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPpR1bPLSP3 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPpR1bPLSP3 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPpR1bPLSP3 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, PLSP3 Forward PCR primer (5' GTT AAC ATT GTA GGA GGC CAG GAC GCC 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TTA GTT GAT GTT TCC TAT CCA GTC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 180에서 보는 바와 같이 약 0.69 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

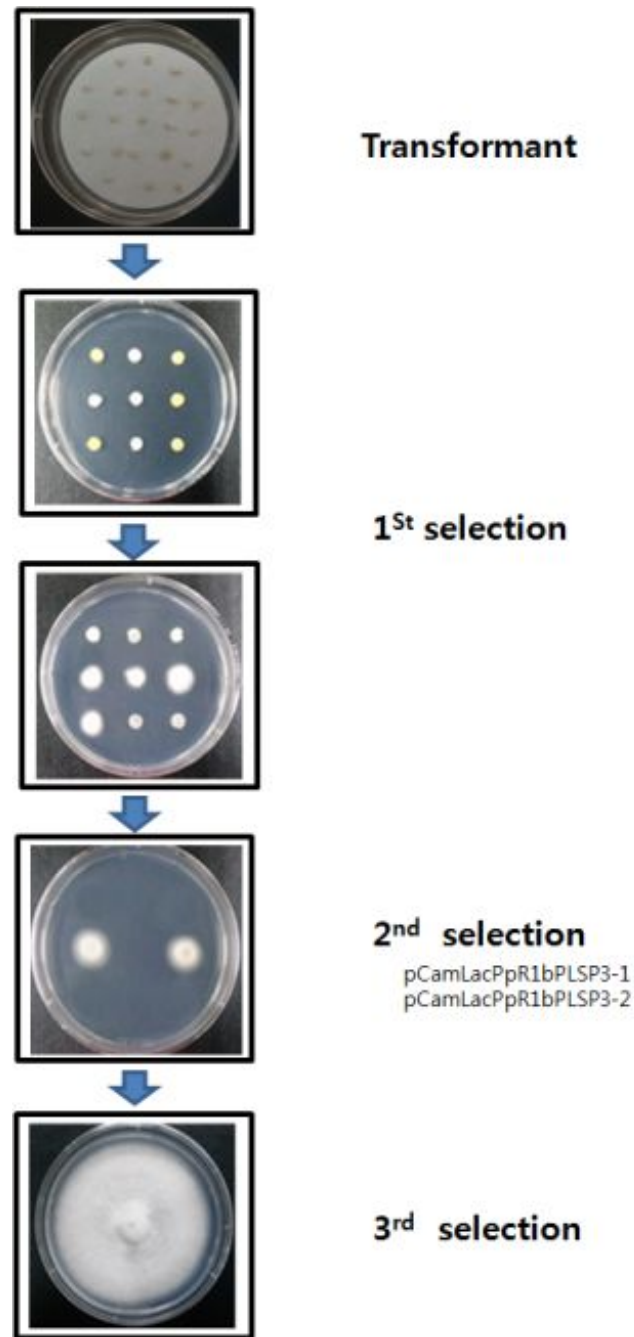


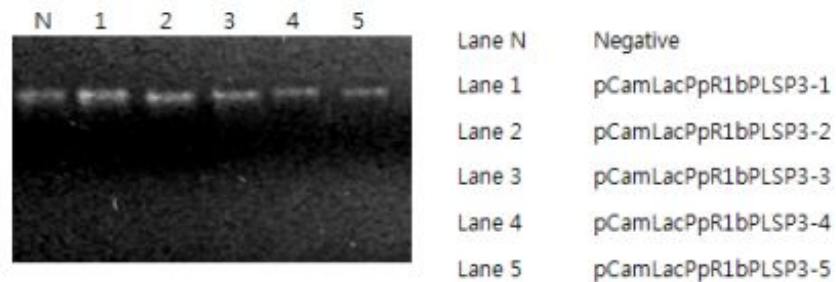
Fig. 188. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPpR1bPLSP3 vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPpR1bPLSP3 vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPpR1bPLSP3 vector를

함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 188에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선발하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 PLSP3-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.69 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 189), 혈전용해제 단백질 (*Periserrula leucophryna* serine protease, PLSP3)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

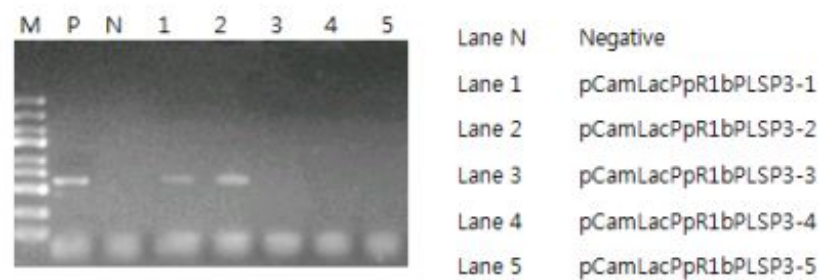


Fig. 189. PCR analysis of PLSP3 gene in mycelial transformant (pCamLacPpR1b PLSP3). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 PLSP3 유전자 발현

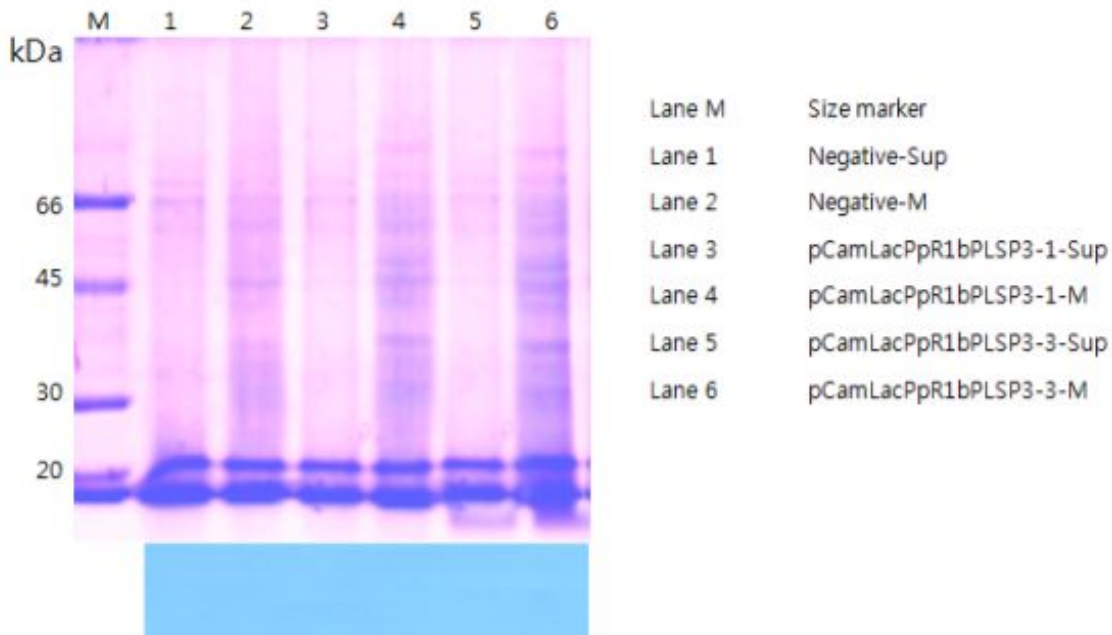


Fig. 190. Expression of the PLSP3 from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bPLSP3 vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

pCamLacPpR1bPLSP3 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. 그 결과 Fig. 190에서 보는 것처럼 pCamLacPpR1bPLSP3 vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체에서 PLSP3가 발현되었다.

(다) Colony stimulating factor

① 클로닝 전략

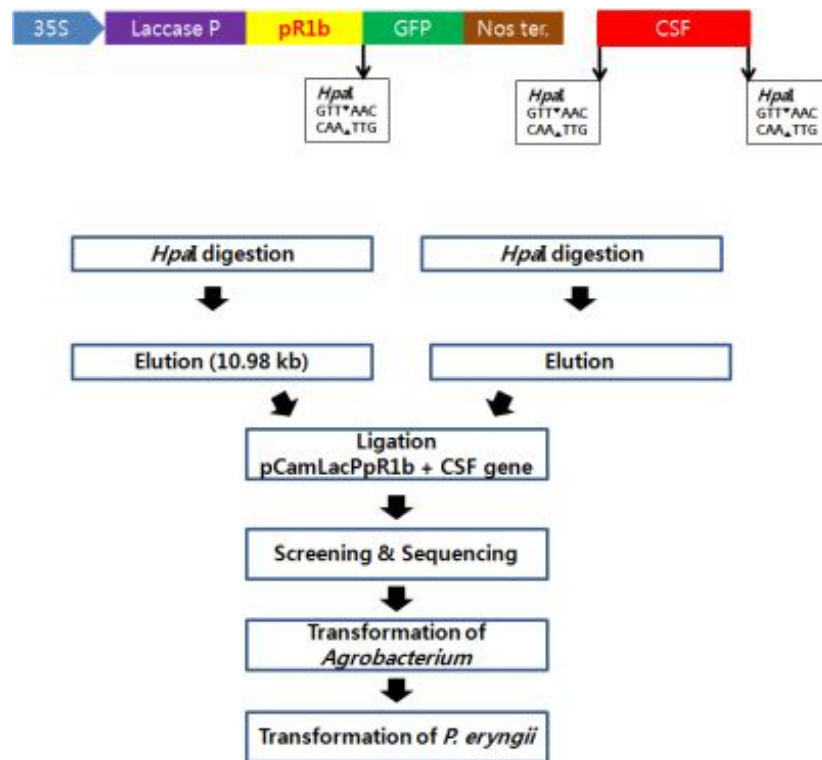


Fig. 191. Cloning strategy of CSF gene into pCamLacPpR1b containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 191에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPS (10.98kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPpR1b vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.98 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 CSF는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPpR1bCSF 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 CSF reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA TCA GGG CTG CGC AAG GTG G 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 192에서 보는 바와 같이 약 0.95 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

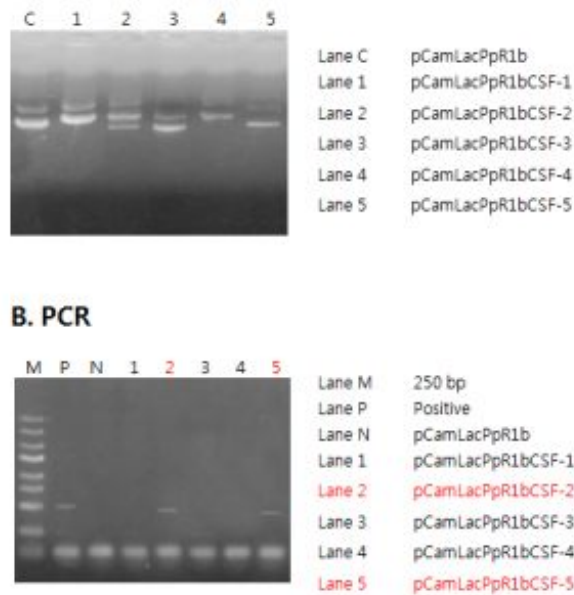


Fig. 192. Cloning of the CSF gene into pCamLacPpR1b vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

```

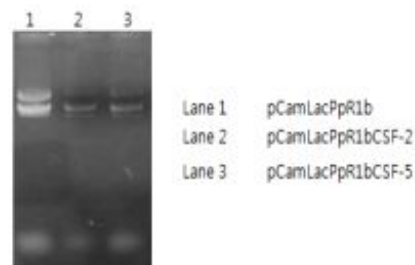
1   CTTCAATTCTC ATGCATATCG ACTTGTAGAT GTATTTAAGA CCTGTACTGA TGATTGCAA
61  CAGCATCGAC GTCCAATTAT TTAACACCTC CTATGGGATT TTTTCTCTTT TCACAAATGC
    Laccase promoter
121 CCTCATTTTT TCTTGTCTCT ACACTTCTCT TATTCCTAAT AATATCTCAC TCTTCTGATG
    HpaI pR1b signal peptide
181 CCCCCAACGT TAACACCCCT CTGGGCCCTG CCAGCTCCCT GCCCAGAGC TTCCTGCTCA
241 AGTGCTTAGA GCAAGTGAGG AAGATCCAGG GCGATGGCGC AGCGCTCCAG GAGAAGCTGT
301 GTGCCACCTA CAAGCTGTGC CACCCGAGG AGCTGGTGCT GCTCGGACAC TCTCTGGGCA
361 TCCCCTGGGC TCCCCTGAGC TCCTGCCCA GCCAGGCCCT GCAGCTGGCA GGCTGCTTGA
421 GCCAACTCCA TAGCGGCCTT TTCCTCTACC AGGGGCTCCT GCAGGCCCTG GAAGGGATAT
481 CCCCCGAGTT GGGTCCCACC TTGGACACAC TGCAGCTGGA CGTCGCCGAC TTTGCCACCA
541 CCATCTGGCA GCAGATGGAA GAACTGGGAA TGGCCCTGCT CCTGCAGCCC ACCCAGGGTG
601 CCATGCCGGC CTTCCCTCT GCTTCCAGC GCCGGGCAGG AGGGGTCCTG GTTGTAGCC
661 ATCTGCAGAG CTTCCCTGGAG GTGTCGTACC GCGTCTACG CCACCTTGC GAGCCCTGAT
721 AAGTTAAG - CSF
    HpaI
  
```

Fig. 193. DNA sequence analysis of pCamLacPpR1bCSF vector.

구성된 pCamLacPpR1bCSF 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 193에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 pR1b 신호서열 및 CSF 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Gel electrophoresis of pCamLacPpR1bCSF from *A. tumefaciens*



B. PCR

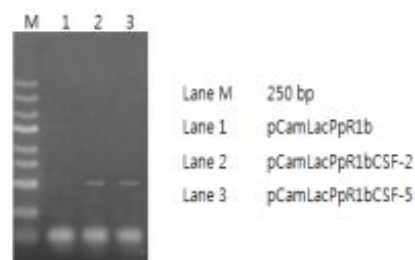


Fig. 194. Introduction of the pCamLacPpR1bCSF into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPpR1bCSF 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPpR1bCSF 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPpR1bCSF 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, CSF Forward PCR primer (5' GTT AAC ACC CCC CTG GGC CCT GCC AG 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TTA TCA GGG CTG CGC AAG GTG G 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 194에서 보는 바와 같이 약 0.52 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

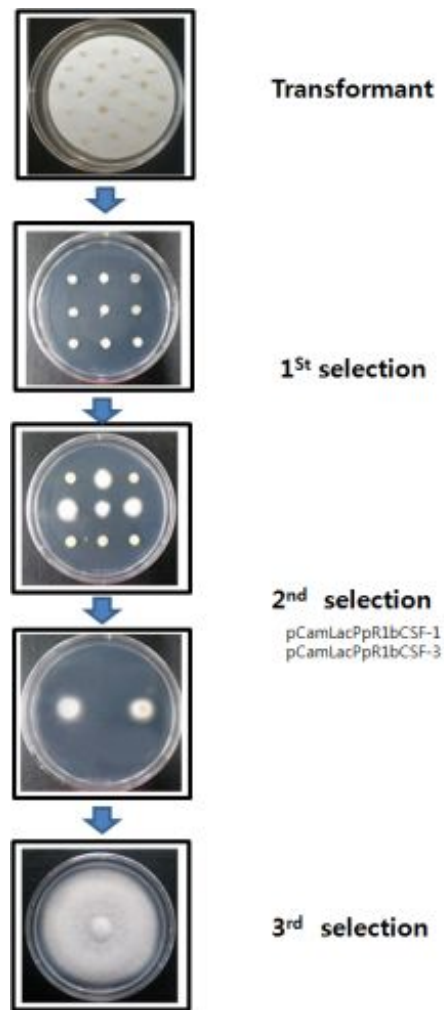


Fig. 195. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPpR1bCSF vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPpR1bCSF vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPpR1bCSF vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 195에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 CSF-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.52 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 196), laccase promoter 및 pR1b 신호서열에 의한 과립구 군체 (콜로니) 자극인자 단백질 (Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

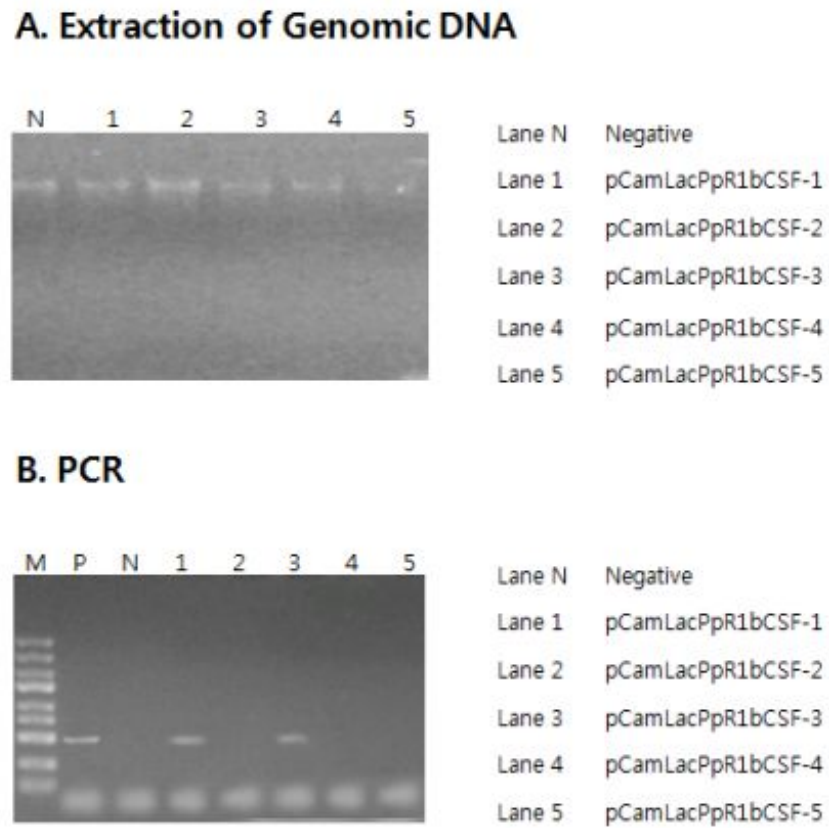


Fig. 196. PCR analysis of CSF gene in mycelial transformant (pCamLacPpR1bCSF). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR.

⑦ 새송이버섯 균사체에서 CSF 유전자 발현

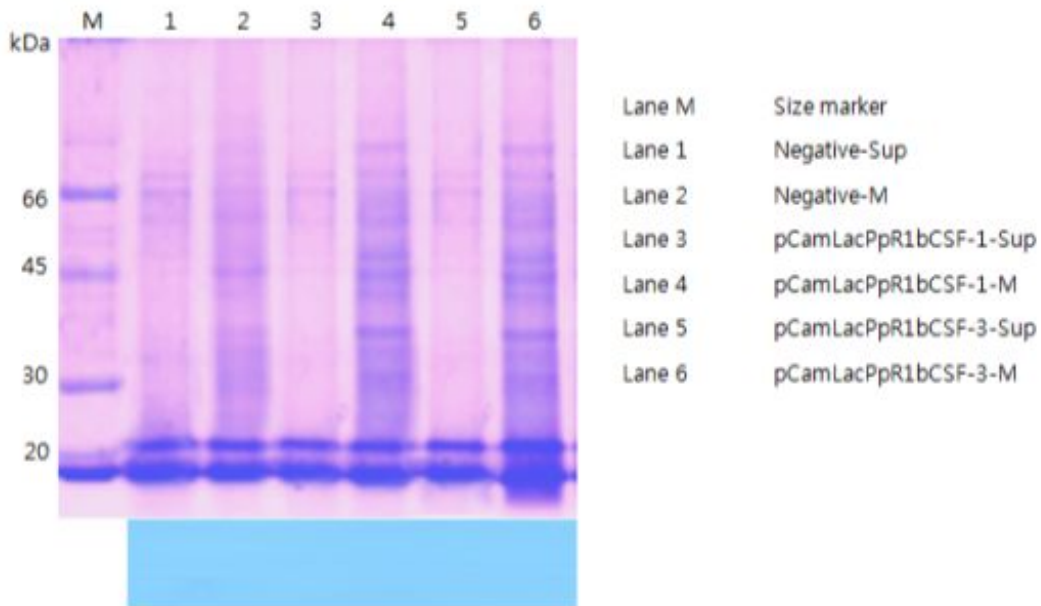


Fig. 197. Expression of the CSF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bCSF vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

pCamLacPpR1bCSF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 197에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 CSF가 발현되지 않았다.

(라) Surfactant protein B

① 클로닝 전략

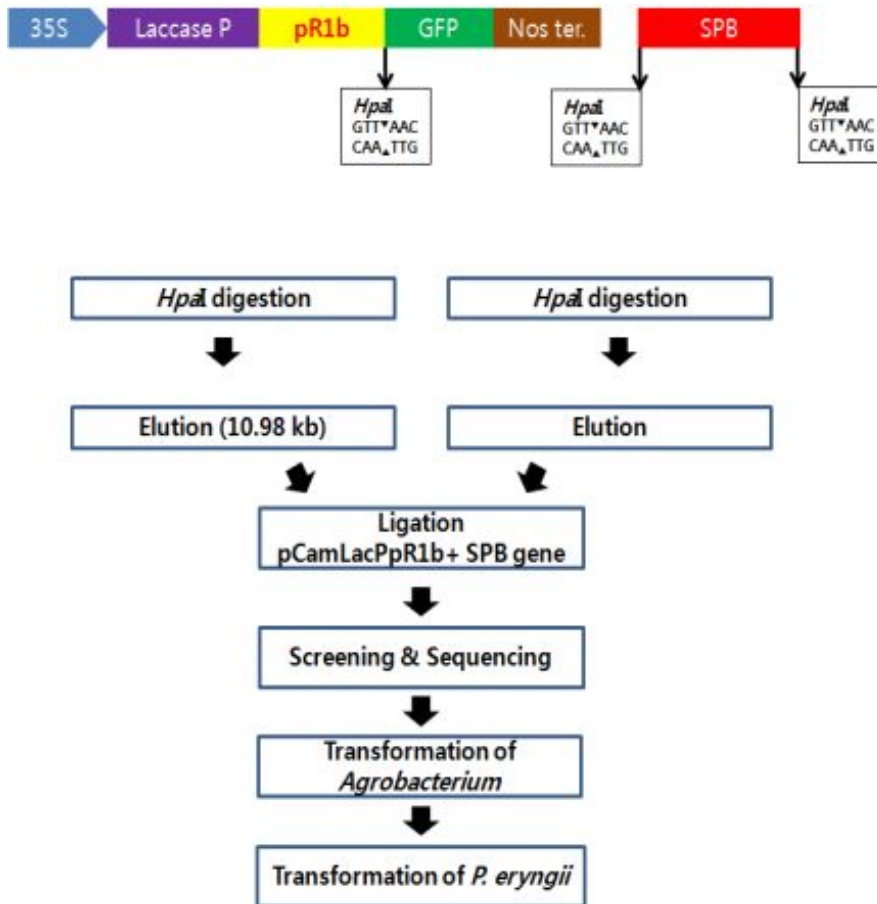


Fig. 198. Cloning strategy of SPB gene into pCamLacPpR1b containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 198에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPpR1b (10.98kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPpR1b vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.98 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 SPB는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPpR1bSPB 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 SPB reverse PCR primer: 5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 199에서 보는 바와 같이 약 0.67 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

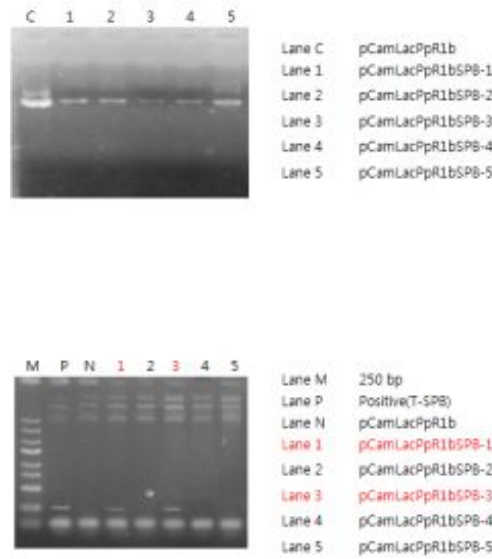


Fig. 199. Cloning of the SPB gene into pCamLacPpR1b vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

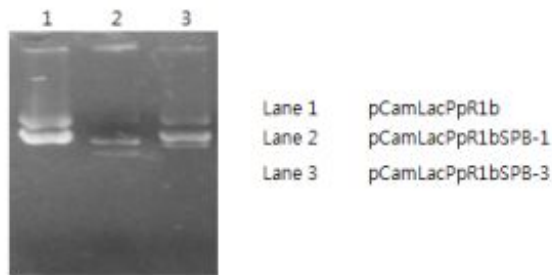


Fig. 200. DNA sequence analysis of pCamLacPpR1bSPB vector

구성된 pCamLacPpR1bSPB 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 200에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 pR1b 신호서열 및 SPB 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Gel electrophoresis of pCamLacPpR1bSPB from *A. tumefaciens*



B. PCR

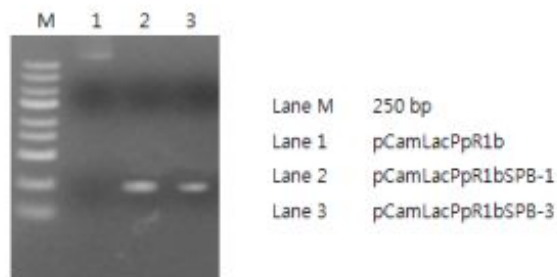


Fig. 201. Introduction of the pCamLacPpR1bSPB into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPpR1bSPB 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPpR1bSPB 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPpR1bSPB 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, SPB Forward PCR primer (5' GTT AAC ATG AAC GGT CCC ATT CCT CTC 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 201에서 보는 바와 같이 약 0.24 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

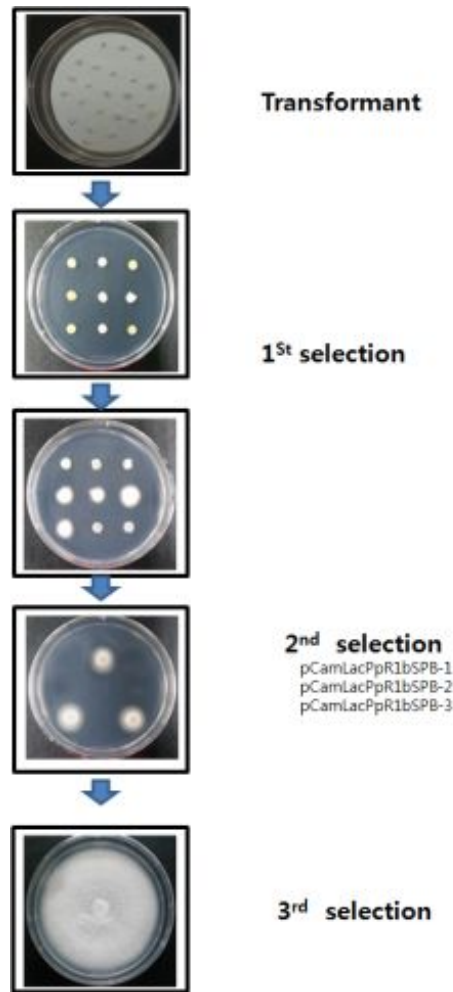


Fig. 202. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPpR1bSPB vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPpR1bSPB vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPpR1bSPB vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 202에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 SPB-specific primer (SPB-F 5' GTT AAC ATG AAC GGT CCC ATT CCT CTC 3', SPB-R 5' GTT AAC TCA CAT GGA GCA CCG GAG GAC 3')를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.24 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 197), laccase promoter 및 pR1b 신호서열에 의한 표면활성제 단백질 B(Surfactant protein-B, SP-B)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

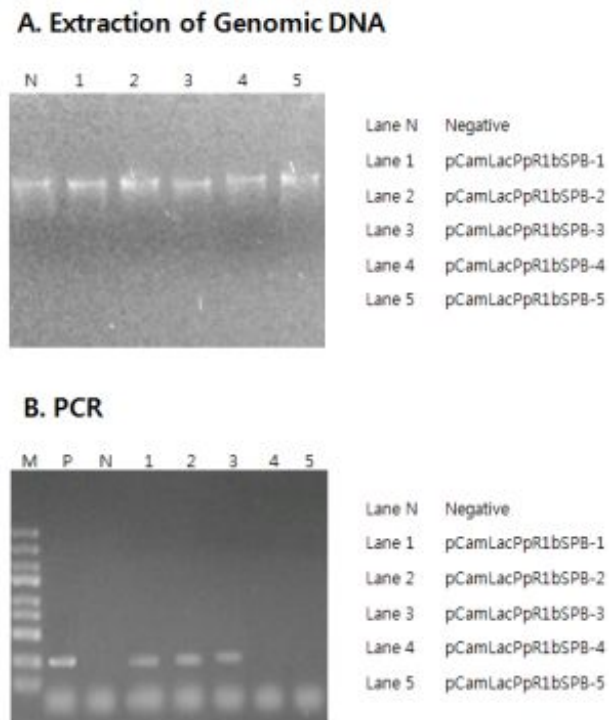


Fig. 203. PCR analysis of SPB gene in mycelial transformant (pCamLacPpR1bSPB). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 SPB 유전자 발현

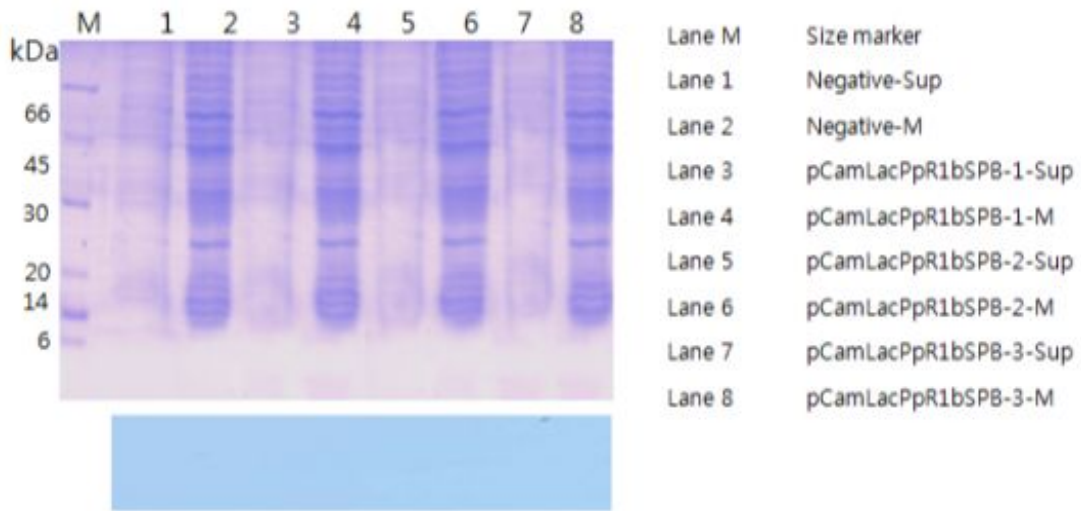


Fig. 204. Expression of the SPB from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bSPB vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

pCamLacPpR1bSPB vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 204에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 SPB가 발현되지 않았다.

(마) Epidermal growth factor

① 클로닝 전략

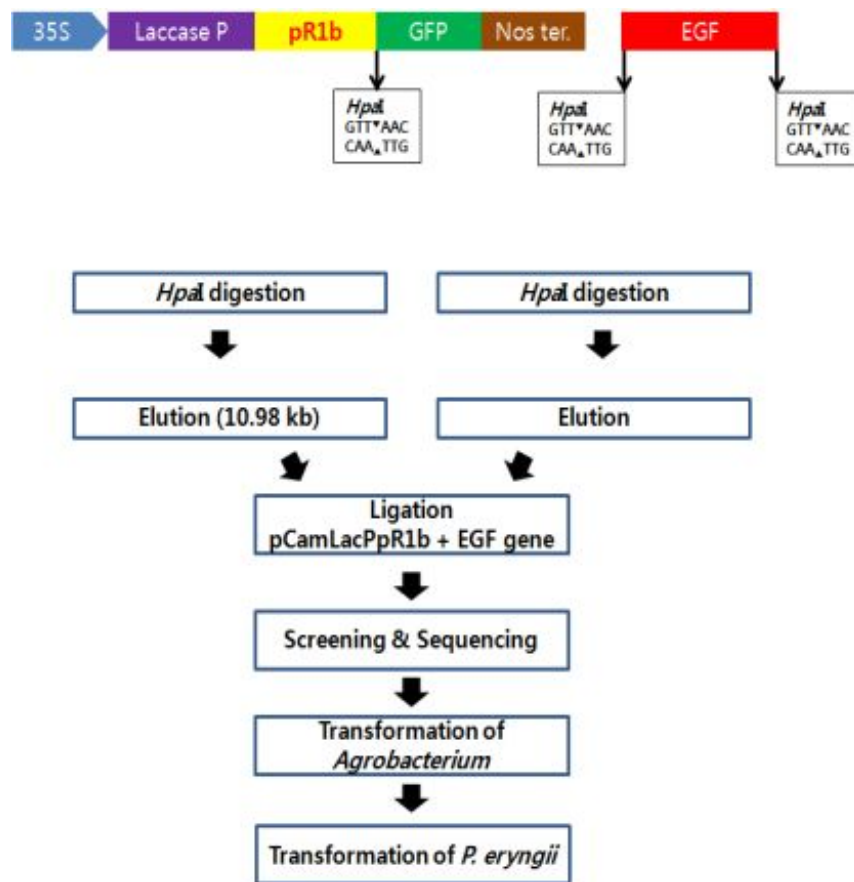


Fig. 205. Cloning strategy of EGF gene into pCamLacPpR1b containing laccase promoter and pR1b signal sequence.

Fig. 205에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 pR1b신호서열이 도입된 pCamLacPpR1b (10.98kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPpR1b vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.98 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 EGF는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPpR1bEGF 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 EGF reverse PCR primer: 5' GTT AAC TTA GCG CAG TTC CCA CCA C 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 206에서 보는 바와 같이 약 0.54 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

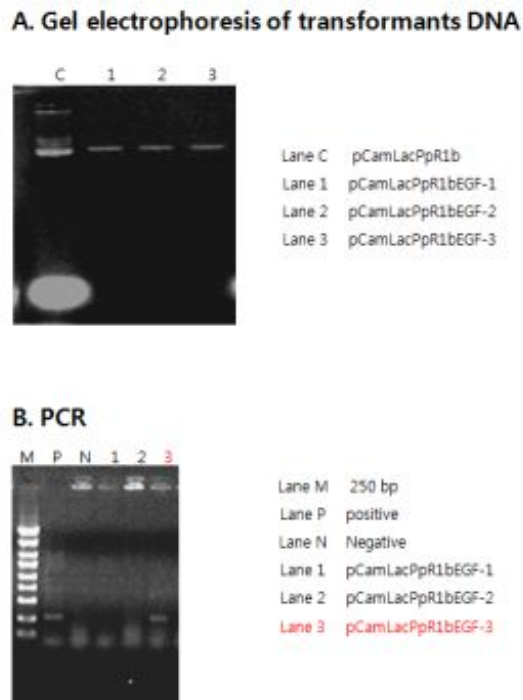


Fig. 206. Cloning of the EGF gene into pCamLacPpR1b vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

```

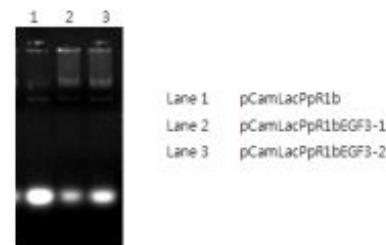
1   CTTCAATTCTC ATGCATATCG ACTTGTAGAT GTATTTAAGA CCTGTACTGA TGATTGCAAA
61  CAGCATCGAC CTCCAATTAT TTAACACCTC CTATGGGATT TTTTCTCTTT TCACAAATGC
    Laccase promoter
121 CCTCATTITT TCTTGTCTCT ACACCTTCTCT TATTGCTAAT AATATCTCAC TCTTCTCATG
    HpaI pR1b signal peptide
181 CCCAAAACGT TAACAATAGT GACTCTGAAT GTCCCCTGTC CCACGATGGG TACTGCCTCC
241 ATGATGGTGT GTGCATGTAT ATTGAAGCAT TGGACAAGTA TGATGCAAC TGTGTTGTTG
301 GCTACATCGG GGAGCGATGT CAGTACCGAG ACCTGAAAGT GTGGGAAGT CGCTAAATTA
    HpaI
361 AG-EGF
    
```

Fig. 207. DNA sequence analysis of pCamLacPpR1bEGF vector

구성된 pCamLacPpR1bEGF 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 207에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 신호서열 및 EGF 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

A. Gel electrophoresis of pCamLacPpR1bEGF from *A. tumefaciens*



B. PCR



Fig. 208. Introduction of the pCamLacPpR1bEGF into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPpR1bEGF 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPpR1bEGF 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPpR1bEGF 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, EGF Forward PCR primer (5' GTT AAC AAT AGT GAC TCT GAA 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TTA GCG CAG TTC CCA CCA C 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 208에서 보는 바와 같이 약 0.17 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

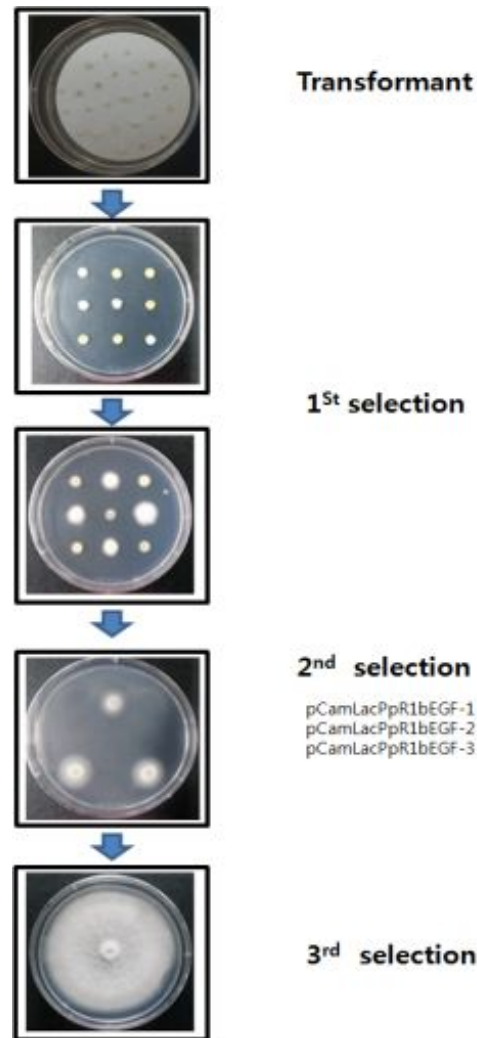
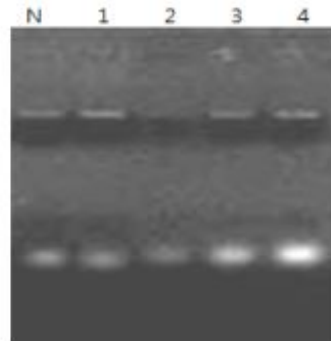


Fig. 209. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPpR1bEGF vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPpR1bEGF vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPpR1bEGF vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 209에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 EGF-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.17 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 210), laccase promoter에 의한 세포재생인자 (Epidermal growth factor)의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

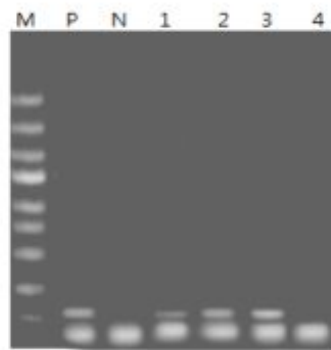
⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

A. Extraction of Genomic DNA



Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPpR1bEGF-1
Lane 2 pCamLacPpR1bEGF-2
Lane 3 pCamLacPpR1bEGF-3
Lane 4 pCamLacPpR1bEGF-4

B. PCR



Lane M 250 bp
Lane P Positive
Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPpR1bEGF-1
Lane 2 pCamLacPpR1bEGF-2
Lane 3 pCamLacPpR1bEGF-3
Lane 4 pCamLacPpR1bEGF-4

Fig. 210. PCR analysis of EGF gene in mycelial transformant (pCamLacPpR1bEGF). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 EGF 유전자 발현

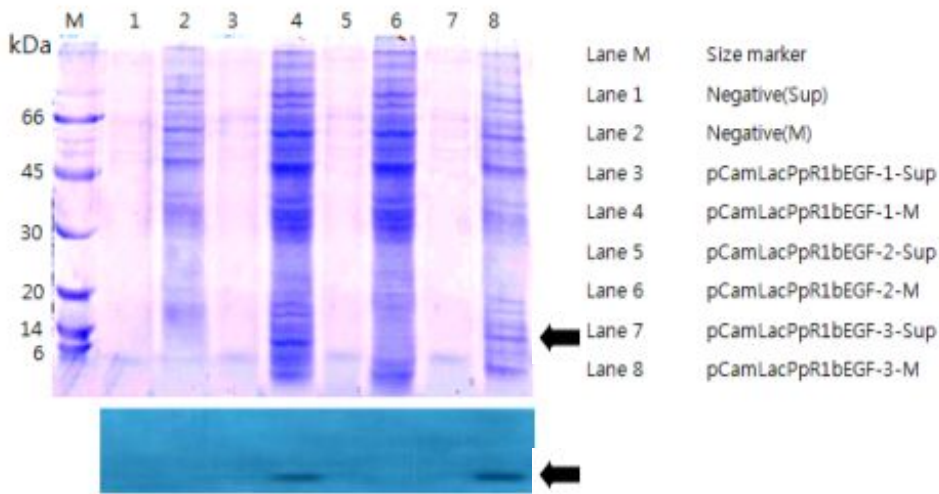
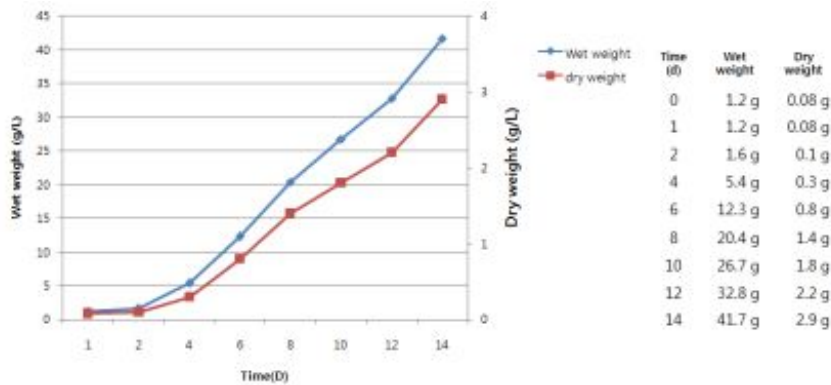


Fig. 211. Expression of the EGF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bEGF vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

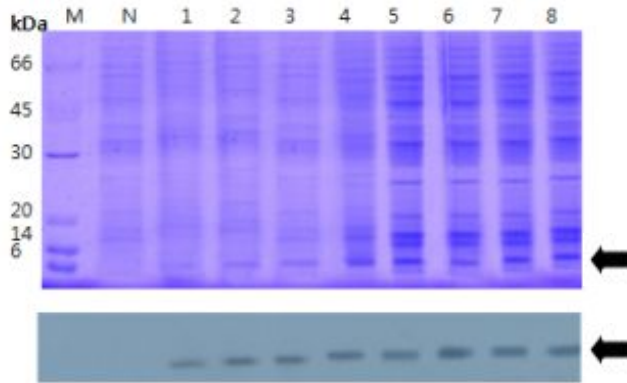
pCamLacPpR1bEGF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25°C 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다, 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig.211에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석, 대조군 새송이버섯 균사체는 EGF 단백질을 생산하지 않았지만, pCamLacPpR1bEGF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체에서 EGF 단백질은 발현 되었다. 새송이버섯 균사체로 도입되어 발현된 EGF 단백질은 유전자 앞에 붙어 있는 pR1b signal sequence가 균사체내에서 적절한 peptidase에 의해 정확하게 processing 되지 않은 것으로 판단된다.

⑧ 새송이버섯 균사체 증식비교

A



B



	Total protein (ug/mg)	Secreted EGF (%)	EGF 농도 (ug/mg)
M: size maker			
N: Negative Control			
1: pCamLacpR1bEGF-1 day	0.5	2%	0.01
2: pCamLacpR1bEGF-2 day	0.7	2%	0.01
3: pCamLacpR1bEGF-4 day	0.9	3%	0.02
4: pCamLacpR1bEGF-6 day	2.1	4%	0.08
5: pCamLacpR1bEGF-8 day	3.5	4%	0.14
6: pCamLacpR1bEGF-10 day	5.5	5%	0.27
7: pCamLacpR1bEGF-12 day	7.5	5%	0.37
8: pCamLacpR1bEGF-14 day	7.4	5%	0.37

Fig. 212. Time profile of mycelia production in 10 L airlift type fermenter. (A) (A) Dry weight and wet weight. (B) Expression of the EGF from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bEGF vector in 10 L fermenter. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

pCamLacPpR1bEGF vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 14일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4℃, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하여 단백질을 분석하였다. 그 결과 특이성을 가지는 EGF단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. 발현된 단백질 농도는 이미지 분석기로 측정하여 총 단백질에 대한 % 비율로 나타내었다. 그 결과 Fig. 212에서 보는 것처럼 pCamLacPpR1bEGF vector가 도입된 형질전환체는 배양기간에 따라 총 단백질 중 5%(14일째)의 EGF 단백질을 생산하는 것으로 분석되었다.

(바) Erythropoietin

① 클로닝 전략

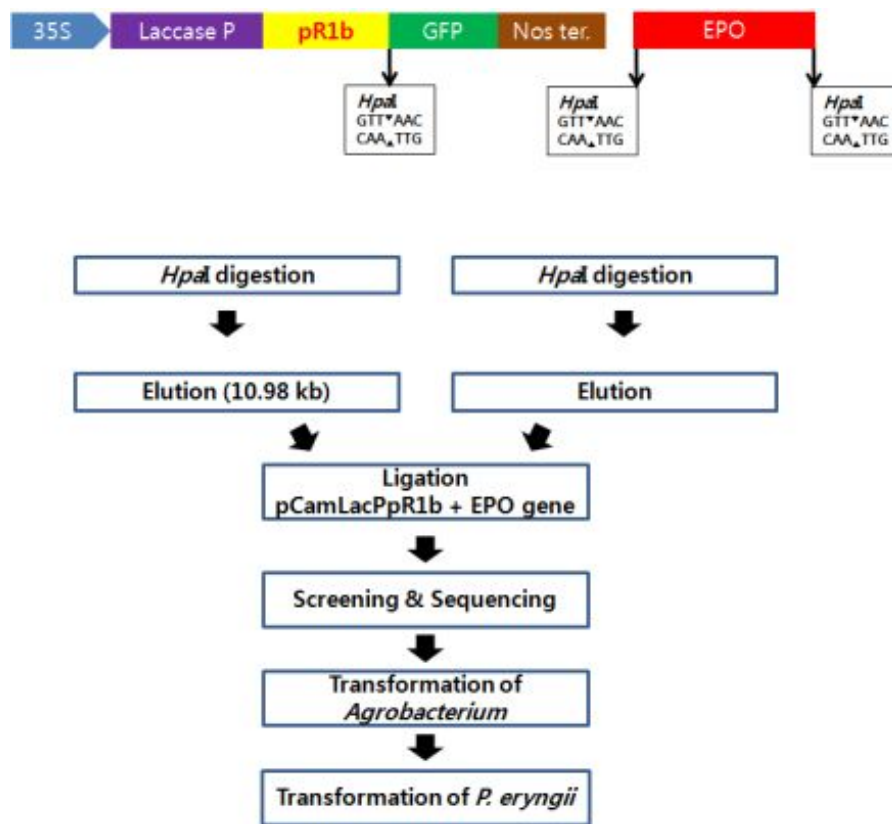


Fig. 213. Cloning strategy of EPO gene into pCamLacPpR1b containing laccase promoter and laccase signal sequence.

Fig. 213에서 보는 바와 같이 laccase promoter와 신호서열이 도입된 pCamLacPpR1b (10.98kb) vector에 유용유전자를 도입하기 위하여 pCamLacPpR1b vector는 *HpaI* 제한효소로 절단하여 10.95 kb DNA 단편을 agarose gel에서 elution 하고 T-vector에 subcloning 되어 있는 EPO는 *HpaI* 으로 절단하여 각각의 DNA 단편을 확보한 다음, T4 DNA ligase 효소를 사용하여 결합시켰다. 이를 *E. coli* XL1-blue MRF' 균주에 형질전환 하여 유용유전자가 도입된 pCamLacPpR1bEPO 발현백터를 screening 하였다. Laccase promoter forward PCR primer: 5' GAA TTC AAG AAG CAC TTC GAG TCT ATT TC 3'와 EPO reverse PCR primer: 5' GTT AAC TCA TCT GTC CCC TGT CCT GC 3'를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 214에서 보는 바와 같이 약 0.93 kb DNA 조각을 확인하였고, 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

② 형질전환체 선별 및 PCR에 의한 확인

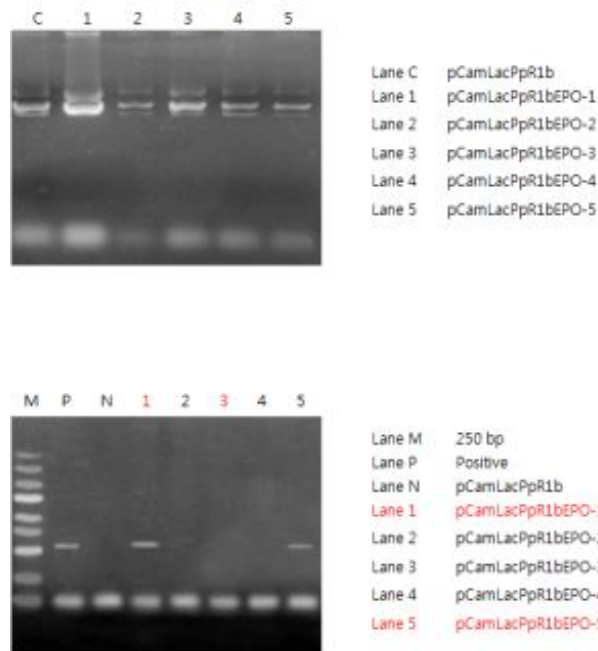


Fig. 214. Cloning of the EPO gene into pCamLacPpR1b vector (A) and Its PCR amplification (B).

③ 염기서열 분석

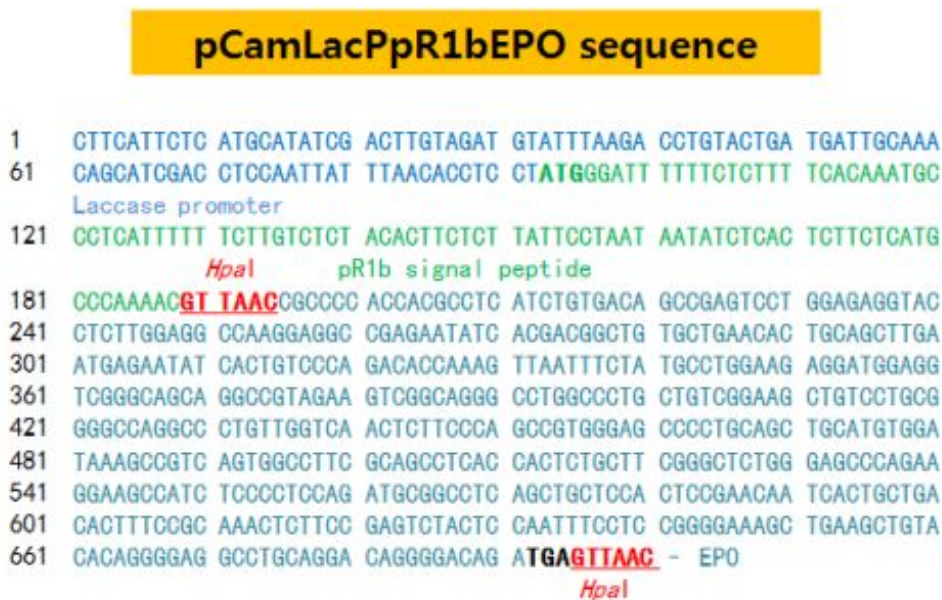


Fig. 215. DNA sequence analysis of pCamLacPpR1bEPO vector.

구성된 pCamLacPpR1bEPO 분비벡터의 정확한 염기서열을 분석하기 위하여 Sanger-dideoxy 방법에 의해 GFP 유전자의 reverse PCR primer (5' TCA CAC GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCT A3')로 반응시켜 염기서열을 reading 한 결과 Fig. 215에서 보는 바와 같이 정확하게 laccase promoter와 pR1b 신호서열 및 EPO 유전자가 in frame 하에 도입된 것을 확인하였다. 따라서 확인된 클론은 대장균에서 증폭하여 다량의 plasmid DNA를 확보하였고, 다음 실험인 *Agrobacterium*으로 도입을 위하여 사용하였다.

④ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 재조합 벡터 도입 및 확인

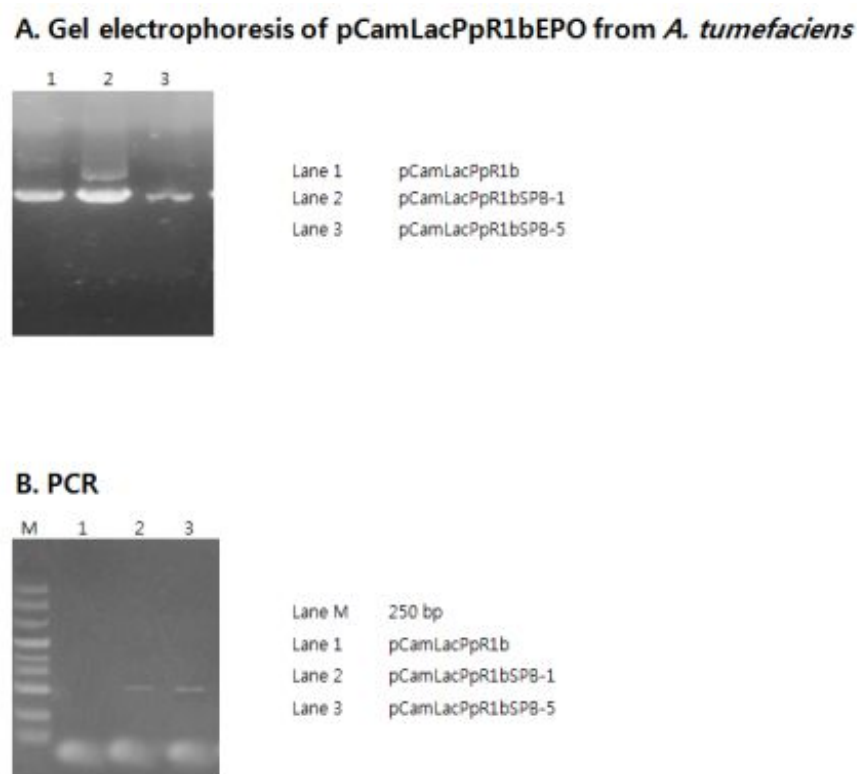


Fig. 216. Introduction of the pCamLacPpR1bEPO into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (A) and Its PCR amplification (B).

새송이버섯에 구성된 pCamLacPpR1bEPO 발현벡터를 도입하여 transgenic *Pleurotus eryngii*를 구축하기 위하여 전 단계 과정인 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 pCamLacPpR1bEPO 발현벡터를 도입하였다. Freeze-thawing 방법에 의해 pCamLacPpR1bEPO 발현벡터를 *Agrobacterium*에 도입하고, kanamycin (50 ug/ml) 함유 배지에서 형질전환체를 확보한 다음, EPO Forward PCR primer (5' GTT AAC ATG GCC CCA CCA CGC CTC AT 3')와 Reverse PCR primer (5' GTT AAC TCA TCT GTC CCC TGT CCT GC 3')를 이용하여 PCR를 한 결과 Fig. 216에서 보는 바와 같이 약 0.5 kb DNA 조각을 확인하였고, 새송이버섯 형질전환을 위하여 사용하였다.

⑤ 새송이버섯의 형질전환 및 형질전환체 선별

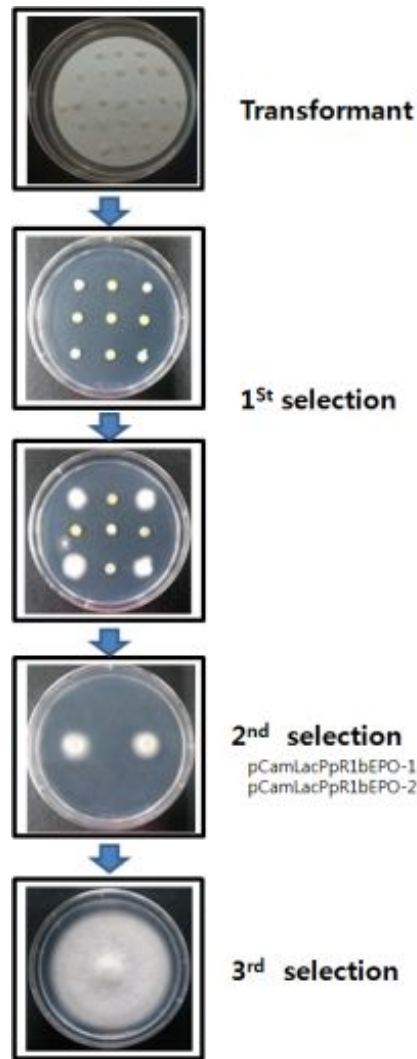


Fig. 217. Transformation of *Pleurotus eryngii* by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCamLacPpR1bEPO vector and Selection of transformants by antibiotic

pCamLacPpR1bEPO vector를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 새송이버섯의 형질전환은 Michielse 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 새송이버섯 분생자 현탁액(conidial suspension, 10^6 conidia/ml)과 pCamLacPpR1bEPO vector를 함유하는 *Agrobacterium*과 혼합하여 앞에서 기술한 바와 같은 방법으로 형질전환을 수행하여 Fig. 217에 보는 바와 같은 새송이버섯 형질전환체를 확보하였으며, 그 형질전환체를 30 ug/ml hygromycin을 포함하는 PDB 배지(0.4% Potato Starch, 2% Dextrose)에 옮겨서 내성을 갖는 형질전환체를 선별하였다. 그 후 형질전환체로부터 CTAB 추출 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여 EPO-specific primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 약 0.5 kb 유전자를 확인하였고 (Fig. 218), laccase promoter와 pR1b signal sequence에 의한 Erythropoietin (EPO) 단백질의 발현 여부를 조사하기 위하여 사용하였다.

⑥ 형질전환 균사체 확인 : PCR

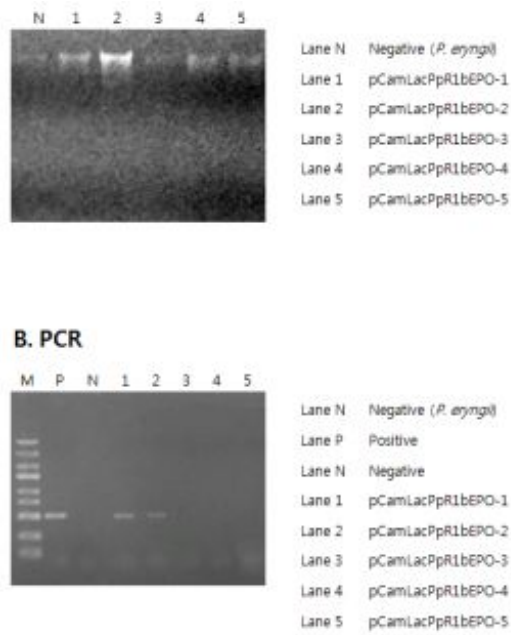


Fig. 218. PCR analysis of EPO gene in mycelial transformant (pCamLacPpR1bEPO). (A) Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelium and (B) Selection of transformants by PCR

⑦ 새송이버섯 균사체에서 EPO 유전자 발현

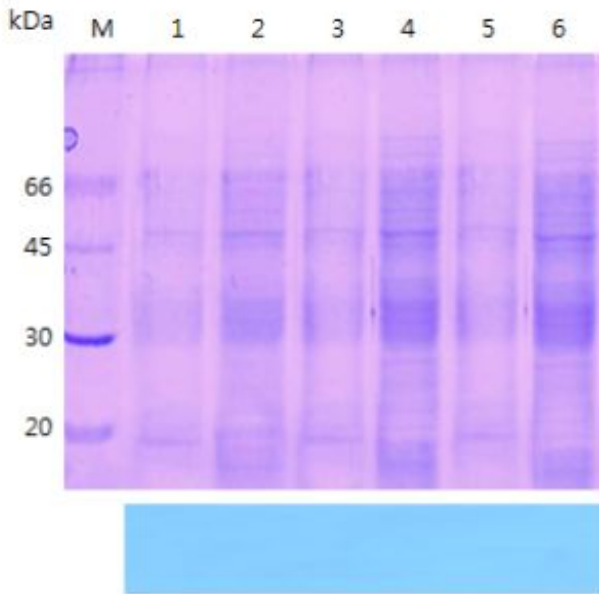


Fig. 219. Expression of the EPO from *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bEPO vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

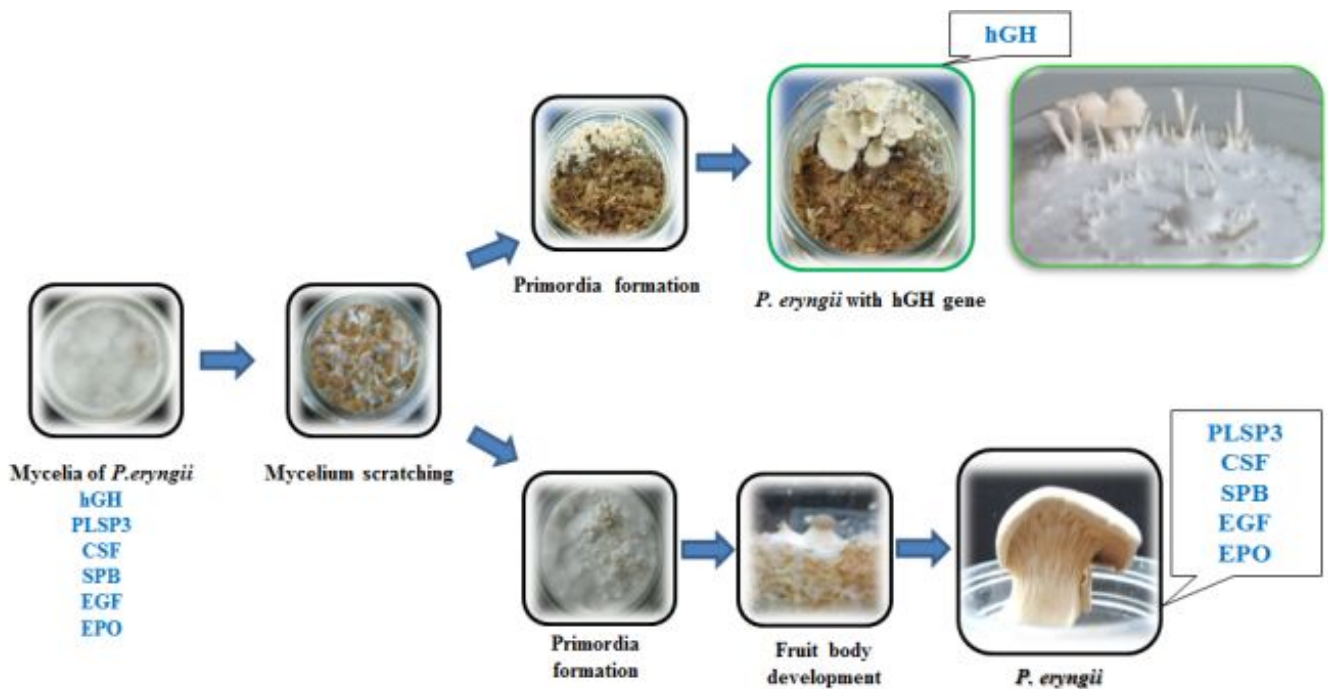
pCamLacPpR1bEPO vector가 도입된 새송이버섯 형질전환 균사체는 PDB 배지에 접종하여 25℃ 인큐베이터에서 7일 동안 배양하여 균사체 시료 및 발효액을 수집하였다. 균사체 1 g당 sonication buffer (10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) 3 ml 첨가하여 재현탁 하고 sonication에 의해 균질화하여 15,000 rpm에서 4℃, 5분간 원심분리 하여 상등액만 얻어 이를 단백질 분석 시료로 사용하였다. Fig. 219에서 보는 바와 같이 상등액을 에탄올로 농축하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 SPB가 발현되지 않았다.

(8) 형질전환 자실체 분석

(가) PCR analysis

형질전환된 새송이버섯 자실체를 500 ul Extraction buffer(100 mM Tris-HCl, pH 9.0 + 40 mM EDTA) + 300 ul benzyl chloride + 150 ul SDS를 첨가하여 50℃에서 30분 동안 반응 후, e-tube에 300 ul 3M Sodium acetate(pH 5.2) 첨가 후 mixing하여 4℃(or ice)에서 15분간 방치한 다음, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액 회수 하였다. 회수된 상층액과 동일한 phenol:chloroform을 첨가한 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 회수된 상층액은 Et-OH down으로 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 specific primer를 이용하여 PCR 방법으로 target gene (hGH, PLSP3, CSF, SPB, EGF, EPO)의 integration 여부를 하였다.

아래 Fig. 220-237을 통해 연구결과를 나타내었다.



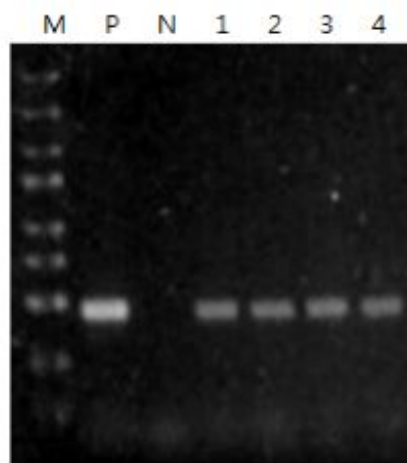
① Human growth hormone

A. Extraction of Genomic DNA



Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPhGH-1
Lane 3 pCamLacPhGH-2
Lane 4 pCamLacPhGH-3
Lane 5 pCamLacPhGH-5

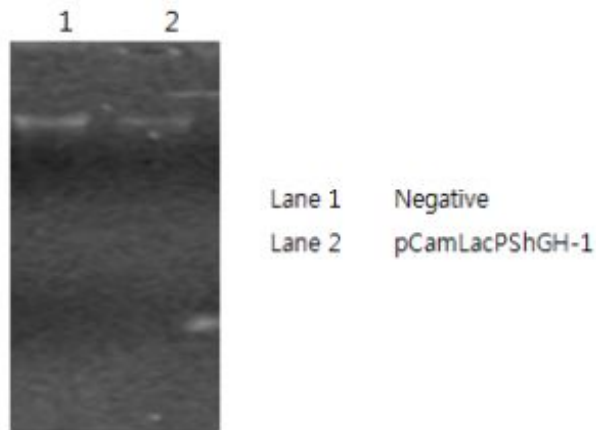
B. PCR



Lane M 250 bp
Lane P Positive
Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPhGH-1
Lane 2 pCamLacPhGH-2
Lane 3 pCamLacPhGH-3
Lane 4 pCamLacPhGH-5

Fig. 220. PCR screening of the hGH gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPhGH vector. Genomic DNA of transformants (A) and the hGH gene were confirmed by PCR amplification using hGH-specific primer set (B)

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

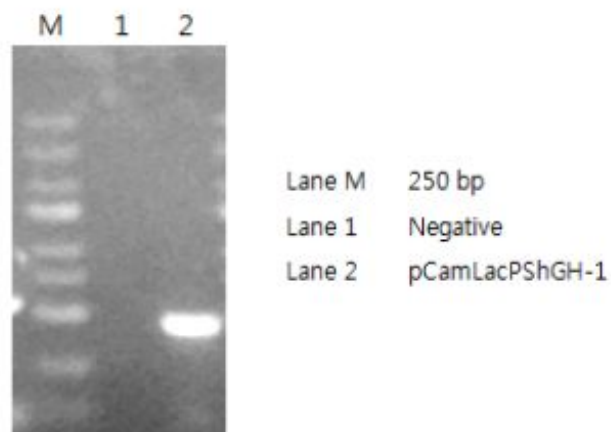


Fig. 221. PCR screening of the hGH gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPShGH vector. Genomic DNA of transformants (A) and the hGH gene were confirmed by PCR amplification using hGH-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

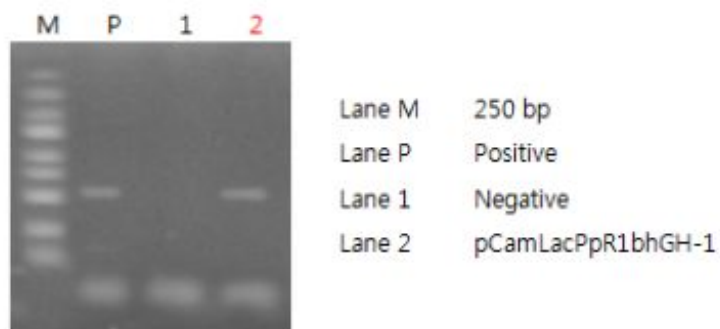
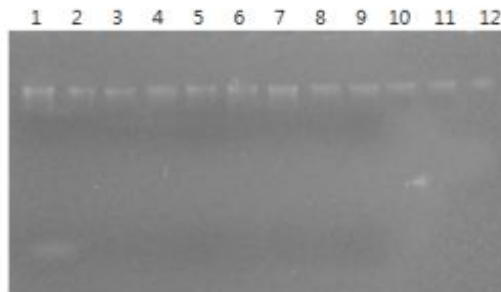


Fig. 222. PCR screening of the hGH gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bhGH vector. Genomic DNA of transformants (A) and the hGH gene were confirmed by PCR amplification using hGH-specific primer set (B).

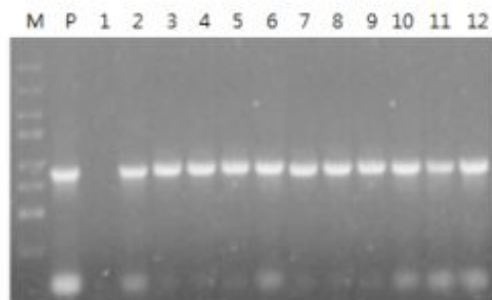
② PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)

A. Extraction of Genomic DNA



Lane 1	Negative
Lane 2	pCamLacPPLSP3-1
Lane 3	pCamLacPPLSP3-5
Lane 4	pCamLacPPLSP3-6
Lane 5	pCamLacPPLSP3-8
Lane 6	pCamLacPPLSP3-19
Lane 7	pCamLacPPLSP3-22
Lane 8	pCamLacPPLSP3-23
Lane 9	pCamLacPPLSP3-28
Lane 10	pCamLacPPLSP3-30
Lane 11	pCamLacPPLSP3-34
Lane 12	pCamLacPPLSP3-37

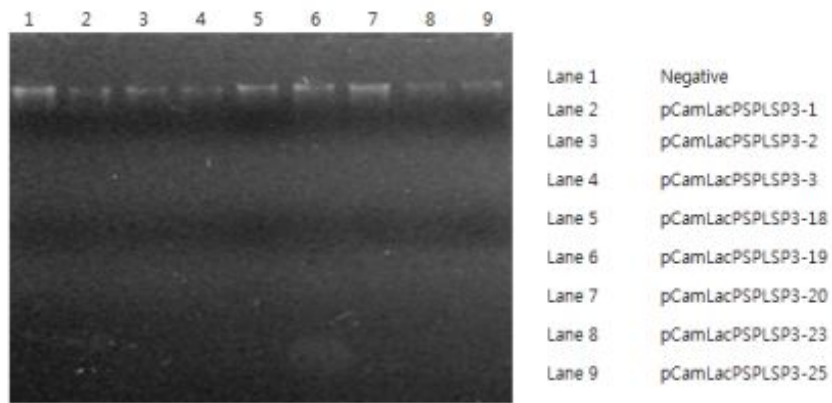
B. PCR



Lane M	250 bp
Lane P	Positive
Lane 1	Negative
Lane 2	pCamLacPPLSP3-1
Lane 3	pCamLacPPLSP3-5
Lane 4	pCamLacPPLSP3-6
Lane 5	pCamLacPPLSP3-8
Lane 6	pCamLacPPLSP3-19
Lane 7	pCamLacPPLSP3-22
Lane 8	pCamLacPPLSP3-23
Lane 9	pCamLacPPLSP3-28
Lane 10	pCamLacPPLSP3-30
Lane 11	pCamLacPPLSP3-34
Lane 12	pCamLacPPLSP3-37

Fig. 223. PCR screening of the PLSP3 gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPPLSP3 vector. Genomic DNA of transformants (A) and the PLSP3 gene were confirmed by PCR amplification using PLSP3-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

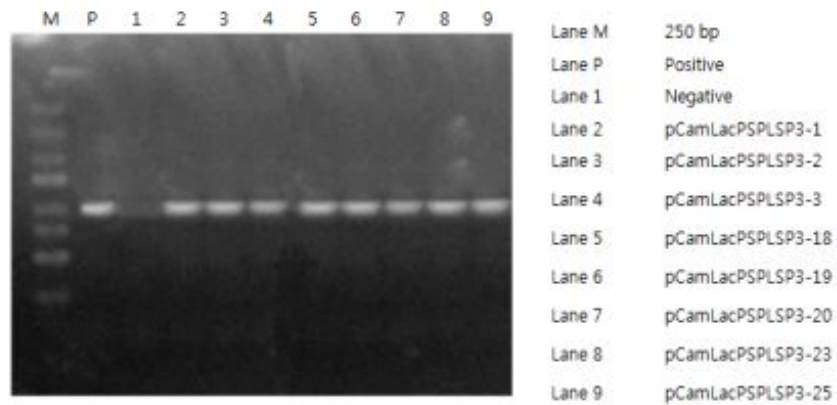
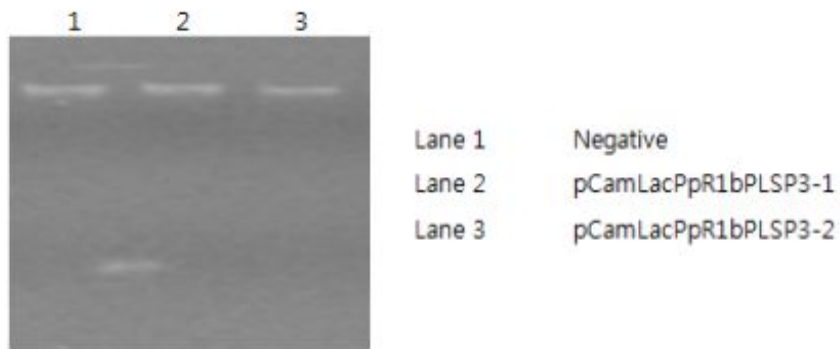


Fig. 224. PCR screening of the PLSP3 gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSPLSP3 vector. Genomic DNA of transformants (A) and the PLSP3 gene were confirmed by PCR amplification using PLSP3-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

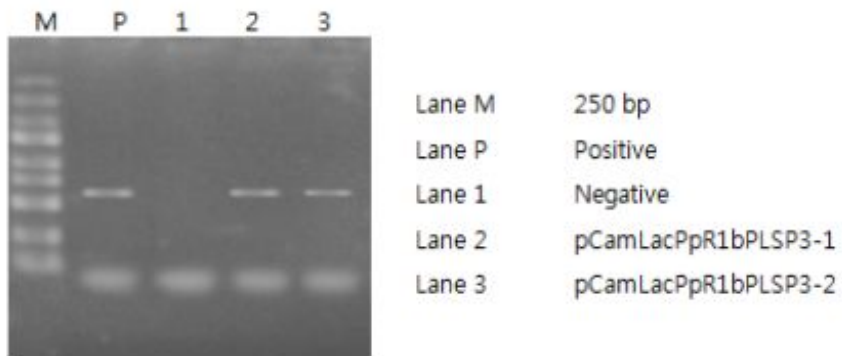
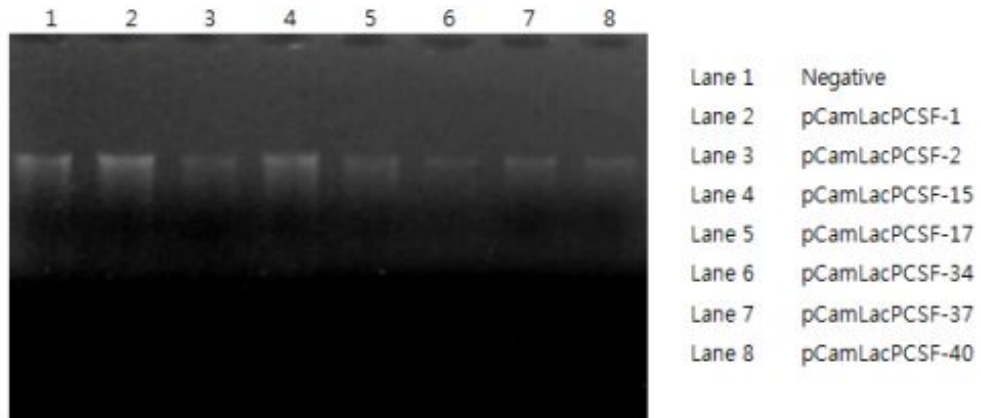


Fig. 225. PCR screening of the PLSP3 gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bPLSP3 vector. Genomic DNA of transformants (A) and the PLSP3 gene were confirmed by PCR amplification using PLSP3-specific primer set (B).

③ Colony stimulating factor

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

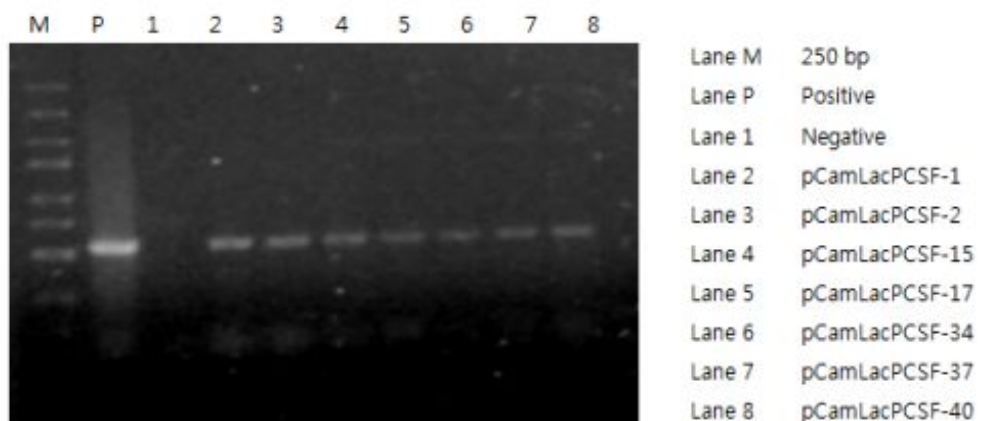
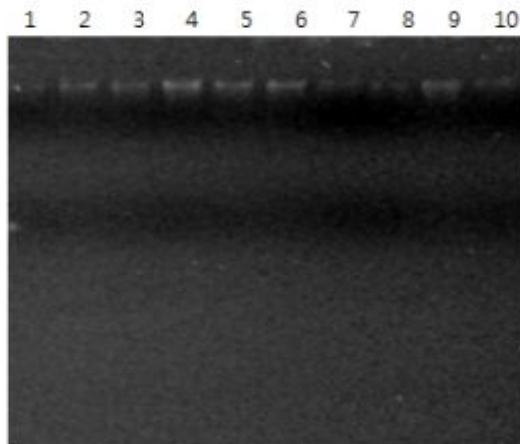


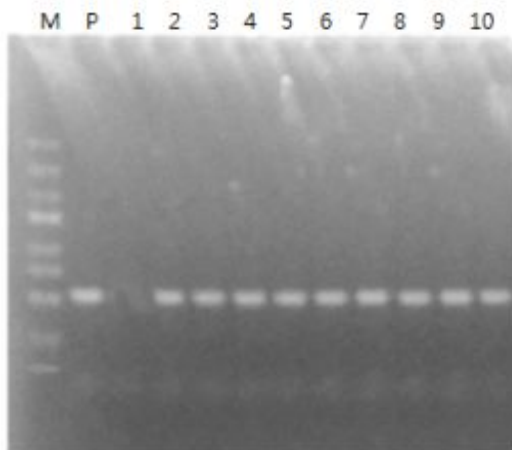
Fig. 226. PCR screening of the CSF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPCSF vector. Genomic DNA of transformants (A) and the CSF gene were confirmed by PCR amplification using CSF-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic



Lane 1	Negative
Lane 2	pCamLacPSCSF-1
Lane 3	pCamLacPSCSF-2
Lane 4	pCamLacPSCSF-3
Lane 5	pCamLacPSCSF-16
Lane 6	pCamLacPSCSF-17
Lane 7	pCamLacPSCSF-18
Lane 8	pCamLacPSCSF-19
Lane 9	pCamLacPSCSF-22
Lane 10	pCamLacPSCSF-25

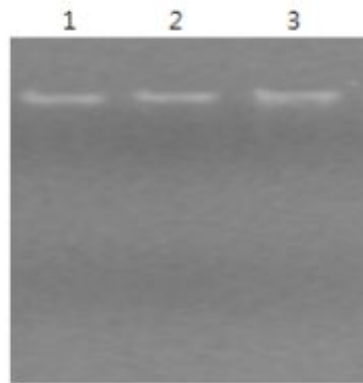
B. PCR



Lane M	250 bp
Lane P	Positive
Lane 1	Negative
Lane 2	pCamLacPSCSF-1
Lane 3	pCamLacPSCSF-2
Lane 4	pCamLacPSCSF-3
Lane 5	pCamLacPSCSF-16
Lane 6	pCamLacPSCSF-17
Lane 7	pCamLacPSCSF-18
Lane 8	pCamLacPSCSF-19
Lane 9	pCamLacPSCSF-22
Lane 10	pCamLacPSCSF-25

Fig. 227. PCR screening of the CSF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSCSF vector. Genomic DNA of transformants (A) and the CSF gene were confirmed by PCR amplification using CSF-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

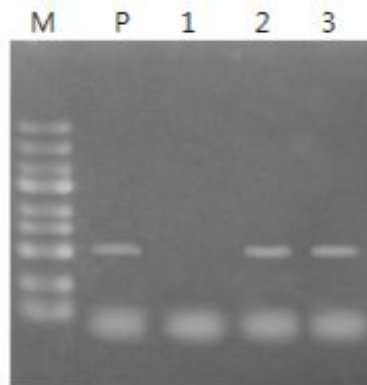


Fig. 228. PCR screening of the CSF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bCSF vector. Genomic DNA of transformants (A) and the CSF gene were confirmed by PCR amplification using CSF-specific primer set (B).

④ Surfactant protein B

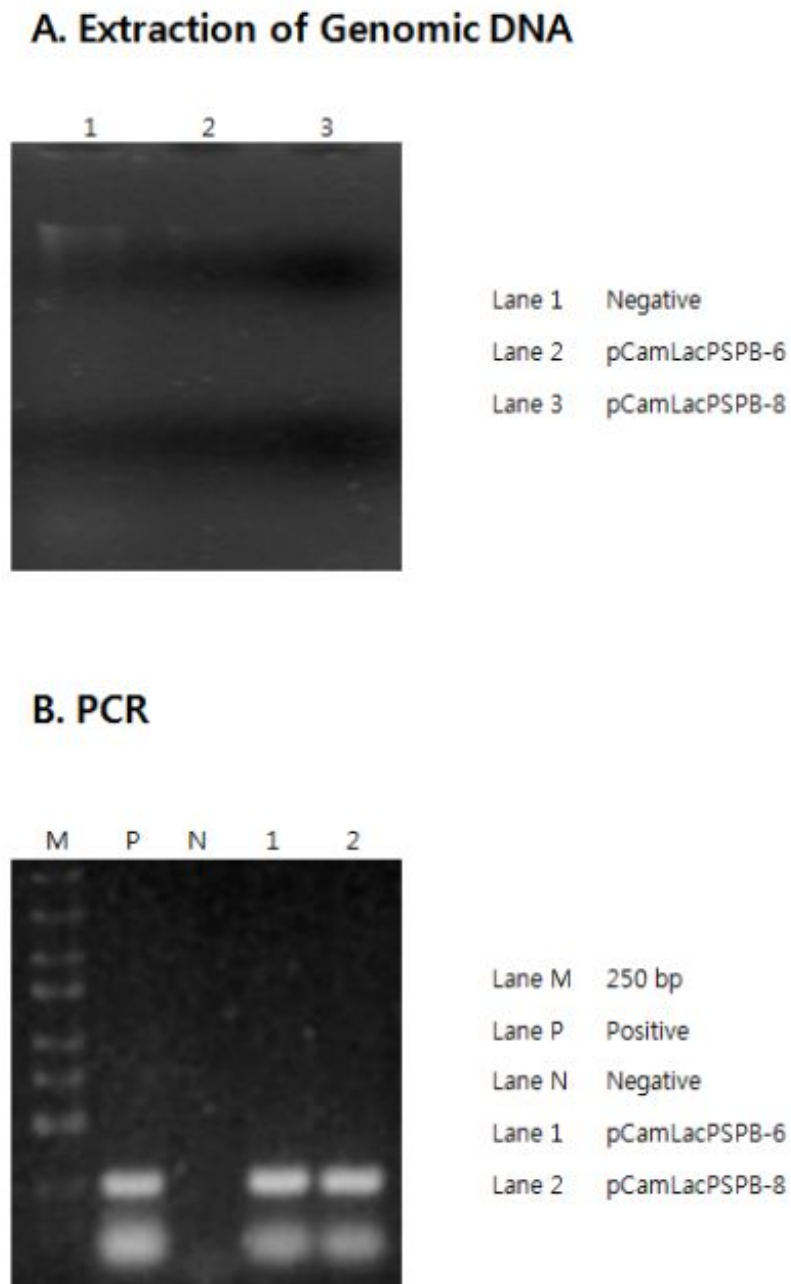
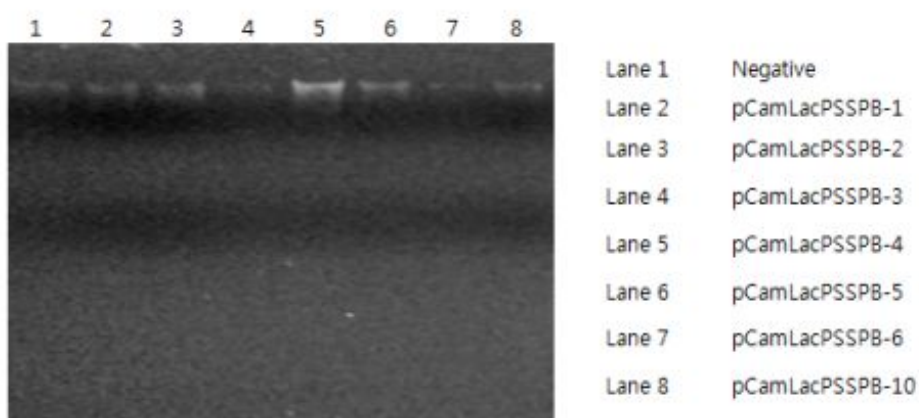


Fig. 229. PCR screening of the SPB gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSPB vector. Genomic DNA of transformants (A) and the SPB gene were confirmed by PCR amplification using SPB-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

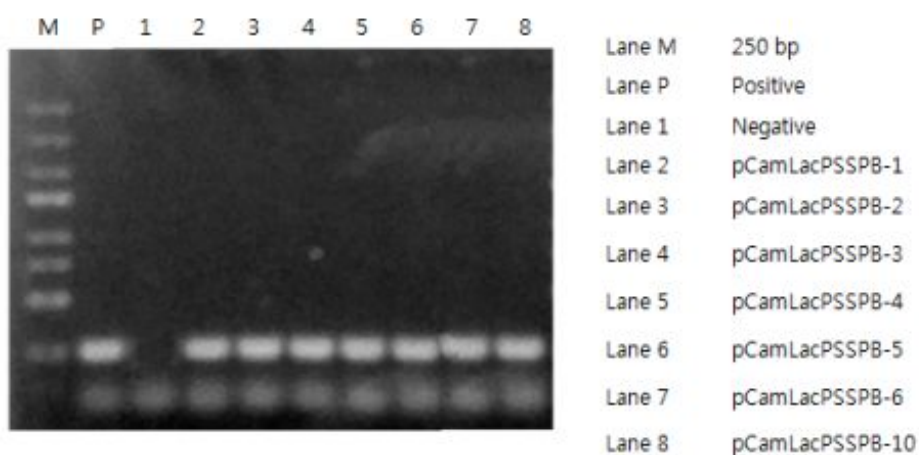
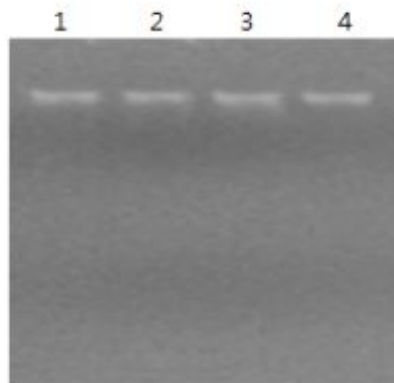


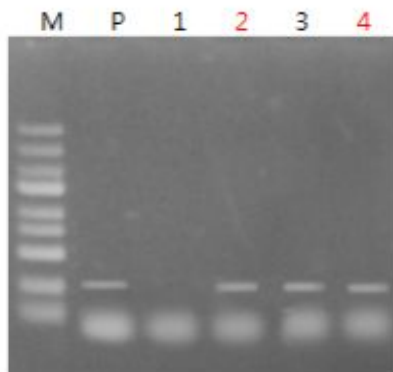
Fig. 230. PCR screening of the SPB gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSSPB vector. Genomic DNA of transformants (A) and the SPB gene were confirmed by PCR amplification using SPB-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPpR1bSPB-1
Lane 3 pCamLacPpR1bSPB-2
Lane 4 pCamLacPpR1bSPB-3

B. PCR

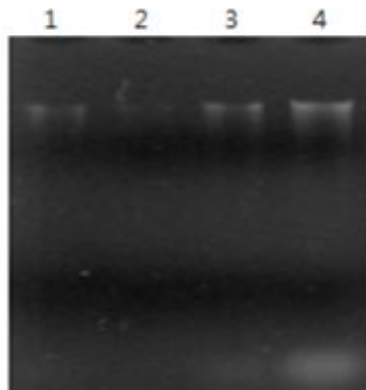


Lane M 250 bp
Lane P Positive
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPpR1bSPB-1
Lane 3 pCamLacPpR1bSPB-2
Lane 4 pCamLacPpR1bSPB-3

Fig. 231. PCR screening of the SPB gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bSPB vector. Genomic DNA of transformants (A) and the SPB gene were confirmed by PCR amplification using SPB-specific primer set (B).

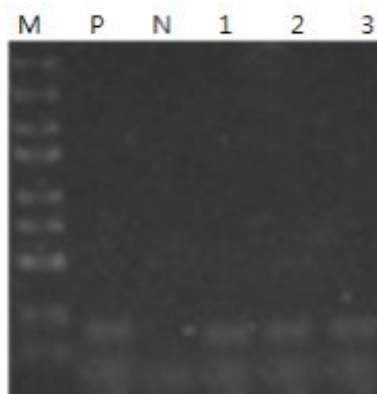
⑤ Epidermal growth factor

A. Extraction of Genomic DNA



Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPEGF-1
Lane 3 pCamLacPEGF-2
Lane 4 pCamLacPEGF-3

B. PCR

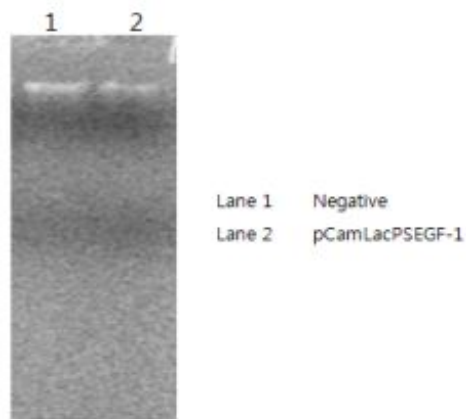


Lane M 250 bp
Lane P Positive
Lane N Negative
Lane 1 pCamLacPEGF-1
Lane 2 pCamLacPEGF-2
Lane 3 pCamLacPEGF-3

C

Fig. 232. PCR screening of the EGF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPEGF vector. Genomic DNA of transformants (A) and the EGF gene were confirmed by PCR amplification using EGF-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

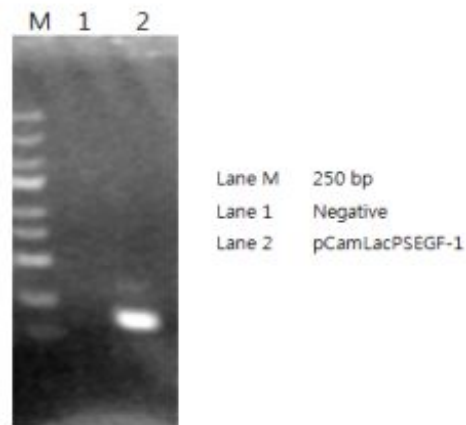
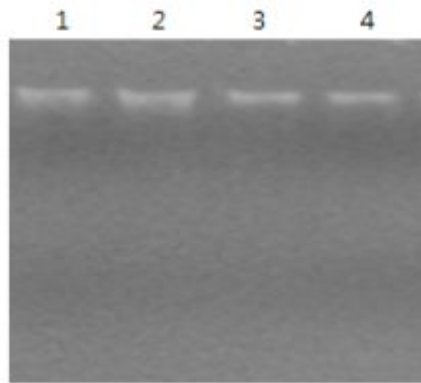


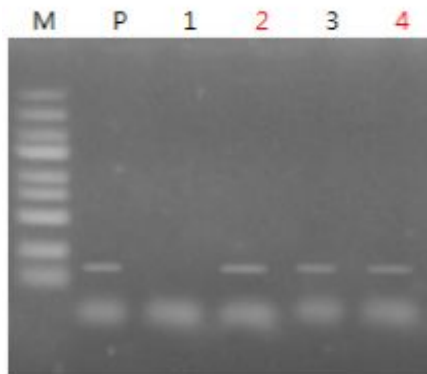
Fig. 233. PCR screening of the EGF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSEGF vector. Genomic DNA of transformants (A) and the EGF gene were confirmed by PCR amplification using EGF-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPpR1bEGF-1
Lane 3 pCamLacPpR1bEGF-2
Lane 4 pCamLacPpR1bEGF-3

B. PCR



Lane M 250 bp
Lane P Positive
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPpR1bEGF-1
Lane 3 pCamLacPpR1bEGF-2
Lane 4 pCamLacPpR1bEGF-3

Fig. 234. PCR screening of the EGF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bEGF vector. Genomic DNA of transformants (A) and the EGF gene were confirmed by PCR amplification using EGF-specific primer set (B).

⑥ Erythropoietin

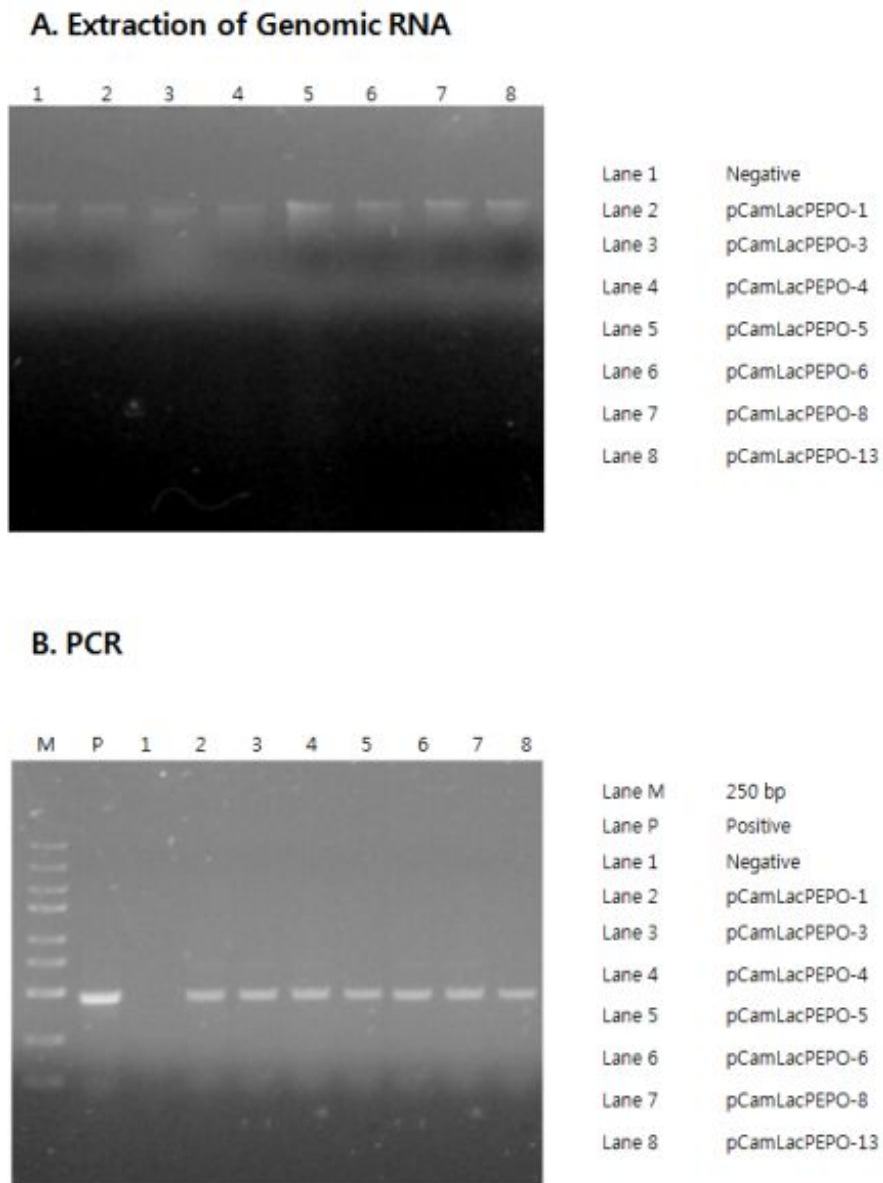
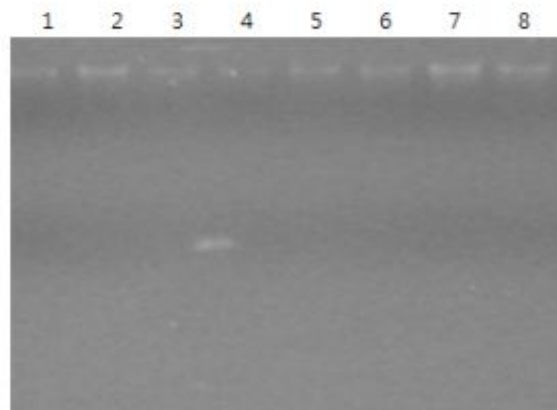


Fig. 235. PCR screening of the EPO gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPEPO vector. Genomic DNA of transformants (A) and the EPO gene were confirmed by PCR amplification using EPO-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

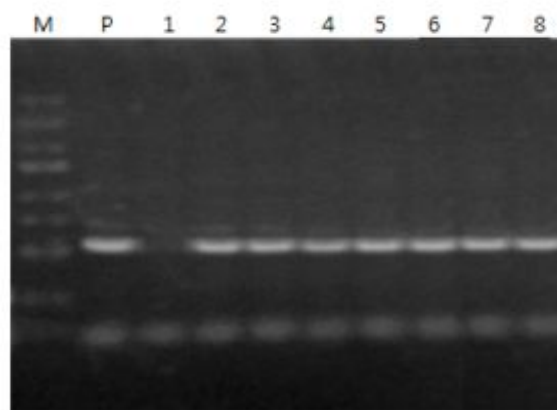
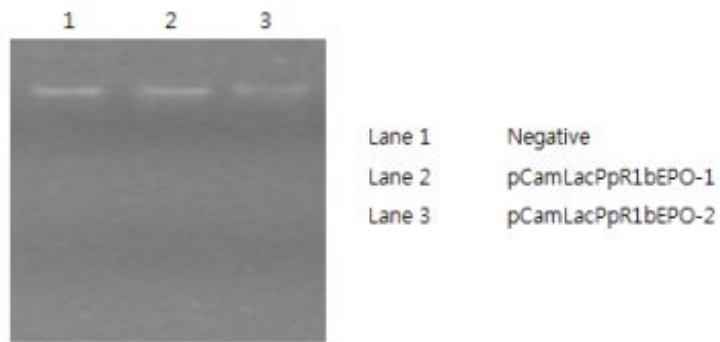


Fig. 236. PCR screening of the EPO gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSEPO vector. Genomic DNA of transformants (A) and the EPO gene were confirmed by PCR amplification using EPO-specific primer set (B).

A. Extraction of Genomic DNA



B. PCR

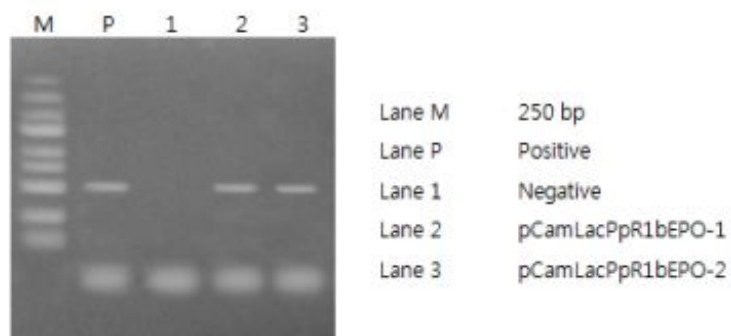


Fig. 237. PCR screening of the EPO gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bEPO vector. Genomic DNA of transformants (A) and the EPO gene were confirmed by PCR amplification using EPO-specific primer set (B).

(나) RT-PCR analysis

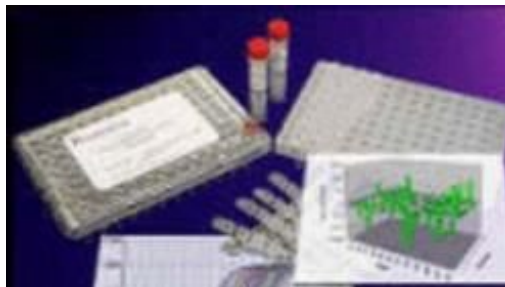
형질전환된 새송이버섯 자실체에 도입된 유용 유전자의 전사 수준을 조사하기 위하여 specific primer를 사용하여 RT-PCR 방법으로 분석하였다. 형질전환된 자실체의 total RNA는 트리졸 시약을 사용하여 추출 하였으며, total RNA는 one-step RT-PCR 분석을 위한 주형으로 사용 하였다. 증폭 된 PCR 산물은 1 % 아가로스겔 상에서 확인 하였다. RT-PCR 실험은 형질전환된 균사체의 자실체에서 유용유전자 (hGH, PLSP3, CSF, SPB, EGF, EPO)를 전사 수준에서 확인 하였다.

아래 Fig. 238-254을 통해 연구결과를 나타내었다.

Fruiting bodies of *P. eryngii*



Isolation of total RNA



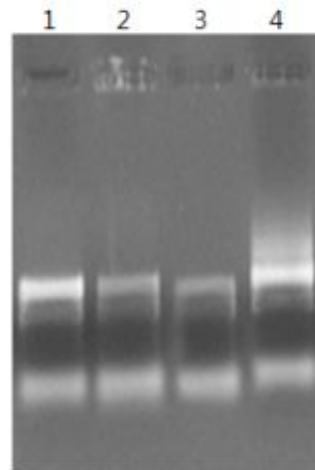
Use 5 ng to 5 ug total RNA for Reverse Transcription



RT-PCR analysis

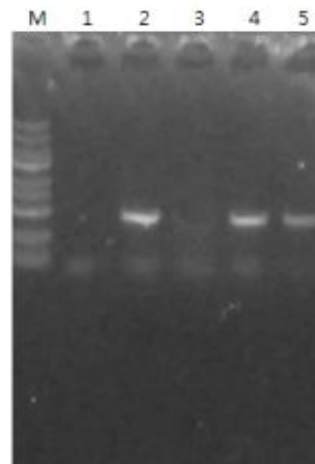
① Human growth hormone

A. Extraction of total RNA



Lane 1 pCamLacPhGH-1
Lane 2 pCamLacPhGH-2
Lane 3 pCamLacPhGH-3
Lane 4 pCamLacPhGH-5

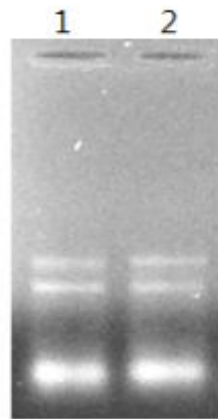
B. RT-PCR



Lane M 250 bp
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPhGH-1
Lane 3 pCamLacPhGH-2
Lane 4 pCamLacPhGH-3
Lane 5 pCamLacPhGH-5

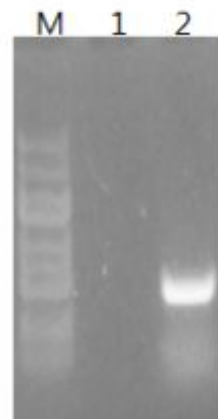
Fig. 238. Analysis of the hGH gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPhGH vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPShGH-1

B. RT-PCR



Lane M 250 bp
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPShGH-1

Fig. 239. Analysis of the hGH gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPShGH vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

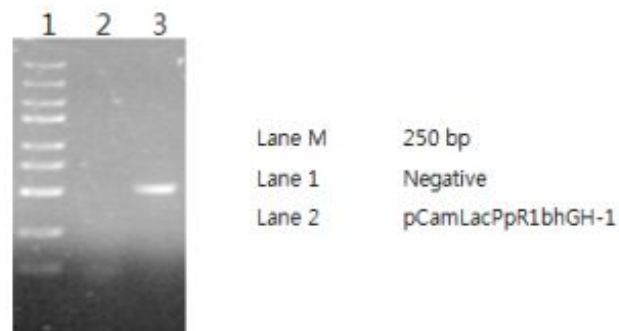


Fig. 240. Analysis of the hGH gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bhGH vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

② PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)

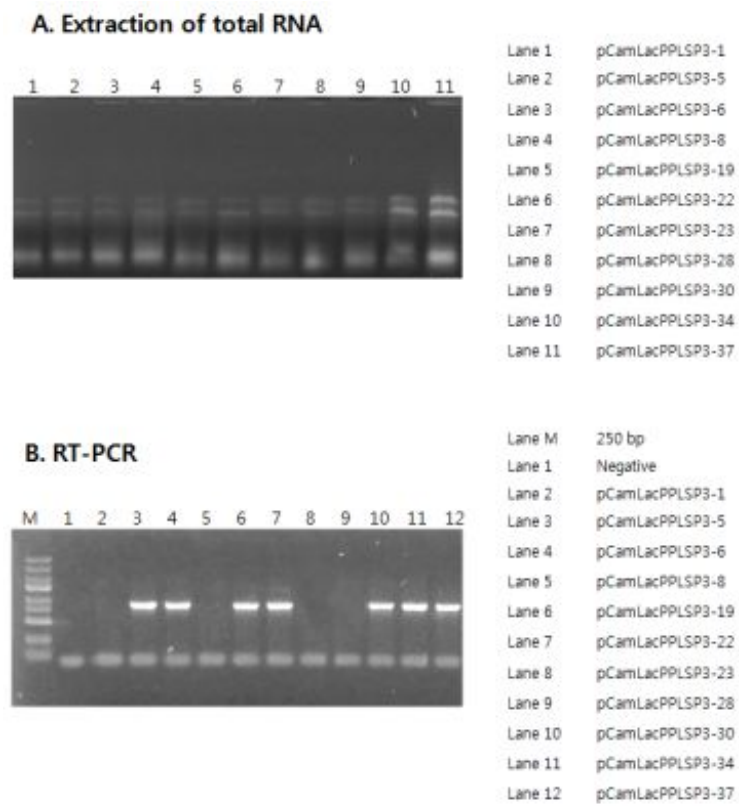
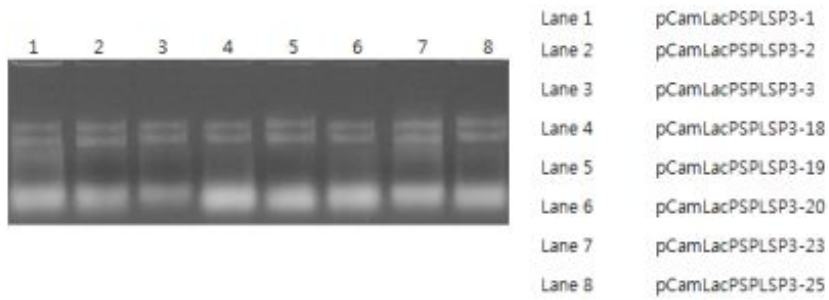


Fig. 241. Analysis of the PLSP3 gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPPLSP3 vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

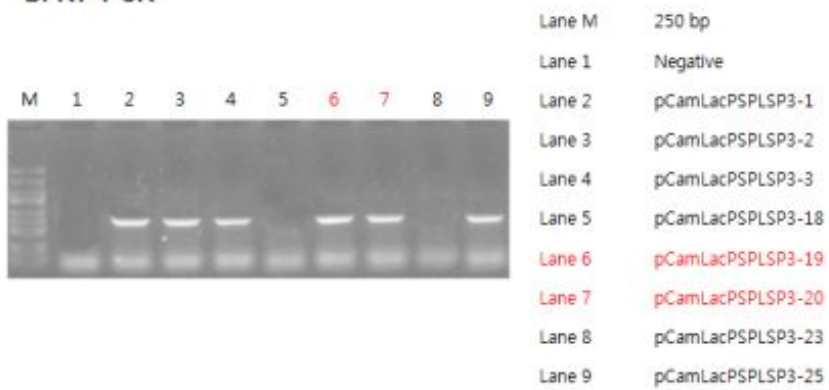
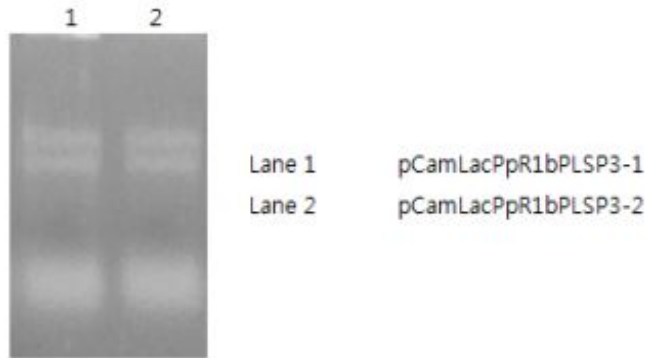


Fig. 242. Analysis of the PLSP3 gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSPLSP3 vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

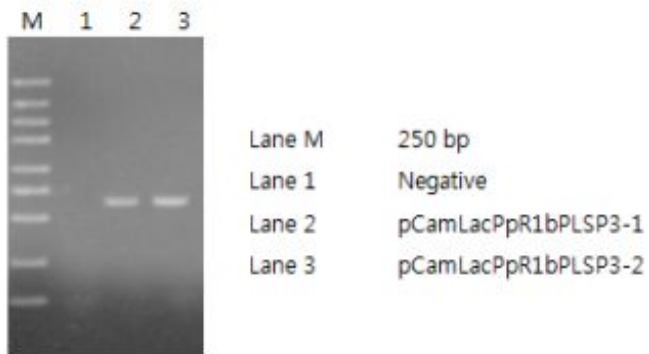
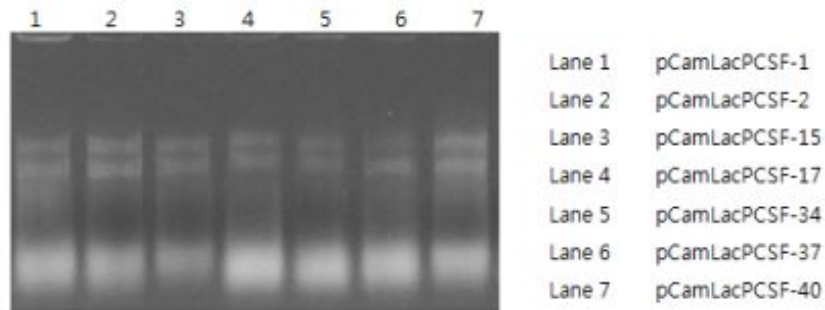


Fig. 243. Analysis of the PLSP3 gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bPLSP3 vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

③ Colony stimulating factor

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

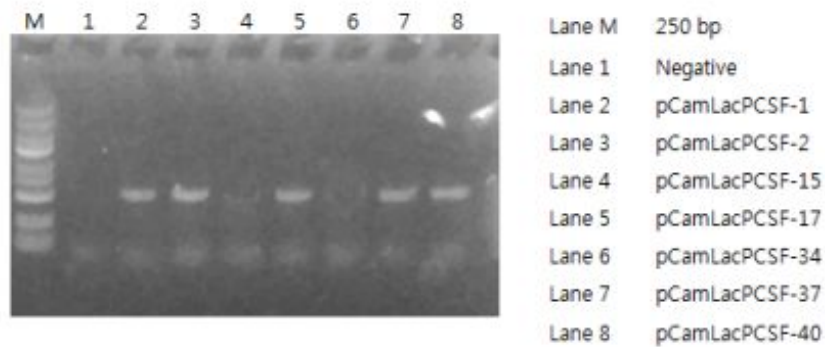
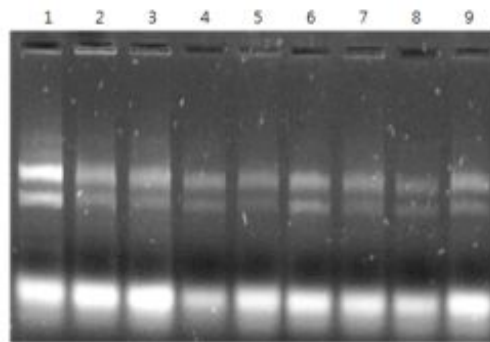


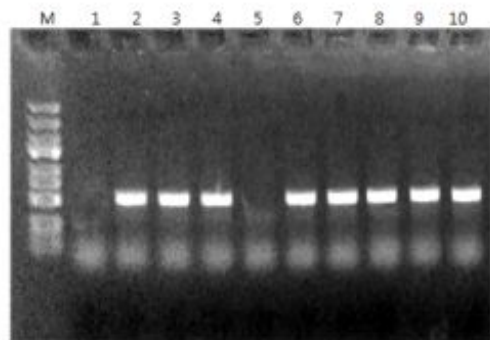
Fig. 244. Analysis of the CSF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPCSF vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



Lane 1 pCamLacPSCSF-1
Lane 2 pCamLacPSCSF-2
Lane 3 pCamLacPSCSF-3
Lane 4 pCamLacPSCSF-16
Lane 5 pCamLacPSCSF-17
Lane 6 pCamLacPSCSF-18
Lane 7 pCamLacPSCSF-19
Lane 8 pCamLacPSCSF-22
Lane 9 pCamLacPSCSF-25

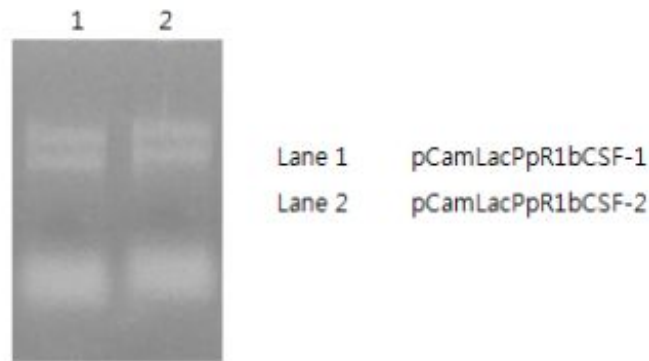
B. RT-PCR



Lane M 250 bp
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPSCSF-1
Lane 3 pCamLacPSCSF-2
Lane 4 pCamLacPSCSF-3
Lane 5 pCamLacPSCSF-16
Lane 6 pCamLacPSCSF-17
Lane 7 pCamLacPSCSF-18
Lane 8 pCamLacPSCSF-19
Lane 9 pCamLacPSCSF-22
Lane 10 pCamLacPSCSF-25

Fig. 245. Analysis of the CSF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSCSF vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

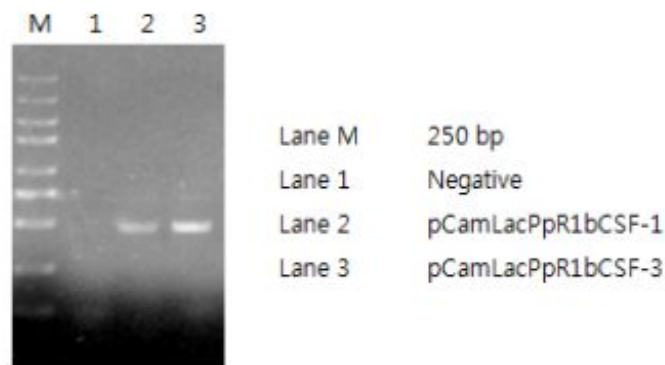


Fig. 246. Analysis of the CSF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bCSF vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

④ Surfactant protein B

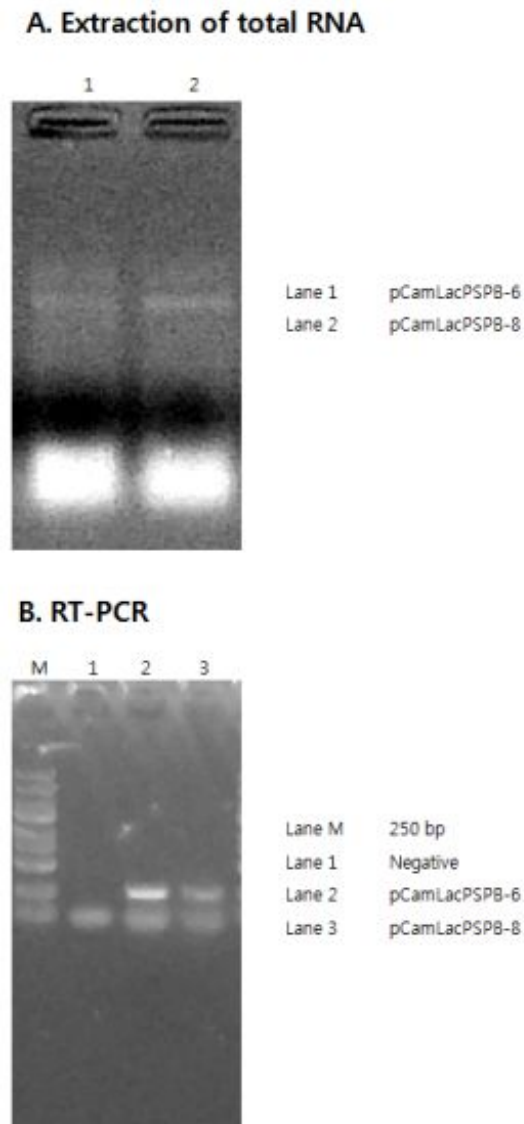
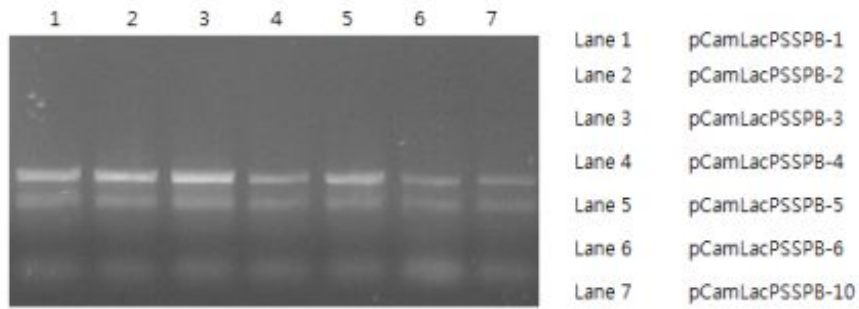


Fig. 247. Analysis of the SPB gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSPB vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

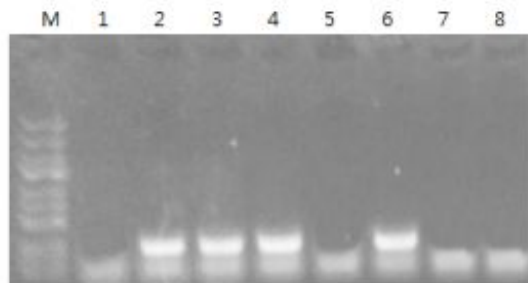
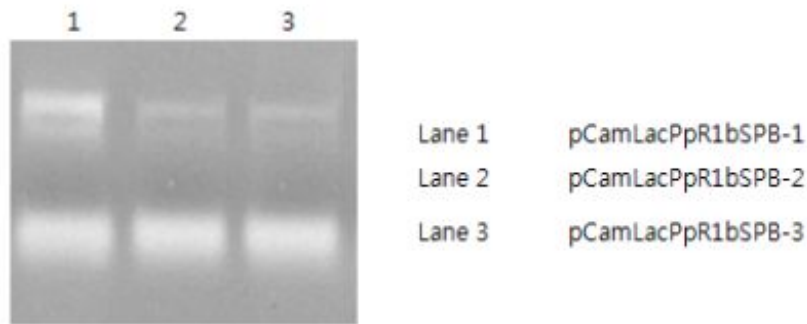


Fig. 248. Analysis of the SPB gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSSPB vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

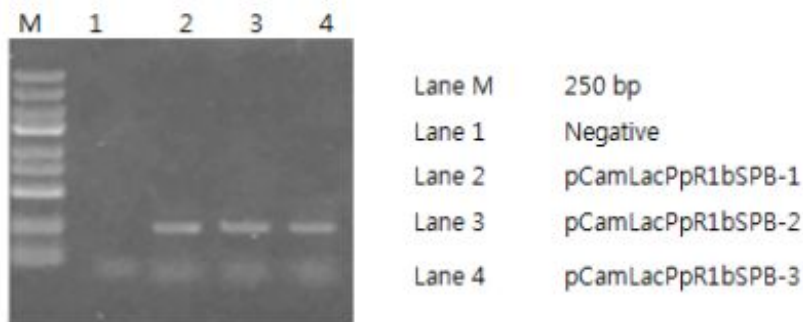
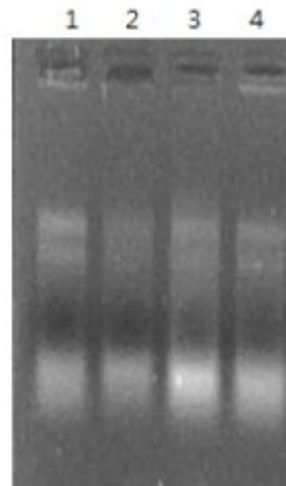


Fig. 249. Analysis of the SPB gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bSPB vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

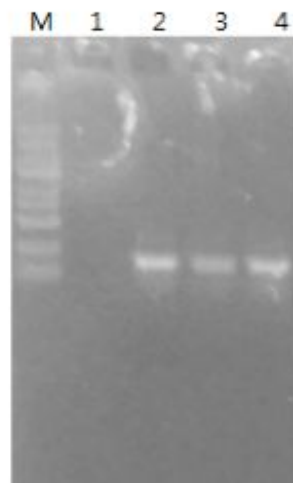
⑤ Epidermal growth factor

A. Extraction of total RNA



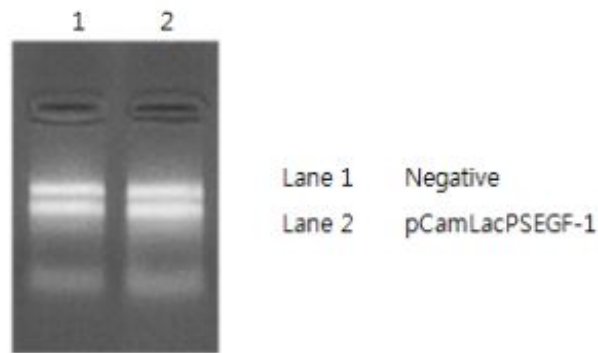
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPEGF-1
Lane 3 pCamLacPEGF-2
Lane 4 pCamLacPEGF-3

B. RT-PCR



Lane M 250 bp
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPEGF-1
Lane 3 pCamLacPEGF-2
Lane 4 pCamLacPEGF-3

Fig. 250. Analysis of the EGF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPEGF vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).



B. RT-PCR

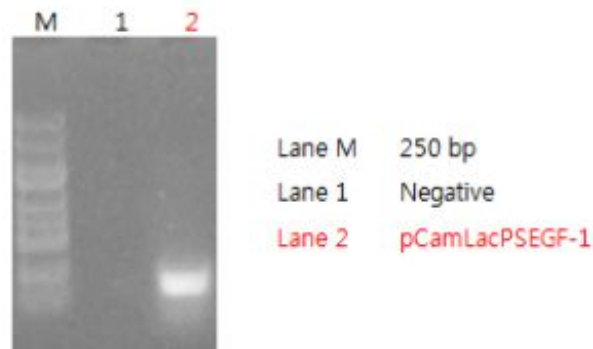
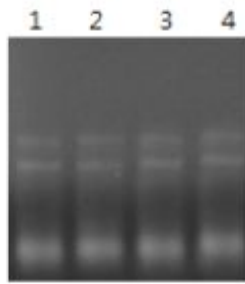


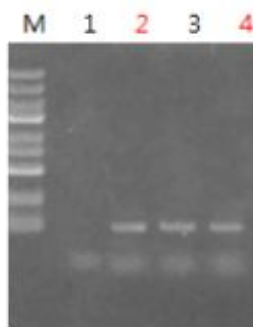
Fig. 251. Analysis of the EGF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSEGF vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPpR1bEGF-1
Lane 3 pCamLacPpR1bEGF-2
Lane 4 pCamLacPpR1bEGF-3

B. RT-PCR



Lane M 250 bp
Lane 1 Negative
Lane 2 pCamLacPpR1bEGF-1
Lane 3 pCamLacPpR1bEGF-2
Lane 4 pCamLacPpR1bEGF-3

Fig. 252. Analysis of the EGF gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bEGF vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

⑥ Erythropoietin

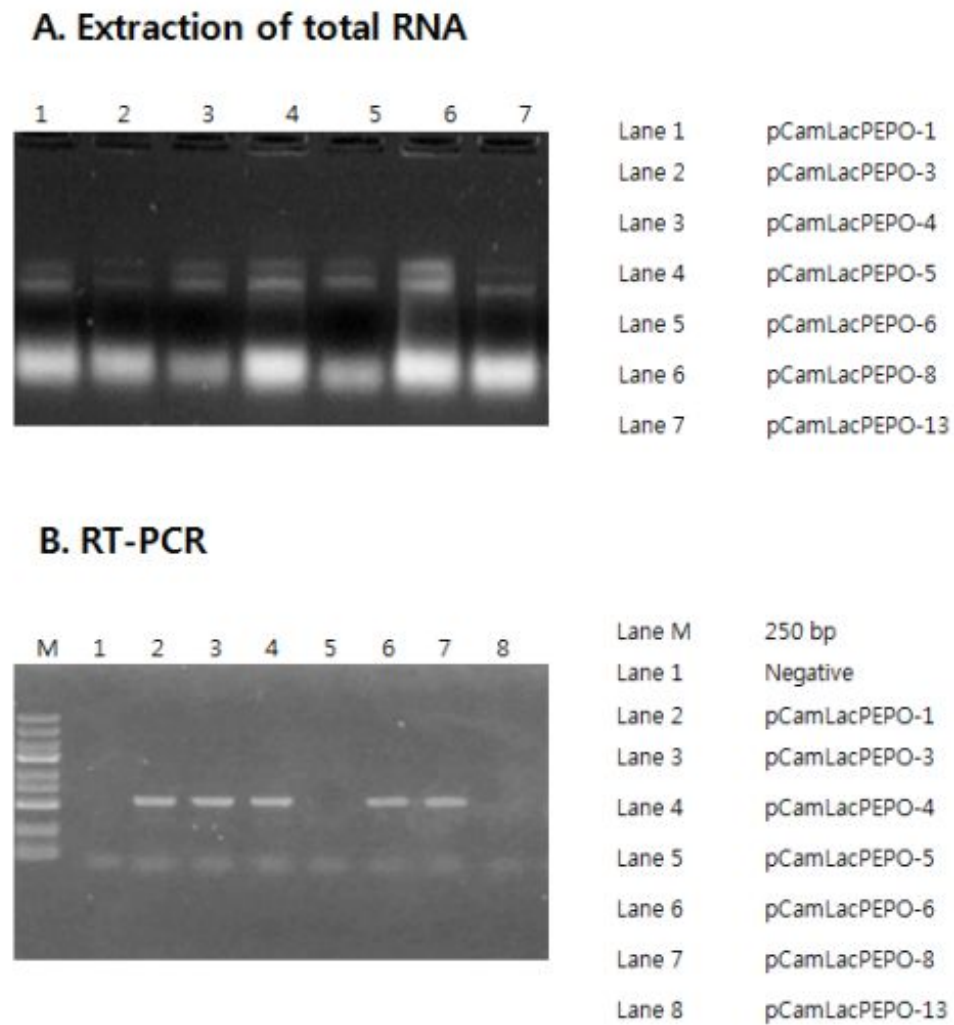
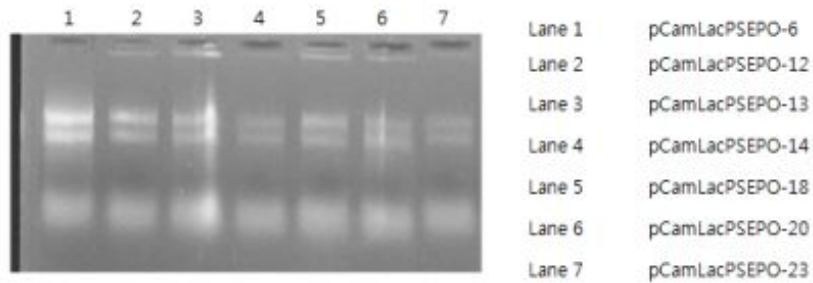


Fig. 252. Analysis of the EPO gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPEPO vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

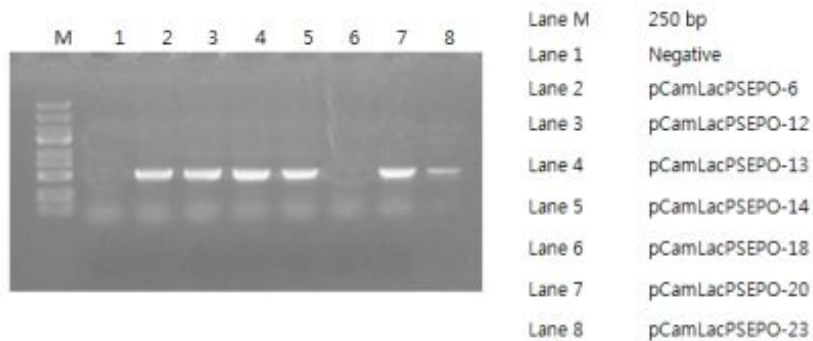


Fig. 253. Analysis of the EPO gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPSEPO vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

A. Extraction of total RNA



B. RT-PCR

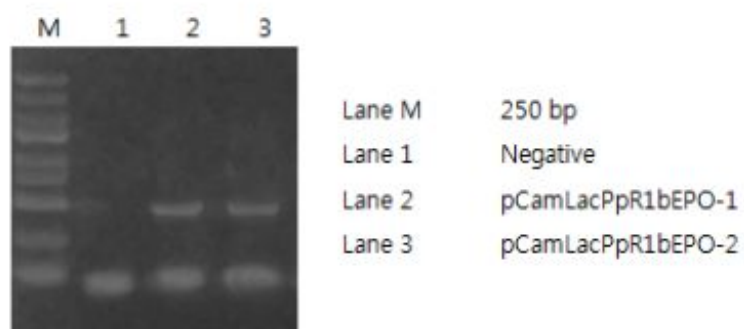


Fig. 254. Analysis of the EPO gene from fruiting bodies of *P. eryngii* containing pCamLacPpR1bEPO vector. Total RNA of fruiting bodies (A) and Analysis of mRNA expression by RT-PCR (B).

(다) 새송이버섯 자실체에서 유전자 발현

① Human growth hormone

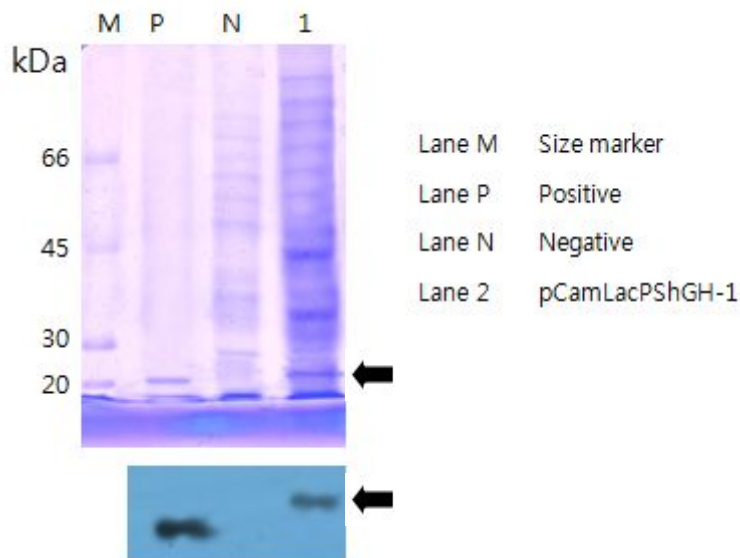


Fig. 255. Expression of the hGH from fruiting bodies of *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPShGH vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

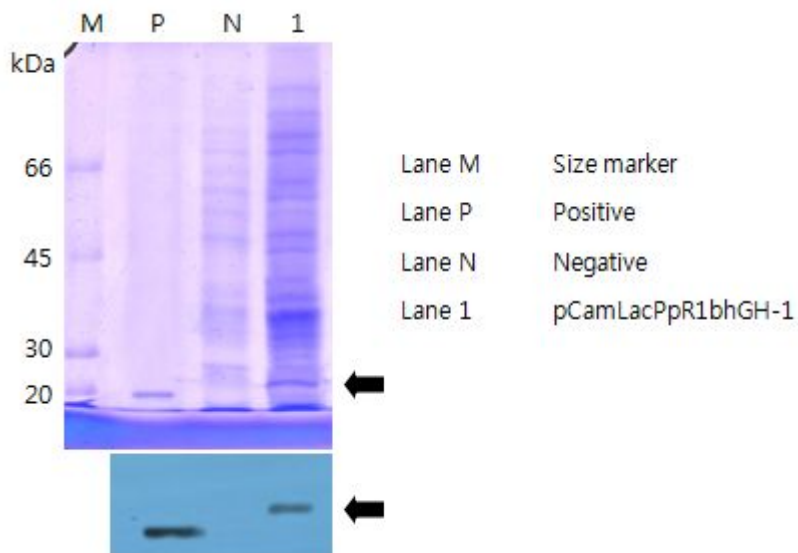


Fig. 256. Expression of the hGH from fruiting bodies of *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bhGH vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE. (B) Western blot analysis.

② PLSP3 (*Periserrula leucophryna* serine protease)

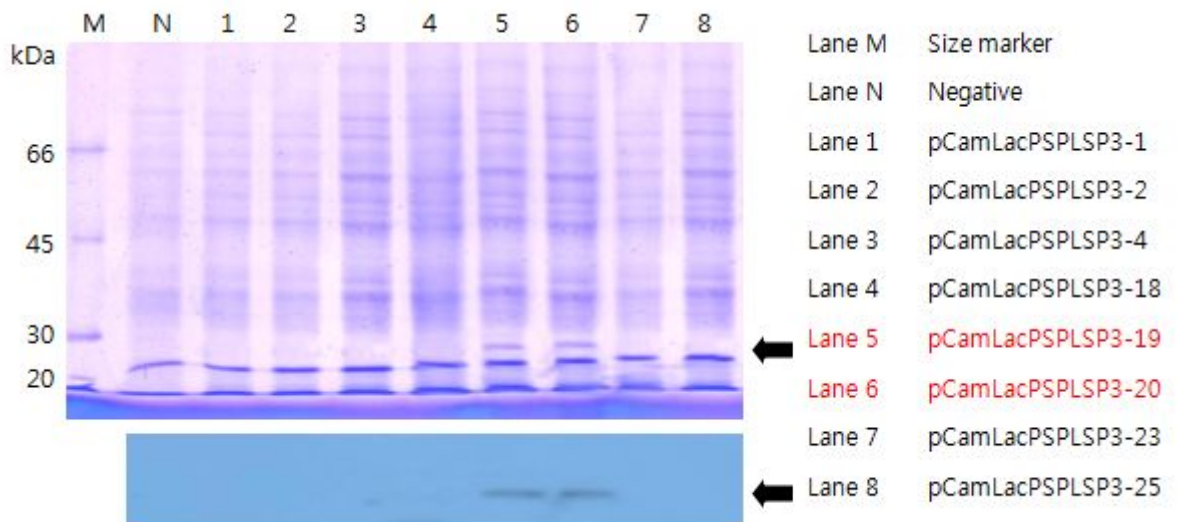


Fig. 257. Expression of the PLSP3 from fruiting bodies of *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSPLSP3 vector in flask. The proteins were fractionated in 12% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

③ Epidermal growth factor

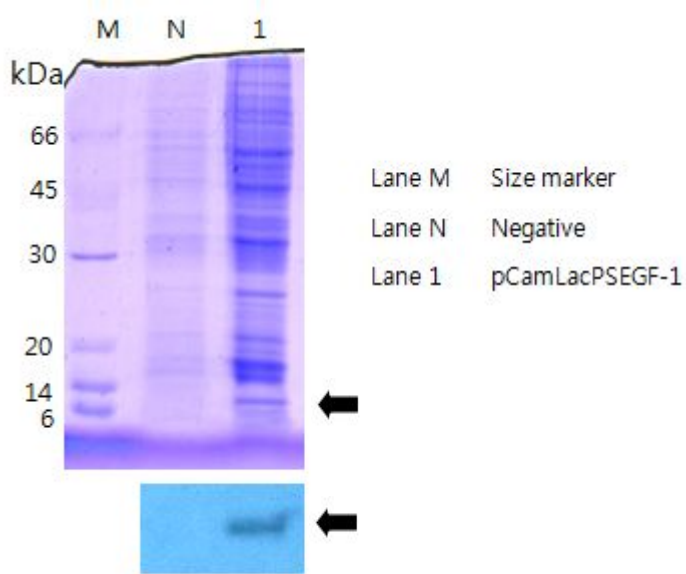


Fig. 258. Expression of the EGF from fruiting bodies of *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPSEGF vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

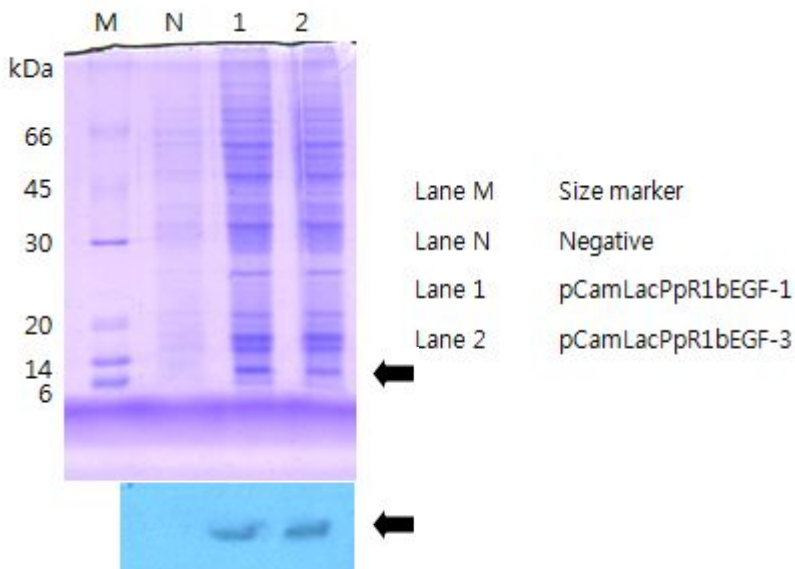


Fig. 259. Expression of the EGF from fruiting bodies of *P. eryngii* mycelia harboring pCamLacPpR1bEGF vector in flask. The proteins were fractionated in 15% SDS-PAGE and Western blot analysed with polyclonal antibody.

(라) 유용유전자 분비벡터 mRNA 이차구조 분석

Group	Gene	ΔG
Laccase signal	EGF	-15.60
	SPB	-19.01
	hGH	-13.07
	CSF	-21.45
	PLSP3	-17.70
	EPO	-21.41
pR1b signal	EGF	-6.41
	SPB	-13.91
	hGH	-7.95
	CSF	-12.34
	PLSP3	-21.02
	EPO	-12.21

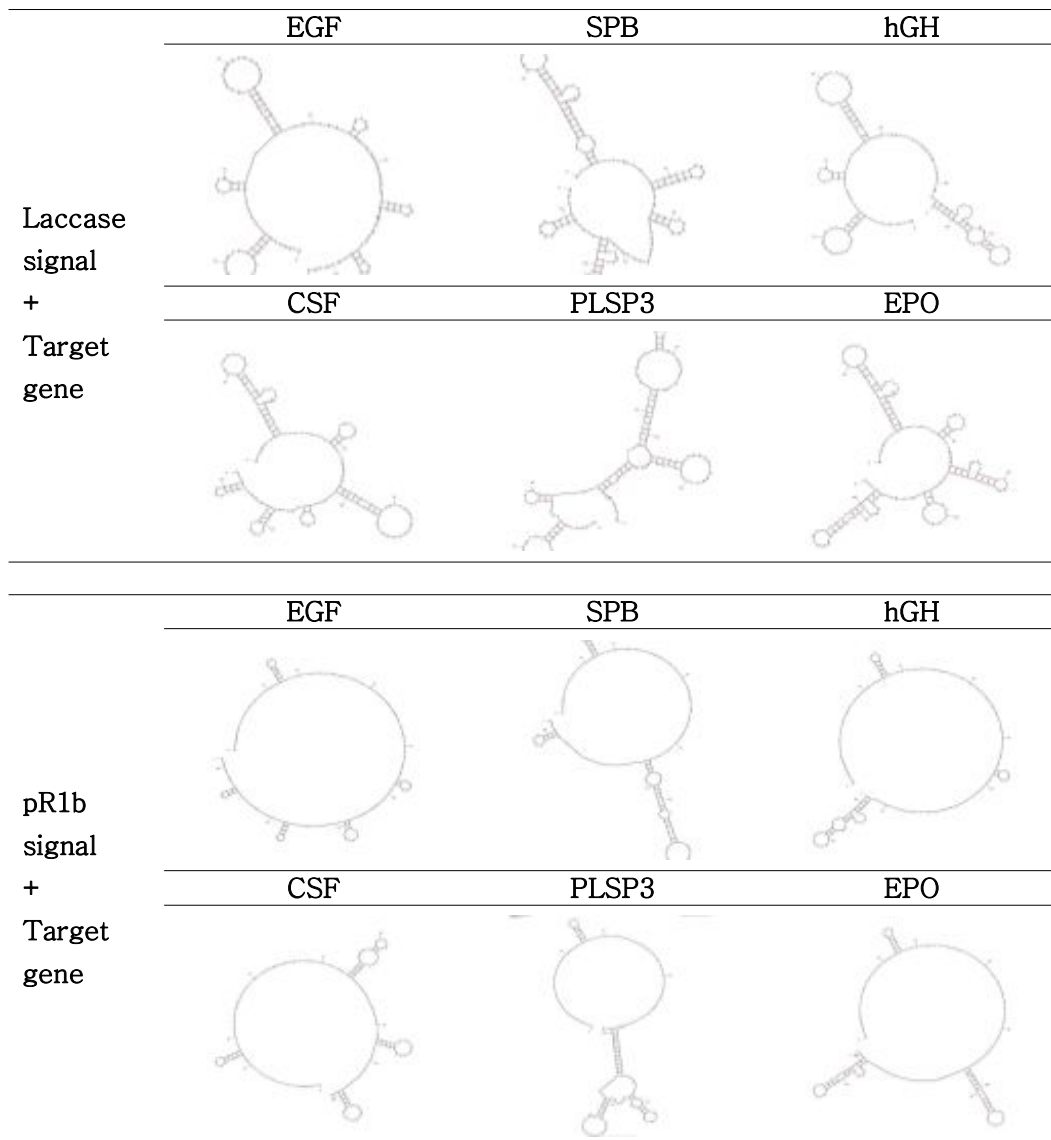


Fig. 260. mRNA secondary structure analysis

발현시 mRNA의 5'-말단에 존재하는 이차구조에 의한 단백질 합성에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 단백질 해독시 ATG 개시코돈에서 주변의 염기서열이 mRNA 이차구조에 영향을 주므로 중요한 요인으로 작용한다. 본 연구에서 분비서열의 첫 번째 아미노산부터 암호화하는 5'-말단 mRNA 서열에 존재하는 loop형태의 이차구조 (ΔG)에 따른 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 단백질 발현이 가장 높은 pCamLacPShGH vector의 mRNA 이차구조의 ΔG 값이 가장 높은 것을 확인하였다. 또한 단백질 합성의 초기 단계에서 ribosome이 mRNA 합성 후 지속적인 합성을 위해 이동해야 하지만 이차구조에 의한 방해에 의해 단백질 합성률이 저하는 되는 것을 나타내며, 5'-말단에 존재하는 이차구조를 제거하는 것이 새송이버섯에서 유용단백질의 발현에 중요한 요소라는 것을 제시하고 있다. 또한 laccase promoter에 결합된 2종류의 신호서열 (laccase signal 및 pathogen-related signal)에 의해 EGF, hGH 및 PLSP3의 경우에 세포내 발현에는 영향을 주었으나, 궁극적인 연구목표인 세포외 분비를 위한 processing (peptidase에 의한 신호서열 절단)에 의한 단백질의 원기로의 분비는 미흡한 것으로 사료되어 새로운 분비서열 구축에 의한 지속적인 연구를 수행할 예정이다. 또한 새송이버섯에서 형질전환체 선별 및 효율 증진을 위한 형질전환법 확립을 위하여 PCR 및 RT-PCR에 의한 genomic DNA 수준 및 RNA 전사 수준에서 확인하는 방법에 첨가하여, 염색체 DNA에 도입된 유전자를 southern blot 분석에 의해 제 2세대 line 구축 실험에서 병행할 예정이며, 현재 균사체 및 자실체로부터 genomic DNA를 추출하여 제한효소 처리에 의한 전기영동을 수행하였고, hybridization에 의한 최종 확인 후에 결과는 사후 관리시 논문에 포함할 예정임.

제 2 절 협동과제 : 새송이버섯 형질전환법 개발에 의한 기능성 강화 버섯 품종 개량

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 연구내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
o 색소유전자 cloning	o RT-PCR에 의한 색소유전자 cloning (Anthocyanin생합성)	<ul style="list-style-type: none"> • Anthocyanin 생합성관련 효소 및 유전자발현 조절관련 transcription factor에 대한 Genbank 정보 및 문헌검색 • DNA/protein sequence homology 분석 • Transcription factor에 의한 anthocyanin 생합성조절이 보다 실현 가능성이 높을 것으로 판단 • Primer 제작 • 포도, 병, 복분자, 석류 등으로부터의 RNA추출 • Trizol, GTC, Silica, phenol method 등 다양한 방법으로 RNA추출 • 열매의 경우 포도에서만 RNA추출 성공 • Gradient RT-PCR 수행 • Vmyb transcription factor 2개 clone 확보 • DNA sequencing 및 homology분석 • pCambia vector로 cloning 진행
	o RT-PCR에 의한 색소유전자 cloning (Carotenoid)	<ul style="list-style-type: none"> • Carotenoid 생합성관련 유전자/문헌 검색 • Erwinia 및 고추의 carotenoid생합성관련 유전자 (bicistronic construct)를 지닌 식물벡터 입수 (PAC) • <i>Haemococcus pluvialis</i> 균주 구입 • 균주배양, RNA추출 • primer 제작 • RT-PCR 수행 • CrtO 유전자 T-vector cloning • DNA sequencing 및 ORF확인 • pCambia, pEV 등 vector로 cloning

	o HBsAg cloning	<ul style="list-style-type: none"> • 간염백신으로 이용되는 hepatitis B surface antigen 문헌 및 유전자 검색 • ATCC로부터 HBsAg clone입수 • 유전자정보 검색을 통하여 primer를 제조하고 PCR을 통하여 0.7 kb DNA fragment 제조 • T vector cloning 및 DNA sequencing • pSK vector cloning 및 IPTG induction • SDS-PAGE 및 western blotting으로 bacterial expression 확인 • fungal vector로 cloning중
o 유용유전자 도입을 위한 발현백터제조	o GAD cloning	<ul style="list-style-type: none"> • 제1형 당뇨병에 대한 경구백신 효능을 보이는 glutamate decarboxylase (67 kD) 문헌 및 유전자 검색 • ATCC로부터 GAD clone입수 • 유전자정보 검색을 통하여 primer를 제조하고 PCR을 통하여 0.7 kb DNA fragment 제조 • T vector cloning 및 DNA sequencing • pSK vector cloning 및 IPTG induction • SDS-PAGE 및 western blotting으로 bacterial expression 확인 • fungal vector로 cloning중
o (Extra) 새송이 균사체 성장연구	o 커피박을 이용한 균사성장촉진	<ul style="list-style-type: none"> • 기존 배지별 성장속도 비교 • PDA, MCM, modified PDA 등 • PDA가 상대적으로 양호 • 커피박에 대한 문헌 검색 • polyphenol 성분이 풍부하며 기능성물질 source로서의 가치 확인 • 농도별 커피박 첨가에 따른 새송이 균사체 성장속도 비교 • 1% 커피박이 가장 빠른 성장촉진효과를 보임 • 균사체의 기능성 증대 확인 • total polyphenol content • total flavonoid content • DPPH assay

		<ul style="list-style-type: none"> • 병재배시 커피박의 성장촉진효과 분석
○ 발현 vector 제작	GPD Promoter cloning	<ul style="list-style-type: none"> • 버섯 종류별 DNA 추출 • PCR에 의한 GPD T-vector cloning • pBI121에 CaMV35S promoter 대체 cloning • pCambia1300으로 cloning • 형질전환 및 GUS activity 비교 • 색소관련 유전자의 pBI121ΔGUS로의 cloning • HBsAg/GAD67 유전자의 pBI121ΔGUS로의 cloning • pBI121으로 도입된 색소관련 유전자의 pCambia1300으로의 cloning • pBI121으로 도입된 HBsAg/GAD67 유전자의 pCambia1300으로의 cloning
○ 형질전환 및 발현 분석	Agrobacterium 이용 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> • 상해(wounding)를 이용한 Agrobacterium-mediated transformation (W-AMT) 법 개발 • W-AMT에 의한 효율적인 새송이 형질전환 • 발현벡터별 W-AMT에 의한 형질전환 진행 • W-AMT에 의한 여러 종류의 다른 유용버섯 형질전환 시도 및 효율성 입증 • 형질전환체 선발 • PCR • RT-PCR, Southern blot hybridization
○ 균사체 및 자실체 배양	배지조건에 따른 균사체 성장 및 자실체 형성	<ul style="list-style-type: none"> • Metal ion첨가에 의한 균사체 배양 및 자실체 생산 • 당근추출액 첨가에 의한 새송이 균사체 성장 촉진 • 당근추출액 첨가에 의한 기타 유용버섯 균사체의 성장 촉진효과 비교 • 당근추출액 첨가에 의한 새송이 병재배 • 당근추출액 첨가에 의한 새송이 자실체 생산과 성분변화 분석

2. 연구결과

가. 새송이 균사체 생육촉진 연구

색소생합성관련 유전자의 도입 및 기능성 색소생산 새송이버섯의 제조에 있어서 우선적으로 새송이 균사체의 생육촉진 연구를 수행하였다. 새송이 균사체는 기타 버섯의 균사체에 비하여 그 생장이 매우 더딘 편으로서 색소관련 유전자의 발현벡터 제작 및 형질전환의 신속한 수행을 위한 선결과제이기 때문이다. 최적 배양조건을 설정함에 있어서 온도, pH, 질소원, 탄소원, 배지 종류 등 다양한 factor가 관여할 수 있는데 본 연구에서는 장차 새송이버섯 자실체의 생산까지 고려한 경제성을 중요시하여 쉽게 또는 값싸게 입수할 수 있는 생물자원을 연구대상으로 하였다.

균사체 성장 촉진을 위한 다양한 bioresource들을 비교 실험해 본 결과 그 중 커피박의 이용이 가장 적합할 것으로 판단되었다.

(1) 커피박 (Spent coffee ground: SCG)을 이용한 새송이 균사체 생육촉진

커피음료는 다양한 생리활성물질을 포함하는데 flavonoids (catechins, anthocyanins 등), caffeic acid 및 ferulic acid 등을 주로하여 nicotinic acid, trigonelline, quinolinic acid, tannic acid, pyrogalllic acid 및 caffeine 등이 알려져 있다 (Minamisawa et al., 2004). 특히 caffeine, chlorogenic acid, hydroxycinnamic acids 및 melanoidins는 대표적인 항산화 물질로서 (Vignoli et al., 2011) 만성질환 (Alzheimer, Parkinson, 2형 당뇨, 심장질환, 암 등) 예방이나 억제 또는 수명 연장과 관련되는 것으로 보고되고 있다 (Nkondjock et al., 2006). 커피음료 제조에 필요한 볶은 커피콩에는 탄수화물 (38-42%), melanoidins (23%), 지질 (11-17%), 단백질 (10%), 미네랄 (4.5-4.7%), chlorogenic acid (2.7-3.1%), 지방산 (2.4-2.5%), caffeine (1.3-2.4%) 등을 비롯하여 기타 850 종 이상의 휘발성성분이 포함되어 있는 것으로 밝혀져 있다. 이들 성분들은 커피음료로 상당부분 용출되지만 일부 생리활성물질은 찌꺼기인 spent coffee grounds (SCG)에 여전히 잔존할 것으로 추측된다.

SCG는 그 생성량이 세계적으로 연간 6백만 톤 이상으로 추산됨으로써 (Tokimoto et al., 2005) 그 재활용에 대한 연구가 다각적으로 진행 중이다. 즉, 연료소재, 사료 또는 비료 첨가물 (Saenger et al., 2001; Silva et al., 1998), 기능성 물질 소재원 (Simões et al., 2009), 바이오디젤 원료 (Franca et al., 2009) 또는 버섯재배용 배양토 혼합물 (Machado et al., 2012; Ridha et al., 2012) 등을 예로 들 수 있다. 균사체의 배양 시 그 생육 등에 미치는 SCG의 영향을 조사한 연구는 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 새송이 균사체 배양 시 농도별 SCG 첨가에 의한 균사체 생장이나 polyphenol 함량 및 항산화능의 변화에 미치는 영향을 분석하였다.

(가) 균사체 배양 및 생육측정 결과

새송이버섯 (*Pleurotus eryngii*)은 농업유전자원연구센터 (KACC 50028)로부터 제공받았으며 potato dextrose agar (PDA) 또는 potato dextrose broth (PDB) 배지를 이용하여 25°C 암조건에서 균사체 배양을 실시하였다. SCG 첨가 배지를 포함하여 모든 배지의 pH는 5.4로 조정하였다. SCG는 인근 지역 커피전문점으로부터 입수하였으며 50°C에서 일정 무게가 될 때까지 건조시킨 후 사용하였다. 액체배양을 위하여 PDA배지에서 배양한 균사체를 금속 loop를 이용하여 준비한 직경 5 mm pellet 10개를 250 ml flask 내 100 ml PDB에 접종하였다. 진탕배양 (120 rpm, 25°C, 8 day) 후 여과장치를 이용한 배양액 제거 및 증류수 세척에 의한 SCG 찌꺼기를 분리 제거하였다. 수집한 균사체는 일정 무게에 도달할 때까지 50°C에서 건조시켜 건조중량 (dry cell weight: DCW) 측정 및 추출액 제조에 이용하였다.

볶은 커피 콩에는 100 g 당 3 g 정도의 TPC가 분석되고 있다 (Nebesny and Budryn, 2003). 일반 커피 전문점으로부터의 SCG는 상당량의 polyphenol 성분이 커피 음료 (coffee brew)로 방출됨으로써 일부의 polyphenol 성분만이 잔존할 것으로 짐작할 수 있다. 커피원두의 종류 및 볶는 방식 그리고 커피음료 제조 방식 (espresso나 drip 방식 등)에 따라 커피음료의 TPC나 성분에서 차이를 보이는데 (Hecimovic et al., 2011) 따라서 SCG의 구성 성분이나 TPC에서의 차이는 당연할 것이다. 본 실험에서 사용한 SCG는 70% methanol 추출 시 100 g 당 0.4 g의 TPC가 확인되었다. SCG 첨가에 의한 새송이 균사체 생육변화를 관찰하기 위하여 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10% (w/v) SCG가 포함된 PDA배지를 준비한 후 균사체 pellet을 얹어 놓고 생육정도를 눈으로 관찰하였다. 그 결과 무처리에 비해 SCG 처리 배지에서 상대적으로 균사체 생장이 빨라지는 결과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 261).

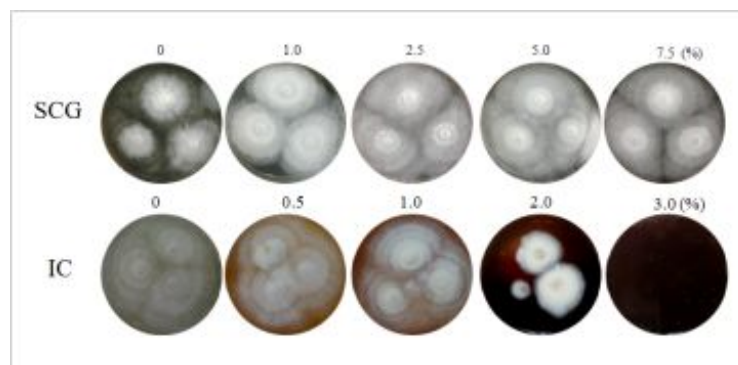


Fig. 261. Effect of spent coffee ground (SCG) and instant coffee (IC) on the solid-stated mycelia growth of *P. eryngii*.

* 성장속도 변화를 정량화하기 위하여 액체배양에 의한 균사체의 생육을 DCW로 비교하였다. 균사체 pellet을 투여한 후 8일 동안 액체배양을 실시하였을 때 1 및 2.5% SCG 처리 군에서는 형태적으로는 균사체 cluster의 크기가 무처리에 비하여 훨씬 커진 것을 확인할 수 있었으며 5% 또는 그 이상의 SCG 처리에서는 균사체 cluster가 무처리와 유사하게 관찰되었다. SCG 무처리의 경우 평균 2.2 g (DCW/l)가 측정되었으며 이에 비해 1% SCG의 경우 5.8 g로 측정되어 2.5배 정도의 성장량 증대를 확인할 수 있었다. SCG 농도가 높아질 수록 DCW는 점차 감소하는 경향을 보였다. 그러나 10% SCG에서도 여전히 무처리에 비해 높게 측정되었다 (Fig. 262). 이러한 결과는 SCG의 탄수화물, 단백질, polyphenol 또는 기타 성분이 새송이 균사체 성장에 우호적 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 식물로부터의 polyphenol 성분들은 항산화, 항암 등 다양한 기능성을 지니고 있다는 것은 잘 알려져 있는데 한편으로는 항균이나 항진균 효과 또한 잘 알려져 있는 사실이다. 본 실험에서 높은 농도의 SCG를 처리 시 DCW가 감소하는 원인은 커피의 polyphenol 농도가 높아지기 때문일 것으로 일부 해석할 수 있다. 실제 커피의 주성분인 chlorogenic acid의 경우 항진균 활성이 보고된 바 있다 (Sung & Lee, 2010). Instant coffee (IC)는 시중에서 쉽게 구입할 수 있는데 polyphenol함량이 보통 50-100 mg/g의 제품들이다. 이들 중 50 mg polyphenol/g으로 표시된 IC 제품을 PDA 배지에 첨가하여 균사체 생육을 비교 관찰하였다. 그 결과 3% IC (150 mg polyphenol/100ml)에서는 균사체 생장이 완전히 억제 되는 것이 확인되었는데 이는 10% SCG (40 mg polyphenol/100 ml)의 3배 이상의 TPC 조건에 해당된다. 결국, 일정 범위 농도 내의 polyphenol을 포함하는 SCG 첨가는 새송이 균사체 생육 촉진에 매우 효과적임이 판단되었다.

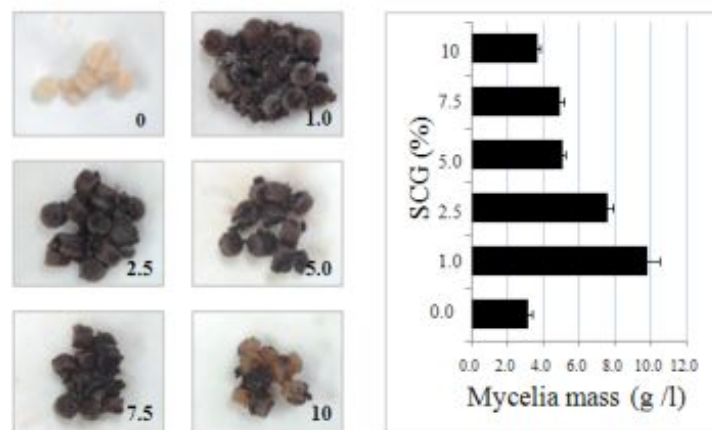


Fig. 262. SCG-activated growth of *P. eryngii* mycelia in submerged culture. Harvested cells (left) and dried cell weight (right) after cultivation in PDB supplemented with different concentration of SCG.

(나) 성장촉진 균사체의 기능성 분석

SCG 처리가 새송이 균사체의 성장 촉진에 상당한 효과를 보임과 동시에 균사체가 커피색을 지닌 형태로 바뀔에 따라 polyphenol 성분의 변화나 이에 따른 기능성 변화도 예측됨으로써 이에 대한 조사를 시행하였다.

균사체 추출: 건조 균사체 0.1 g을 액체질소를 이용하여 분말화 시키고 이를 1 ml의 70% methanol에 녹인 후 교반추출 (22°C, 24 hr, 180 rpm)을 실시하였다. 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)에 의하여 추출액을 수집한 후 0.45 µm filter로 통과시키고 70% methanol을 첨가하여 1 ml로 조절하였다. 이를 분석에 필요한 균사체 추출액 (*P. eryngii* methanolic extracts: PeMe)으로 이용하였다. Polysaccharides 측정능 Phenolsulfuric acid 방법 (Buissee and Merckx, 1993)에 의하여 polysaccharide 총량을 측정하였으며 glucose를 이용한 standard curve를 기준으로 하였다. Polyphenol 및 flavonoid 측정을 위하여 물로 희석한 PeMe 1 ml, 물로 10배 희석한 Folin-Ciocalteu 용액 5 ml 그리고 7.5% sodium carbonate 용액 4 ml을 섞고 실온에서 방치 (1 hr) 후 증류수를 blank로 하여 765nm에서 흡광도를 측정하였다. Polyphenol 총량 (total polyphenol content: TPC)은 garlic acid를 이용한 standard curve에 근거하여 PeMe의 garlic acid equivalents (GAE)를 정하였다. Flavonoid 총량 (total flavonoid content: TFC)은 aluminum chloride 발색법에 의하여 결정하였으며 (Vennat *et al.*, 1992) quercetin을 이용한 standard curve에 근거하여 PeMe의 quercetin equivalent (QE)를 정하였다.

버섯의 종류에 따라 phenol화합물 및 flavonoid함량이 차이가 많이 나타나며 건조 자실체 1 g 당 1-6 mg GAE 그리고 flavonoid의 경우 1-3 mg이 분석된 바 있다 (Palacios *et al.*, 2011). 한편, 볶은 커피에는 20-40 mg GAE/g를 포함하며 이중 4-20 mg의 flavonoid 화합물이 포함되어 있는 것으로 분석되었다. (Hecimovic *et al.*, 2011). SCG를 새송이 균사체 배양액에 첨가하였을 때 균사체의 TPC 및 TFC 변화를 측정하였다. 일단, SCG를 첨가한 액체배양에서의 균사체는 특히 그 형태적으로커피 특유의 갈색으로 변함으로써 SCG의 polyphenol이나 flavonoid 성분이 균사체 내로 활발하게 흡수 및 이용되는 것을 예측할 수 있었다. Folin - Ciocalteu 시약을 이용한 새송이 균사체의 TPC 측정 결과 평균 1.44 mg GAE/g으로 측정되었다. SCG첨가의 TPC 증가가 확연하게 나타났는데 즉, 5% SCG의 경우 3.14 mg GAE/g로 가장 높게 측정되었다. 그러나 1.0-7.5% SCG에서의 TPC는 전반적으로 비슷하게 측정되었다. 10% SCG에서는 SCG 농도가 가장 높음에도 불구하고 1.9 mg GAE/g로 상대적으로 낮게 측정되었으나 여전히 무처리에 비해서는 높은 수치를 보였다. 결국 일정 농도의 SCG 첨가를 통하여 새송이 균사체 성장 촉진과 더불어 균사체 내 polyphenol 함량 증가가 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. Polyphenol 성분은 매우 다양하며 flavonoid 계통 및

tannin과 같은 non-flavonoid 계통으로 구성된다. 무처리의 경우 TFC는 0.68 mg QE/g로 나타났는데 이는 TPC의 50% 미만이다. 한편, 1.0-7.5% SCG에서는 2.33-2.56 mg QE/g로 분석되었으며 TPC의 70% 이상이 TFC로 분석되었다. 이로써 SCG 처리에 의하여 TFC가 3배 이상 증가하였다는 것과 TFC가 차지하는 비율도 훨씬 높아졌다는 것을 확인할 수 있었다. 한편 polysaccharides 함량에서는 SCG에 의한 차이가 보이지 않음으로써 SCG가 새송이 균사체의 TPC 증가에 주로 기여하고 있다는 것을 판단할 수 있었다.

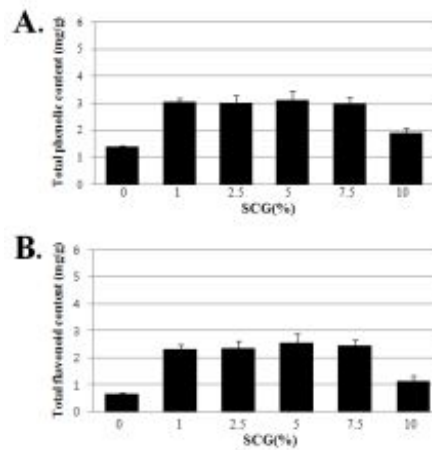


Fig. 263. Total polyphenol content (A) and total flavonoid content (B) of methanolic extracts from *P. eryngii* mycelia cultivated for 8 days in PDB supplemented with SCG.

DPPH 소거능 측정: DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free-radical 소거능 분석법 (Hatano et al., 1988)에 따라서 0.1 ml 희석 PeMe, 0.5 ml 500 μ M DPPH (ethanol 용해) 그리고 0.4 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)의 혼합액을 실온에서 반응 (20 min, 암조건) 시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid를 이용한 DPPH 소거능을 기준으로 50% 항산화능을 보이는 시료 농도를 IC₅₀로 정하였다.

Phenol 화합물이 항산화능을 지니는 것은 잘 알려져 있으나 그 억제능은 TPC나 TFC와 비례적이지는 않으며 이는 각각의 phenol화합물이나 이들 그룹들의 구성에 따라 상승작용이나 길항작용이 존재하기 때문인 것으로 알려져 있다 (Becker et al., 2004). 커피 항산화능은 주로 polyphenol류에 기인하는 것으로 잘 알려져 있으며 이들 polyphenol 화합물들 중 chlorogenic acids, caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, 그리고 proanthocyanidins 등이 항산화능에 주요 역할을 보인다. 커피 항산화능은 TPC나 chlorogenic acid의 양에 비례적으로 나타나는 것으로 알려져 있다 (Niseteo et al., 2012). 버섯의 경우 항산화능과 관련하여 주로 glucan, glycan 또는 pepto-polysaccharides등의 polysaccharides 그리고 phenol화합물의 역할이 잘 알려져 있으며 주로 polysaccharides에 의한 항산화능이 보고되고 있다. 새송이버섯은 이미 항

산화, 항암, 면역조절 기능이 보고된 바 있는데 이 또한 polysaccharides를 바탕으로 이루어진 연구이다 (Liu et al., 2010). 본 실험에서는 SCG의 polyphenol 성분을 새송이 균사체가 상당량 흡수한다는 것을 확인한 만큼 그에 따른 균사체 항산화능 증가가 비례적으로 발생하는지를 분석하였다. DPPH scavenging activity를 측정한 결과 IC₅₀는 무처리의 경우 21.8 mg/ml임에 비해 1%, 2.5%, 5%, 7.5% SCG 처리의 경우 각각 8.7, 8.8, 7.9, 8.5 mg/ml로 측정되었다. 즉, SCG polyphenol의 균사체 내 흡수가 항산화능을 2배 이상 증대시키는 결과를 나타내고 있는데 일정농도 범위의 SCG에서는 유사한 항산화능 증가를 판단할 수 있었다.

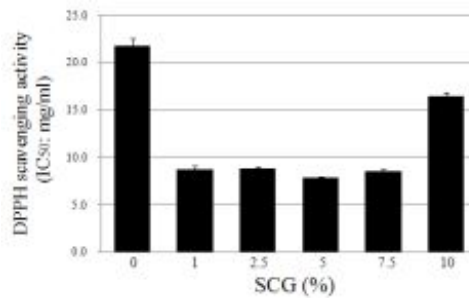


Fig. 264. DPPH scavenging activity of methanolic extracts from *P. eryngii* mycelia cultivated for 8 days in PDB supplemented with SCG.

(2) SCG를 이용한 새송이 병재배에서의 균사체 증식

* 배지 조성

No.1	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 moisture content of 65%		
No.2	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 moisture content of 65% 2.4 % PDB	No.6	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 moisture content of 65% 0.4% Starch /2% Dextrose 0.2% Yeast extract /0.2% Peptone
No.3	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 moisture content of 65% 2.4 % PDB 1% SCG	No.7	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 moisture content of 65% 0.4% Starch / 2% Dextrose 0.2% Yeast extract /0.2% Peptone 1% SCG
No.4	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1	No.8	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1

	moisture content of 65% 2.4 % PDB 2% SCG		moisture content of 65% 0.4% Starch / 2% Dextrose 0.2% Yeast extract 0.2% Peptone 2% SCG
No.5	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 moisture content of 65% 2.4 % PDB 4% SCG	No.9	sawdust and wheat bran at the ratio of 2:1 moisture content of 65% 0.4% Starch /2% Dextrose 0.2% Yeast extract /0.2% Peptone 4% SCG

(가) 균사체 배양 및 생육 측정 결과

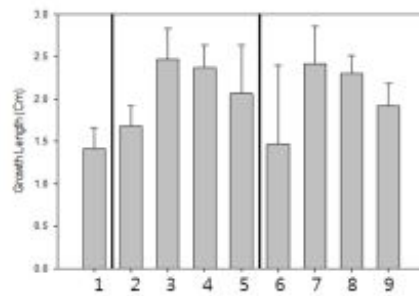
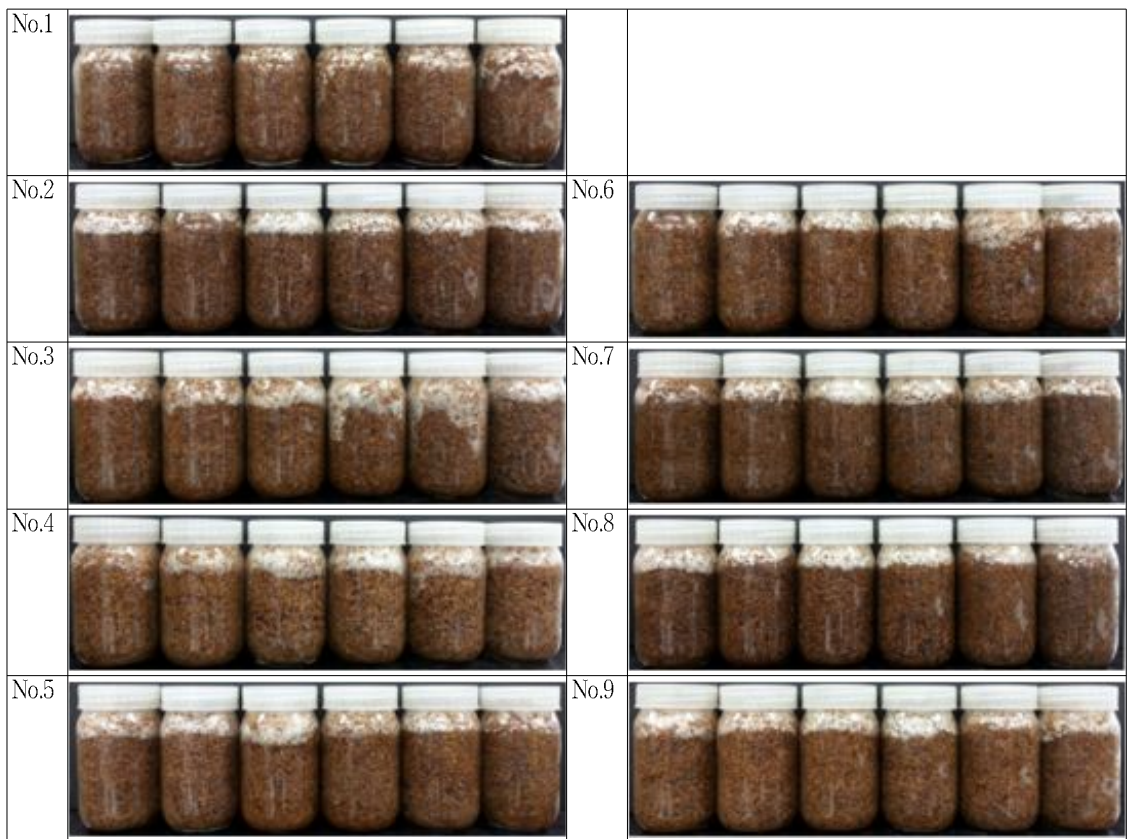


Fig. 265. Mycelia growth in bottle cultivation for 10 days in different media.

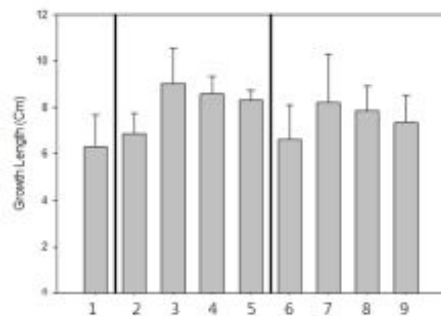
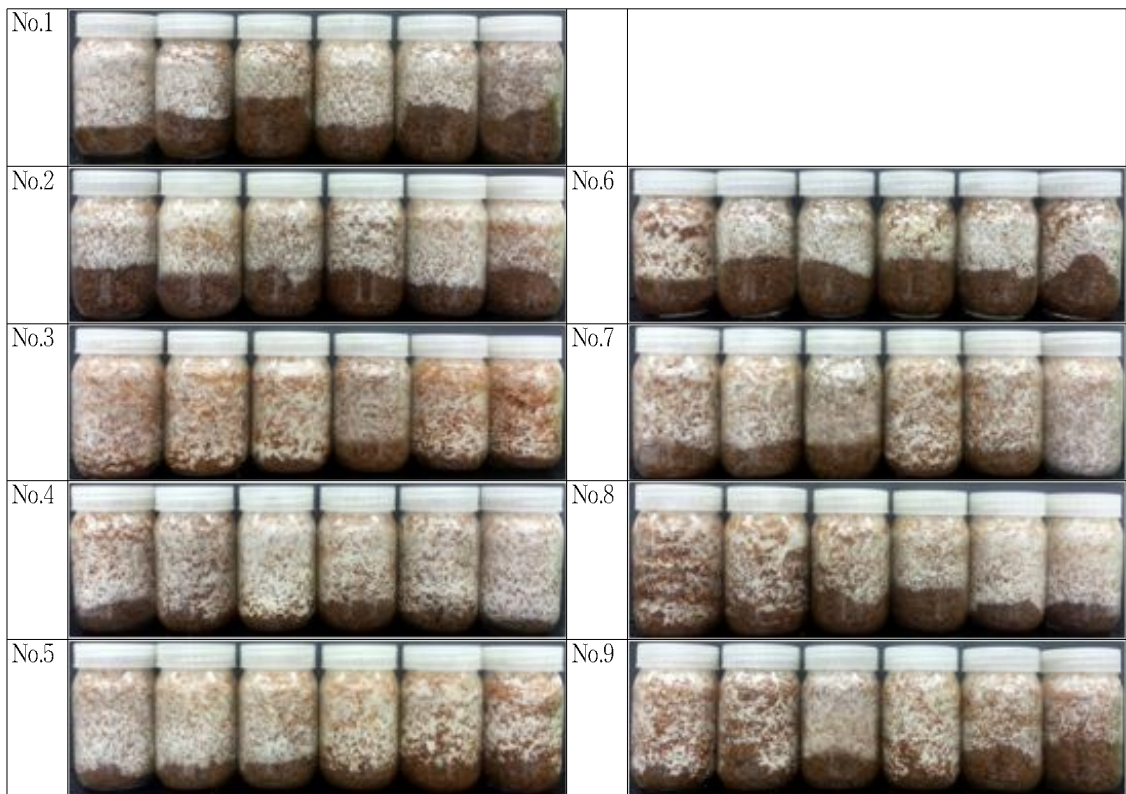


Fig. 266. Mycelium growth in bottle cultivation for 20 days in different media.

Petri dish이용 고체배양, flask 이용 액체배양에서 1% SCG 첨가 시 성장속도가 가장 빠른 것으로 확인된 바 있다. 이를 자실체 생산을 위한 고체 병배양에 적용 시 동일한 결과가 나타남으로써 균사체 생육 촉진을 위한 SCG의 유용성을 재차 확인할 수 있었다.

(3) 기타 성분첨가 배지에서의 세송이 배양

일반적으로 버섯 균사체 배양을 위한 배지는 흔히 potato dextrose broth (PDB) 등이나 기타 tryptic soy broth (TSB) 등 몇몇 상업적 배지를 이용하는 것이 일반적이다. 한편 대량 배양을 위하여서는 값이 저렴한 carbon source (molasses)나 nitrogen

source (soy bean mill, corn steep liquor 등)를 첨가하는 경우가 많다. PDB의 경우 경제적으로 제조하기 위하여 감자 끓인 물에 dextrose를 첨가하여 이용하기도 하는데 실제 세송이 균사체의 배양에 대한 배지의 개발은 별로 알려진 바 없다.

일차적으로 0.5-2% 정도의 SCG를 PDB에 첨가하는 경우 세송이 균사체 생장이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었는데 fungal pellet을 PDA를 포함하는 90 mm petri dish에 접종 시 표면을 완전히 덮을 때까지 20일 이상이 소요되는 것을 SCG 첨가로 며칠 정도 앞당길 수 있다.

(가) 기타 천연물 첨가 및 균사체 생육의 변화

저렴한 천연물 첨가에 의한 균사체 생육을 비교하였다. 이를 위하여 주변에서 수월하게 입수할 수 있는 산죽엽, 겨우살이 건조물을 PDA에 첨가하여 성장속도를 비교하였다. 그림에서와 같이 3개의 fungal disc를 접종한 후 20일 가까운 생육에도 PDA (0% 표시)에서는 배지 표면을 충분히 덮지 않은 상황을 보여주고 있는데 이에 비해 죽엽이나 겨우살이 0.5 - 2% 첨가는 육안으로도 그 생육이 상당히 빨라지는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 이러한 성장촉진 효과는 커피박에 비해 크게 다르지 않음을 알 수 있었다.

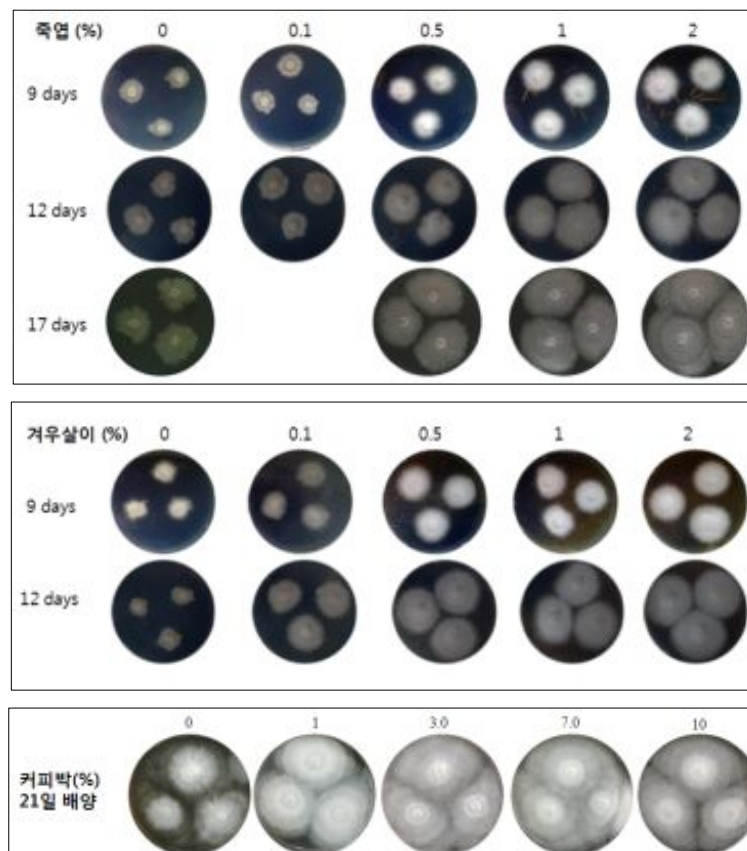


Fig. 267. Growth of *P. eryngii* on PDA supplemented with different biosources.

(나) 당근찌꺼기를 이용한 배지 제조

상기한 천연물 또는 천연부산물물을 PDA에 첨가하여 새송이 균사체를 배양하는 경우 커피박, 겨우살이, 죽엽 모두 배지표면을 완전히 덮을 때까지 20일 가량 소요되는 것으로 관찰되었다. 무처리의 경우 그 때까지도 배지 표면은 균사체로 완전히 덮혀 있지 않은 상태로 관찰되었다. 균사체 배양을 위한 기본 배지로서 흔히 PDA를 이용하고 있으나 새송이의 경우 성장속도가 현저히 느린 관계로 기본 배지의 변화를 통한 균사체 성장속도 증가가 필요 시 되었다.

실험실에서 경제적으로 PDB를 제조할 때 감자 200 g을 썰어서 1 liter의 증류수에 넣어 20분 정도 고압멸균법으로 추출 후 추출액에 증류수를 첨가하여 1 liter로 맞추고 20 g의 dextrose나 설탕을 첨가하여 고압멸균으로 배지를 준비하게 된다. 상업적인 PDB는 1 liter에 24 g을 첨가하면 되지만 가격이 비싼 것이 약점이다.

아래 표는 감자와 당근의 영양성분을 비교한 것이다. 감자나 당근 모두 저렴하게 이용할 수 있는 농산물로서 영양 면에서 감자는 탄수화물 및 단백질이 당근보다 2배 가까이 포함되어 있으며 지질의 경우 당근이 높은 편이다. 당근의 경우 vitamin E와 A 그리고 calcium 및 sodium이 훨씬 더 풍부하게 포함되어 있음을 알 수 있다.

Nutritional value per 100 g		
Ingredients	potato	carrot
Carbohydrates	17.47 g	9.6 g
- Starch	15.44 g	4.7 g
- Dietary fiber	2.2 g	2.8 g
Fat	0.1 g	0.24 g
Protein	2 g	0.93 g
Thiamine(vit. B1)	0.08 mg	0.066 mg
Riboflavin(vit. B2)	0.03 mg	0.058 mg
Niacin(vit. B3)	1.05 mg	0.983 mg
Pantothenic acid(B5)	0.296 mg	0.273 mg
Vitamin B6	0.295 mg	0.138 mg
Folate (vit. B9)	16 µg	19 µg
Vitamin C	19.7 mg	5.9 mg
Vitamin E	0.01 mg	0.66 mg
Vitamin K	1.9 µg	
Vitamin A quiv. beta-carotene		835 µg 8285 µg
luteine & zeaxanthine		256 µg
Calcium	12 mg	33 mg
Iron	0.78 mg	0.3 mg
Magnesium	23 mg	12 mg
Manganese	0.153 mg	0.143 mg
Phosphorus	57 mg	35 mg
Potassium	421 mg	320 mg
Sodium	6 mg	69 mg
Zinc	0.29 mg	0.24 mg
Fluoride		3.2 µg

Table 27. Nutritional value of potato and carrot

감자를 기본으로 하는 PDB 기본배지에 대하여 당근을 기본으로 하는 carrot배지 (Carrot ext)를 제조하여 새송이 균사체의 생장을 비교하였다. Carrot ext제조를 위하여 PDB 배지와 같은 방법을 사용하였다. 즉, 당근 200 g을 채를 썰어 증류수를 첨가하여 1 liter로 맞춘 다음 고압멸균법으로 추출을 실시하고 추출액을 1 liter로 조절하여 Carrot ext를 준비하였다. 다음은 상업적으로 판매하는 PDB와 감자추출액에 dextrose를 첨가하여 만든 배지 (Potato ext Dex 2%)를 당근배지와 비교하여 새송이 균사체 생육을 관찰하였다.

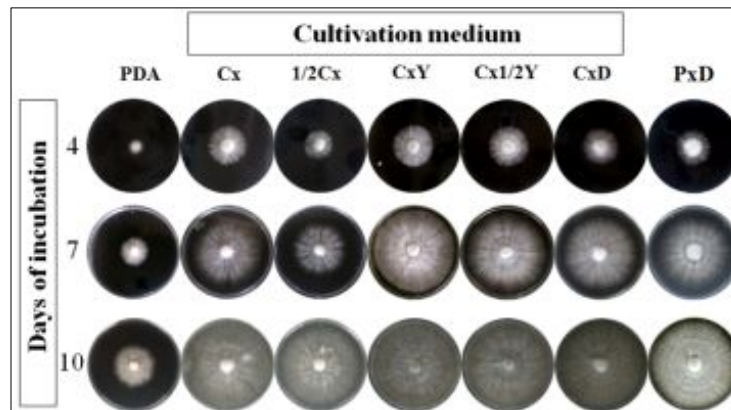


Fig. 268. Cultivation of the mycelia of *P. eryngii* in carrot extract. PDA; commercial. Cx; carrot extract. Y; yeast extract. D; dextrose. Px; potato extract

실험 결과 상업적 배지의 경우 10일째 성장에서도 여전히 배지 표면의 1/6도 덮지 못하였으나 기타 배지에서는 완전히 덮혀 있음을 보여주고 있다. Carrot ext에 yeast extract를 1% 첨가한 배지에서는 배양 7일째의 경우 plate를 거의 덮은 것을 보여주었다. 이로써 당근을 기본으로 yeast ext를 첨가하거나 또는 첨가하지 않는 경우에서도 새송이 균사체의 생장은 상업적 PDA보다 2 배 이상 빨라짐을 보여주었는데 새송이 자실체 재배에서도 이를 충분히 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

당근배지가 다른 종류의 버섯 균사체 생육에서도 유사한 효과를 나타내는지 비교하였으며 다음 그림은 그 결과를 나타내고 있다.

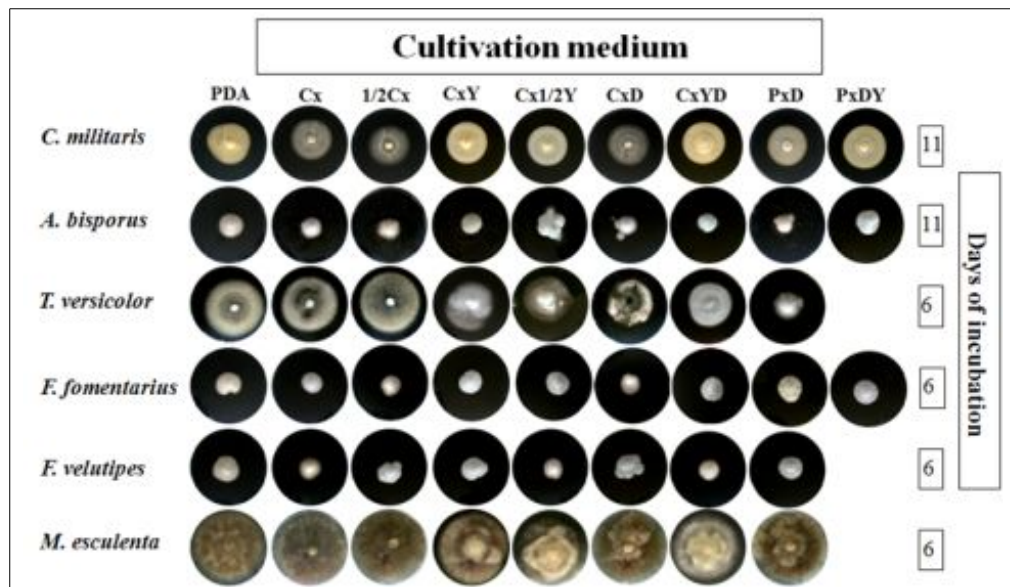
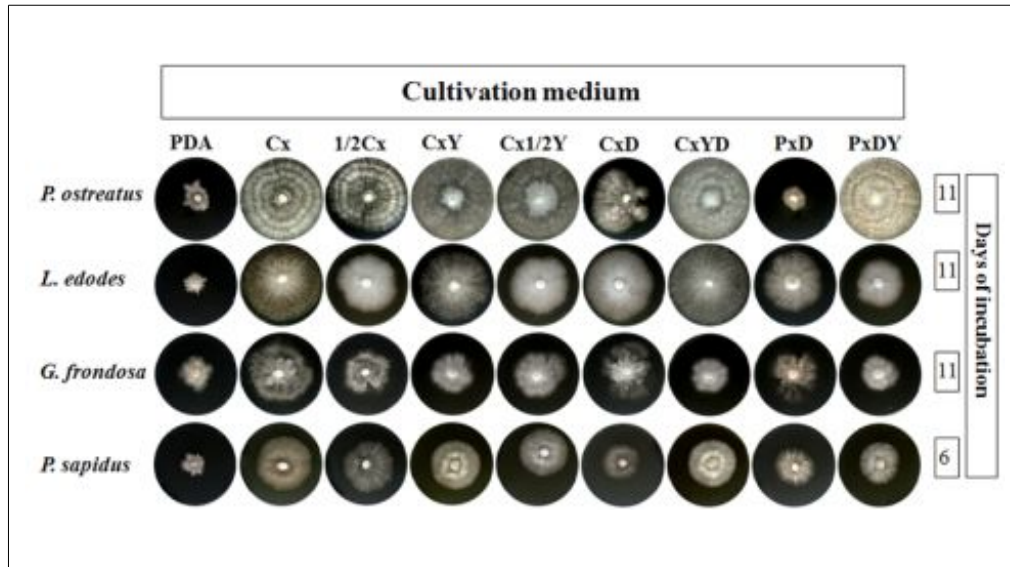


Fig. 269. Cultivation of the mycelia of different mushroom species in carrot extract.

P. ostratus, *L. edodes*, *G. frondosa*, *P. sapidus*의 경우 새송이 균사체 생장의 경우와 유사한 결과를 보여주고 있는데 전반적으로 Cx나 CxY가 PxD보다 생육배지로서의 우수성이 나타났다. 특히, Cx만으로도 PxD보다 효과적인 것으로 나타나고 있다. 한편, *C. militaris*, *A. bisporus* 등 6종 버섯의 균사체 생장은 상업배지, PxD에 비해 큰 차이를 보이지 않고 있다. 결론적으로 볼 때, 새송이 균사체 배양을 위하여 Cx나 PxD 모두 추천할만하며 *Pleurotus* sp.의 경우 Cx가 보다 우수한 것으로 판단된다.

(다) 자실체 배양

새송이버섯은 사물 기생균으로 큰느타리버섯 또는 맛송이버섯 등으로 불린다. 자실체의 발생초기 형태는 눈사람 처럼 대 부분이 타원형이며 갓 부분이 작게 형성된다. 갓은 대 길이에 비하여 작은 편이고 완전 성숙한 상태에서는 갓 표면이 나팔처럼 퍼지고 포자가 많이 비산되는 버섯이다. 일반 느타리버섯에 비해 새송이버섯은 균사생육이 늦고 환경조건에 민감하여 재배하기가 상당히 까다로운 버섯으로 병 재배용으로 재배되고 있다. 재배시설은 현대화 시설로 배지제조, 온도·습도·환기·광 등 여러 가지 환경조건을 인위적으로 조절할 수 있는 환경을 조절할 수 있는 장비가 갖추어져야 한다. 또한 밀폐된 재배사내에서 계속 재배할 수 있는 시설을 갖추어야 한다. 특히 새송이 균사는 일반 느타리버섯의 비하여 균사 활력이 상당히 약하여 오염율이 높으며 재배에 어려운 점이 많이 있다. 재배기간이 짧고 배양병을 구입하여 재배하는 경우 배지 가격이 높아 부가가치가 낮아진다.

* 이미 전문적으로 새송이를 재배하는 농가에서 자실체 생산을 위한 최적 조건이 잘 알려져 있다. 즉, 어린 버섯 발생 시 온도 15~18℃, 실내습도 90~95%, 이산화탄소 농도 500~1,000ppm, 광 100~200 lux로 조절하면 균급기 후 6~8일 정도면 건강한 어린 버섯이 발생을 기대할 수 있다. 이 때 중요한 것은 환기량으로 알려져 있다. 발생된 어린 버섯 중 3~5개 정도가 정상으로 자란다. 자실체 생육단계의 환경조건은 실내온도가 15±2℃, 습도는 80~85%, 이산화탄소 농도 1,000~1,500ppm, 광 조건은 500~1,000lux 정도로 보고되어 있다.

* 새송이 자실체의 생산은 이미 산업적으로 효과적으로 진행되고 있고 배양조건이 잘 확립되어 있는 만큼 본 연구에서는 실험실 조건에서 metal ion 처리 및 당근추출액 처리에 의한 균사체 성장 속도나 자실체 성분 변화를 분석하였다. 기본적으로 미강(쌀겨): 톱밥: 물 1:4:5 비율로 혼합하여 이를 기본 배지로 이용하였다.

① Metal ion 첨가에 의한 자실체 생성 변화

버섯 생육에 있어서 metal ion은 peroxidase, oxidase 등의 활성화에 필수적인데 특히 iron, magnesium, manganese 등이 존재가 매우 중요하다. 그러나 이들 metal ion을 인위적으로 배지에 첨가했을 때 자실체 생산에 미치는 영향은 별로 알려진 바 없다. 본 연구에서는 metal ion을 첨가했을 때 자실체의 생성 변화를 관찰하였다.


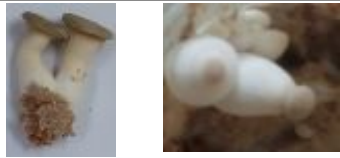

Metal ions (0.001%)	균사체 성장	자실체 출현	병당 자실체 생성	형태
Non	normal	normal	1-2	
Copper	delayed	delayed	1-2	
Iron	normal	normal	3-4	
Zinc	delayed	normal	2-4	
Magnesium	normal	delayed	1-2	
Manganese	normal	normal	1-2	
Calcium	faster	normal	2-4	

Fig. 271. Effect of metal ions on mushroom development.

결론적으로 기본배지에 metal ion의 첨가 (0.001%)는 균사체 성장이나 자실체 형성에 있어서 기본배지를 이용하는 경우에 비해 특별한 효과는 나타나지 않았으며 다만 자실체 발생 개체 수에서의 변화가 일부 나타났다.

② 당근 추출액 첨가에 의한 자실체의 성분변화

이미 당근추출액을 이용한 균사생장 실험에서 균사의 성장속도를 2 배 이상 증가시킬 수 있는 결과를 얻음으로써 병 재배 시 당근추출액을 첨가하는 경우 어린 버섯의 출현시기와 형성된 자실체의 성분변화를 분석하였다. 경제성을 고려하여 50 g/liter의 당근추출액을 물 대신 혼합하여 병배지를 준비하여 균사체 배양을 실시하였다. 결과적으로 1 개월 정도 소요되는 완전 활착기간을 4-7일 정도 단축시킬 수 있었으며 이로부터 발생한 자실체에 대한 영양성분 분석을 실시하였다.

자실체를 homogenize로 분쇄 후 통기 건조 (55°C)시켰으며 이를 carbon, nitrogen, lipid, fiber, ashes (mineral content) 등의 분석에 사용하였다. Organic carbon은 Walkley Black method를 이용하여 결정하였다. Total nitrogen은 Kjeldahl method (digestion, distillation, titration 3 stages)로 결정하였다. 100 g protein에 평균 16% nitrogen 함유를 고려하여 Protein % = N% x 4.38의 공식으로 단백질 함량을 결정하였다. Sugar 함량은 sample을 물에 희석한 후 물방울을 refractometer prism에 얹혀 Brix scale로 관찰하였다. 지질함량은 분쇄된 sample을 Bligh and Dryer method 에 준하여 chloroform/methanol/water solvent로 추출하였으며 g/100 g sample로 표현하였다. Total fiber content는 1.25% NaOH 용액에서 alkaline digestion 후 Weende method로 결정하였다. Ashes content는 모든 organic component를 분해 후 남은 mineral residue를 측정하였는데 1 g sample을 분쇄 후 carbonization, calcination (550°C) 단계를 거쳐 %로 계산하였다. 전체 carbohydrate content는 100 g - (humidity, protein, lipids, ashes)로 결정하였다.

Medium	C	N	soluble soilds	pH
	(%)	(%)	°Brix	
w/o Carrot ext	36.20	4.45	2.36	6.36
w/ Carrot ext	37.45	4.18	2.08	6.22

Medium	Protein	Lipids	Fiber	Ashes	Humidity	Dry mass	Total Carbohydrates	Available Carbohydrates
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
w/o Carrot ext	19.49	1.27	18.17	8.35	10.58	89.42	58.12	42.14
w/ Carrot ext	24.31	1.38	24.22	6.67	11.38	88.62	63.25	32.04

Table 28. Nutritional analysis of mushroom cultivated in carrot extract containing medium

새송이버섯은 단백질 함량이 높고 지질 함량이 낮은 영양적으로 매우 바람직한 중요 식품이다. 즉 fiber, 단백질, 탄수화물 및 유효 탄수화물의 함량이 높기 때문인데 본 연구에서는 carrot ext를 첨가하여 자실체 생산을 이루었을 때 단백질과 fiber함량이 높아지는 경향이 나타남으로써 영양학적으로 보다 우수한 결과를 보여주었다.

나. 색소유전자 cloning 연구

(1) Pigments

식물 색소는 광합성, pollination (수분), 종자전파를 위한 동물 유인의 기능 그리고 자외선이나 가시광선으로부터의 보호기능을 지니는 것으로 이해되고 있다. 식물색소들 중 flavonoid와 carotenoid 계통은 특히 인간에게는 건강증진을 위한 중요한 기능성물질이기도 하다. 따라서 다양한 화학적 구조와 색을 지니는 식물색소에 대하여 생합성, 생합성유전자, 생합성관련 유전자의 과다발현을 통한 transgenic plant에서의 색소 발현 연구가 오래 이루어져 왔다. 식물색소는 chlorophyll, phenylalanine으로부터 유래되는 수용성의 flavonoid계통인 anthocyanin, 지용성의 terpenoid 화합물인 carotenoid, 그리고 tyrosine으로부터 유래하는 질소포함 수용성 호합물인 betalain 등으로 대분할 수 있다. Flavonoids는 phenylpropanoid pathway (Fig. 7)에 의한 2차대사 산물로 연한 노랑부터 파란색까지 다양한데 이들 중 anthocyanin 계통은 오렌지색에서부터 파란색을 지닌다. Betalains은 노랑부터 붉은색을 그리고 carotenoids는 isoprenoid pathway 산물로서 광합성에 필수적이며 노랑부터 붉은 색을 지닌다.

Flavonoids/anthocyanins의 생합성 및 Genetic engineering: Flavonoid/anthocyanin은 인간의 건강증진에 매우 유익한 기능을 지니며 적양배추의 cyanidin acylglucoside는 천연의 식품염료로도 이용되고 있다. Flavonoid는 chalcone, flavone, flavonol 및 anthocyanin으로 분류할 수 있는데 hydroxyl, methyl, glycosyl, acyl group 구조의 첨가에 의하여 수천 종의 화합물을 형성한다. Anthocyanin 주요 종류는 pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin이다. Anthocyanin은 pH, 동존하는 flavone/flavonol co-pigment, metal ion (Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+})의 존재로 색이 변할 수 있지만 기본적으로 위에서와 같은 경로를 거쳐 flavonoid 합성이 이루어진다. 생합성 효소는 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (OGD), cytochromes P450 (P450) 및 glucosyltransferases (GT) family에 속한다. Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) 및 flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)는 dihydrokaempferol (DHK)를 수산화시켜 각각 (2R,3R)-dihydroquercetin과 dihydromyricetin를 생성하는데 anthocyanin구조와 색을 결정하는데 key enzyme으로 작용한다. F3'5'H gene의 도입으로 blue/violet을 나타내는 형질전환 카네이션이나 장미가 보고된 바 있다.

Flavonoid 생합성 경로의 과다발현 또는 유전자 silencing에 의한 색소발현 변화: Phenylpropanoid pathway 조절을 이용한 화색조절 연구가 대부분으로써 chalcone synthase, chalcone isomerase, dihydroflavonol-4-reductase, flavanone hydroxylase, flavonoid-3'-hydroxylase, flavonoid-3', 5'-hydroxylase, dihydroflavonol-4-reductase, anthocyanidin synthase, anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase, aureusidin synthase 유전자를 이용한 과다발현 또는 gene silencing에 의한 색소변화 연구가 보고되어 왔다.

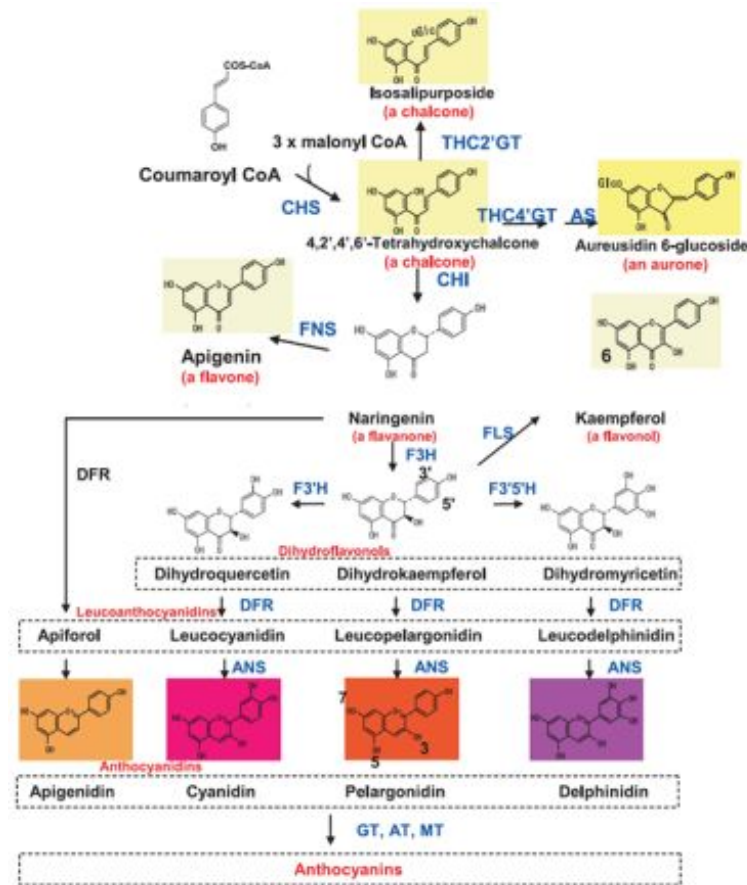


Fig. 272. The biosynthetic pathway leading to the biosynthesis of anthocyanidins. Anthocyanidin is further modified with glycosyl, acyl or methyl groups, catalyzed by glucosyltransferases (GT), acyltransferases (AT) and methyltransferases (MT). Enzymes and flavonoid classes are indicated by blue and red letters, respectively. The typical colors of compounds are also shown, but the actual color depends on various factors. CHS, chalcone synthase; THC2'GT, UDPglucose:tetrahydroxychalcone 2'GT; CHI, chalcone isomerase; THC4'GT, UDP-glucose:tetrahydroxychalcone 4'GT; AS, aureusidin synthase; F3H, flavanone 3-hydroxylase.

(2) Transcription factor에 의한 색소 생합성관련 유전자발현 조절 및 genetic engineering

Anthocyanin 생합성 유전자발현은 R2R3 Myb, basic helix - loop - helix (bHLH) 및 WD40-type transcriptional factors에 영향을 받는 것으로 밝혀진 바 있는데 옥수수, Arabidopsis, 페튜니아, 나팔꽃 등에서 연구가 이루어졌다. WD40와 bHLH는 특정 MYB proteins (PH4, GL1/Wer 등)에 영향을 미치는데 옥수수 R 단백질의 bHLH는 EMSY-like maize nuclear factor가 flavonoid 생합성유전자 promoter로 유도되도록 하여 histone acetylation 결과를 보인다. R2R3 Myb은 floral pigmentation 조절 (anthocyanin pigmentation) 역할을 보인다.

화색소 생합성을 위한 조절유전자의 이용: 식물세포에서의 anthocyanins 및 flavonoids의 최종농도는 flavonoid 생합성 경로에 직접 관여하는 효소 발현수준에 의

하여 영향을 받음은 물론 flavonoid 생합성 유전자의 전사를 조절하는 조절유전자 발현 수준에 의하여서도 커다란 영향을 받는 것으로 나타났다. 이들 특정 transcription factor는 DNA binding protein으로서 promoter 인식과 밀접한 관계를 보인다.

Flavonoid 생합성 관련 조절 유전자는 2 종류로 분류할 수 있는데 MYB transcription factors 및 basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors로서 이들은 특히 조직 특이적 색소발현과 관련이 있다. 기타 WD40 proteins의 경우 그 기작에 대하여서는 불분명하지만 flavonoid 생합성 유전자의 발현조절에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 전사조절인자의 효율은 여러 parameter에 의하여 영향을 받는데 flavonoid 생합성유전자 promoter에 대한 전사인자의 binding affinity, 기존 전사인자와의 협력관계 그리고 기존 전사인자의 기능성 등이 보고된 바 있다.

비교적 잘 연구된 조절유전자는 R gene family에 속하는 maize leaf colour (Lc) gene과 MYB-type transcription factor에 속하는 maize colorless (C1) gene이다. R genes (R, Sn, B, Lc) product는 bHLH motif를 지니며 따라서 이들은 bHLH-type transcription factors로 분리하고 있다. CaMV 35S promoter/maize Lc gene 형질전환으로 tobacco와 Arabidopsis에서 anthocyanins 생산증가 보고된 바 있다. Maize MYB-type gene C1과 Lc gene을 같이 도입하는 경우에도 같은 결과가 나타났다. Lc gene 도입은 anthocyanin을 전혀 합성하지 않는 토마토 잎에서도 그 결과가 나타났으며 페추니아에서도 유사결과를 보인 바 있다. 그러나 장미나 카네이션의 경우 그 효과가 없었으며 anthocyanin 감소로까지 나타난 경우도 있다.

(3) Carotenoids 생합성 및 Genetic Engineering

Carotenoid는 isoprenoid compounds (대부분 C40)로서 자연에서 700 종류 이상이 밝혀졌다. Carotenoid는 광보호 및 광합성에서 주요 기능을 지니는데 사람의 영양과 건강 측면에서 provitamin A를 제공하고 항암효능을 지닌다. 또한 식품염료, 화장품 또는 의약품 원료로 이용된다.

당근과 고구마 뿌리에는 고농도의 b-carotene이 포함되어 있는데 vitamin A의 중요한 공급원이다. Sandersonia (Sandersonia aurantiaca)의 꽃잎에 있는 carotenoid는 b,b-carotenoids (b-cryptoxanthin, zeaxanthin)과 b-carotene이며 marigold나 국화의 꽃잎에는 lutein 및 그 유도물질을 주로 포함한다. 대부분 식물의 주 carotenoid는 yellow 계통의 xanthophyll이다.

한편, ketocarotenoid인 astaxanthin은 세균, 곰팡이 조류에 포함된 orange-red 계통의 carotenoid이다. 화합물이다. 이는 극히 일부의 식물 (Adonis aestivalis, A. annuicolor)에서도 존재한다.

물에서는 엽록소에 포함된 isopentenyl pyrophosphate (IPP): C5가 carotenoid 생합성 개시를 위한 최초 물질로 이용된다. 4개의 IPP는 축합하여 C20의

geranylgeranylpyrophosphate (GGPP)가 형성되며 2 GGPP는 phytoene synthase (PSY)에 의하여 C40 carotenoid인 phytoene을 형성한다 (Fig. 11).

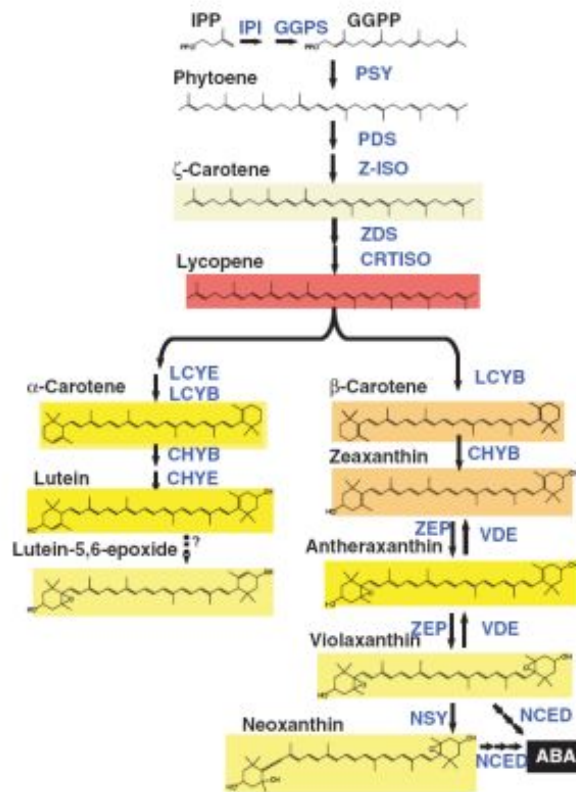


Fig. 273. Carotenoid biosynthetic pathway DXPS, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; IPI, isopentenyl pyrophosphate isomerase; GGDP, geranylgeranyl diphosphate synthase; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; ZDS, f-carotene desaturase; LCYB, lycopene b-cyclase; LCYE, lycopene-cyclase; CHYB, b-ring hydroxylase; CHYE, b-ring hydroxylase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; VDE, violaxanthin de-epoxidase; CRTISO, carotenoid isomerase; NSY, neoxanthin synthase; NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase.

토마토에는 Psy-1와 Psy-2가 기관 특이적 발현을 보이는데 Psy-1은 열매와 꽃에서의 chromoplast 내 carotenoid 합성에 그리고 Psy-2는 잎의 chloroplast에서의 carotenoid 생성에 기여한다. Phytoene 생합성 후 conjugated double bonds는 phytoene desaturase (PDS) 및 f-carotene desaturase (ZDS)의하여 생성되는데 5, 7, 9 및 11 conjugated double bonds를 지닌 phytofluene, f-carotene, neurosporene 및 lycopene을 각각 생성한다. Conjugated double bonds가 증가할수록 무색 phytoene 및 phytofluene으로부터 pale-yellow f-carotene, orange-yellow neurosporene 및 red lycopene이 형성된다. Carotenoid isomerase (CRTISO)는 all-trans-lycopene 생성 역할을 지닌다.

Carotenoid 생합성은 transcriptional level에 의하여 주로 조절되는 것으로 이해가

되는데 PSY 및 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase up-regulation으로 pale-yellow로부터 orange 색의 carotenoid 축적이 하나의 예이다. hp1 and hp2 (고농도 carotenoid 축적의 변이체)의 경우 UV-Damaged DNA-binding protein 1 (DDB1) 및 Detiolated 1 (DET1)이 밝혀졌다. Light-signaling components인 HY5 및 COP1은 토마토 과실에서 carotenoid level을 낮추는 것으로, Mimulus species의 QTL은 carotenoids 유무를 결정하는 인자로 보고된 바 있다. 한편, carotenoid의 축적은 생합성 활동에 정비례하지 않는데 그 이유는 현재 불분명하다. Psy 형질전환은 tobacco의 경우 과다발현 시 dwarfism을 초래하며 백색 꽃을 초래한다. Canola (*Brassica napus*)의 경우에는 Erwinia uredovora의 psy 과다발현은 종자에서의 총 carotenoids 양 증가가 나타난다. Psy gene 단독, bacterial psy gene + bacterial GGDP synthase (또는 crtI 또는 β -lyc)의 두개, bacterial psy + crtI + β -lyc의 세 개 유전자 도입 시 carola 종자에서의 총 carotenoid 생성량이 증가하는 것으로 나타났다. 감자에서 *E. uredovora*의 PSY를 과다 발현시키는 경우에서도 총 carotenoids 생성이 증가하는 것으로 나타났다. *Arabidopsis* β -lyc gene의 tomato에서 과다발현 시 β -carotene content 증가가 나타났다. 가장 잘 알려진 연구는 "Golden Rice"연구인데 daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*)의 psy와 *E. uredovora* crtI이 도입된 형질전환 벼로서 노란색을 지니며 β -carotene (provitamin A) 및 xanthophylls 축적의 결과이다. Maize psy와 *E. uredovora* crtI를 도입할 경우 carotenoids 양이 23배 증가하는 것으로 나타났다.

Target plant or tissue	Strategy	Phenotypes
Canola seed	<i>CrtB, l, Y</i> overexpression	Beta-, α -carotene accumulation
Potato plant, tuber	<i>CrtO</i> overexpression	Ketocarotenoid accumulation in leaves, tubers
Potato tuber	<i>CrtB, l, Y</i> overexpression	Beta-, α -carotene accumulation
Potato tuber	<i>DXS</i> overexpression	Enhanced zeatin levels, early sprouting
Potato tuber	<i>ZEP</i> silencing	Zeaxanthin accumulation
Potato tuber	<i>LCY-e</i> silencing	Enhanced β -carotene, total carotenoids
Potato tuber	<i>CHY</i> silencing	Enhanced β -carotene
Potato tuber	<i>Or</i> overexpression	Beta-carotene, total carotenoid accumulation
Rice seed	<i>PSY, CrtI</i> overexpression	Beta-carotene, zeaxanthin accumulation
Lotus japonicus flower	<i>CrtW</i> overexpression	Ketocarotenoid accumulation
Tomato plant	<i>PSY</i> overexpression	Gibberellin depletion, dwarfism
Tomato plant	<i>CHRD</i> silencing	Decreased flower carotenoids, decreased photosynthetic electron flow
Tomato plant	<i>DXS</i> overexpression	Enhanced fruit carotenoids
Tomato plant	<i>CRY2</i> overexpression	Enhanced carotenoids, flavonoids
Tomato plant, fruit	<i>DET1, DDB1, COP1-like</i> silencing	Enhanced carotenoids, flavonoids
Tomato fruit	<i>CrtB</i> overexpression	Enhanced lycopene
Tomato fruit	<i>FIBRILLIN</i> overexpression	Enhanced carotenoids, carotenoid-derived volatiles, delayed thylakoid loss
Tomato fruit	<i>LCY-b B</i> silencing	Enhanced lycopene
Tomato fruit	<i>CrtI</i> overexpression	Beta-carotene accumulation
Tomato fruit	<i>LCY-b, CHY</i> overexpression	Beta-carotene, zeaxanthin accumulation
Tomato fruit	<i>CrtY</i> overexpression in plastids	Beta-carotene accumulation
Tobacco, tomato plant	<i>CrtZ, W</i> polyprotein overexpression	Ketocarotenoid accumulation in leaves and nectary (flower)
Tobacco plant, flower	<i>CrtO</i> overexpression	Ketocarotenoid accumulation in leaves, nectary, petals
Tobacco leaf	CaCCS virus-mediated overexpression	Capsanthin accumulation
Carrot plant	<i>CrtO</i> overexpression	Ketocarotenoid accumulation in leaves, roots
Arabidopsis plant	<i>LCY-e</i> overexpression	Enhanced leaf lutein, enhanced NPQ
Arabidopsis plant	<i>CrtZ, CHY</i> overexpression	Enhanced leaf β -xanthophyll pool, resistance to UV and to temperature + light stress
Arabidopsis plant	<i>HDR</i> overexpression	Enhanced leaf carotenoids, seed dormancy
Arabidopsis seed	<i>CrtO</i> overexpression	Ketocarotenoid accumulation

Table 29. Carotenoid metabolic engineering in plants

Betalain은 적순무에 풍부한 색소로서 천연염료로서 이용되고 있다. Anthocyanin보다 안정성이 뛰어난데 그 생합성과 관련된 효소 및 유전자 규명은 진행 중이다. 따라서 engineering에 의한 색소 생성 및 증대는 연구대상에 있다.

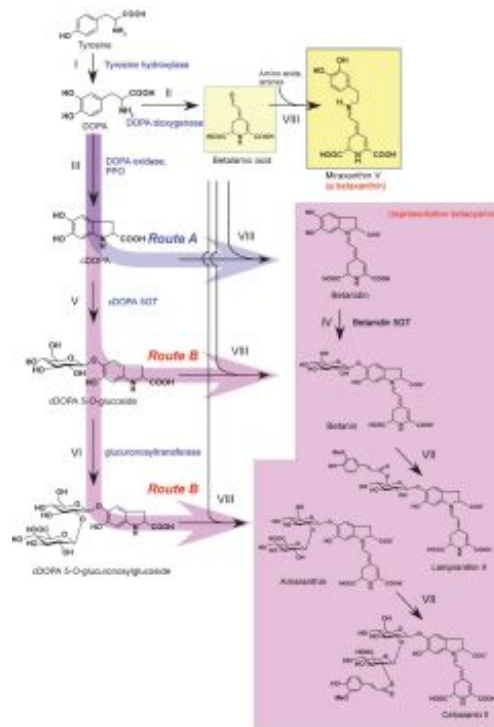


Fig. 274. Biosynthetic pathway for betalain pigment DOPA formation is catalyzed by tyrosine hydroxylase (enzyme I). Betalamic acid formation by DOPA 4,5-dioxygenase (DOD; enzyme II), cDOPA formation by plant PPO or DOPA oxidase (enzyme III), conjugation of betalamic acid and amino acid, amine or cDOPA by enzyme VIII, and modification with sugar molecules and aliphatic or aromatic compounds by enzymes IV - -VII.

(4) 색소 생합성관련 유전자 cloning

(가) Cloning

색소 생합성관련 유전자의 cloning을 위하여 phenylpropanoid pathway를 통한 anthocyanin합성에서의 transcription factor인 Myb을 포도, 석류, 오디(뽕), 복분자로 부터, carotenoid 생합성관련 β -C-4 Oxygenase (β -caroten ketolase)를 녹조류인 *Haematococcus pluvialis* 그리고 PAC의 cloning을 시도하였다.

(나) PAC gene for carotenoid biosynthesis

두 종류의 carotenoid biosynthetic gene인 *Capsicum*으로부터의 phytoene synthase (Psy) 및 *Pantoea*로부터의 caroten desaturase (CrtI)을 지니는 PAC gene construct를 농진청으로부터 입수하였다. 이는 golden rice 제조에 이용되었던 gene construct이다.

이를 새송이버섯으로 도입을 위하여 cloning을 실시하였으며 (Fig. 13) 다음의 E. coli transformant를 얻은 후 PAC삽입을 restriction mapping 및 PCR (Fig. 14) 그리고 sequencing으로 확인하였다.

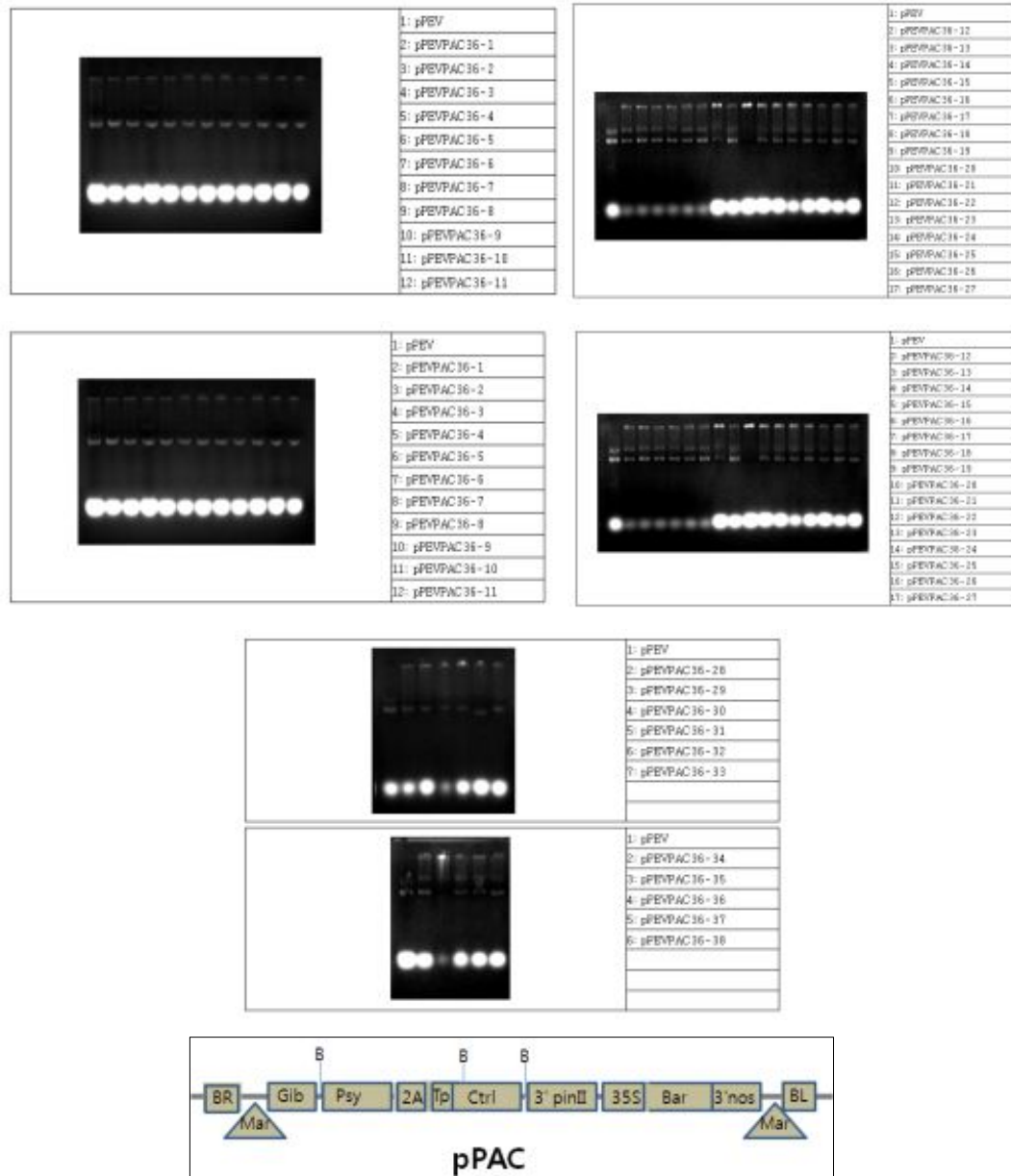


Fig. 275. Cloning of PAC into pPEV vector Gib: rice endosperm-specific globulin promoter. 3' pinII: 3' region of the potato proteinase inhibitor II gene. Mar: 5'-matrix attachment region from the chicken lysozyme gene. BR & BL: border region. 35S: CaMV35S promoter. BAR: bialaphos resistance gene

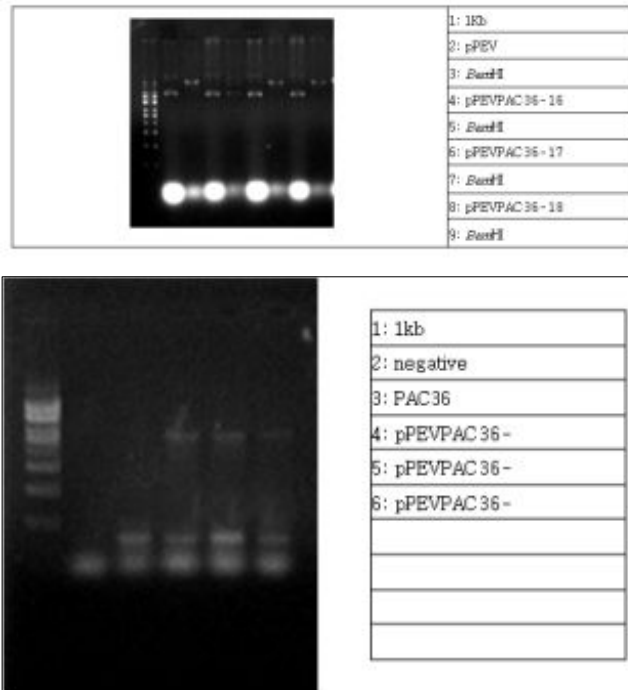


Fig. 276. Identification of pPEVPAC by restriction and PCR analysis

* DNA sequencing에 의한 pPEVPAC gene 확인

PAC-F

Noname, 33 bp annealing with $T_m =$, Forward primer, 33 mer
GGGG GAATTC ATG TCT GTT GCC TTG TTA TGG GT

PAC-R

Noname, 33 bp annealing with $T_m =$, Reverse primer, 33 mer
CCCC CTCGAG TCA AAT CAG ATC CTC CAG CAT CA

Translation Map

```

M S V A L L W V V S P C D V S N G T G F      20
ATGTCGTTGCCTTGTATGGGTTGTTTCTCCTTGACGTCTCAAACGGGACAGGATTC  60
L V S V R E G N R I F D S S G R R N L A      40
TTGGTATCCGTTCTGAGGAAACCGGATTTTGATTCTGTCGGGCGTAGGAATTTGGCG  120
C N E R I K R G G G K Q R W S F G S Y L      60
TGCAATGAGAGAATCAAGAGAGGAGGTGAAAACAAGGTGGAGTTTGGTTCTTACTTG  180
G G A Q T G S G R K F S V R S A I V A T      80
GGAGGAGCACAACTGGAAGTGGACGAAATTTTCTGTACGTTCTGCTATCGTGGCTACT  240
P A G E M T M S S E R M V Y D V V L R Q      100
CCGGCTGGAGAAATGACGATGCATCAGAACGGATGGTATATGATGGTTTTGAGGCAG  300
A A L V K R Q L R S T D E L D V K K D I      120
GCAGCCTTGGTGAAGAGACAGCTGAGATCGACCGATGAGTTAGATGTGAAGAAGGATATA  360
P I P G T L G L L S E A Y D R C S E V C      140

```

CCTATTCCGGGACTTTGGGCTTGTGAGTGAAGCATATGATAGGTGTAGTGAAGTATGT 420
 A E Y A K T F Y L G T M L M T P E R R K 160
 GCAGAGTACGCAAAGACGTTTTACTTAGGAACGATGCTAATGACTCCGGAGAGAAGAAAG 480
 A I W A I Y V W C R R T D E L V D G P N 180
 GCTATCTGGGCAATATACGTATGGTGCAGGAGAACAGACGAACTTGTGATGGTCCGAAT 540
 A S H I T P A A L D R W E D R L E D V F 200
 GCATCACACATTACTCCGGCGCCTTAGATAGGTGGGAAGACAGGCTAGAAGATGTTTTC 600
 S G R P F D M L D A A L S D T V S K F P 220
 AGTGGACGGCCATTGACATGCTCGATGCTGCTTGTCCGACACAGTTCCAAATTCCA 660
 V D I Q P F R D M I E G M R M D L R K S 240
 GTTGATATTCAGCCATTAGAGATATGATTGAAGGAATGCGTATGGACTGAGGAAGTCA 720
 R Y R N F D E L Y L Y C Y Y V A G T V G 260
 AGATACAGAAACTTTGACGAACTATACCTATATTGTTATTACGTTGCTGGTACGGTGGG 780
 L M S V P I M G I A P E S K A T T E S V 280
 TTGATGAGTGTCCAATTATGGGCATCGCACCTGAATCAAAGGCAACAACGGAGAGCGTA 840
 Y N A A L A L G I A N Q L T N I L R D V 300
 TATAATGCTGCTTTGGCTTTGGGGATCGCAAATCAGCTGACCAACATACTTAGAGATGTT 900
 G E D A R R G R V Y L P Q D E L A Q A G 320
 GGAGAAGATGCCAGAAGAGGAAGAGTCTATTTGCCTCAAGATGAATTAGCACAGGCAGGT 960
 L S D E D I F A G R V T D K W R I F M K 340
 CTATCCGACGAAGACATATTTGCTGGAAGAGTGACCGATAAATGGAGAATCTTCATGAAG 1020
 K Q I Q R A R K F F D E A E K G V T E L 360
 AAACAAATTCAGAGGCAAGAAAGTTCTTTGACGAGGCAGAGAAAGGAGTGACCGAATTG 1080
 S A A S R W P V L A S L L L Y R R I L D 380
 AGCGCAGCTAGTAGATGGCCTGTGTTGGCATCTCTGCTGTTGTACCAGGATACTGGAC 1140
 E I E A N D Y N N F T K R A Y V S K P K 400
 GAGATCGAAGCCAACTACTACAACAACTTCACAAAGAGAGCTTATGTGAGCAAACCAAAG 1200
 K L I A L P I A Y A K S L V P S T R T L 420
 AAGTTGATTGACATTACCTATTGCATATGCAAAATCTCTTGTGCCTTCTACAAGAACAActg 1260
 Q L L N F D L L K L A G D V E S N D G P 440
 cagCTCCTCAACTTCGACCTCCTCAAGCTCGCCGGCAGCTCGAGAGCAACGACGGccccg 1320
 G M A P S V M A S S A T T V A P F Q G L 460
 ggcATGGCCCCCTCCGTGATGGCGTTCGTCGGCCACCACCGTCGCTCCCTTCCAGGGGCTC 1380
 K S T A G M P V A R R S G N S S F G N V 480
 AAGTCCACCGCCGATGCCGTCGCCCGCCGCTCCGGCAACTCCAGCTTCGGCAACGTC 1440
 S N G G R I R C M Q A M E P T T V I G A 500
 AGCAATGGCGGAGGATCAGGTGCATGCAGGccatggAACCAACTACGGTAATGGTGCA 1500
 G F G G L A L A I R L Q A A G I P V L L 520
 GGCTTCGGTGGCCTGGCAATTCGTCTACAAGCTCGGGGATCCCCGTCTTACTG 1560
 L E Q R D K P G G R A Y V Y E D Q G F T 540
 CTTGAACAACGTGATAAACCCGGCGTTCGGGCTTATGTCTACGAGGATCAGGGTTTACC 1620
 F D A G P T V I T D P S A I E E L F A L 560
 TTTGATGCAGGCCGACGGTTATCACCAGTCCAGTGCCATTGAAGAAGTGTTCGACTG 1680
 A G K Q L K E Y V E L L P V T P F Y R L 580
 GCAGGAAAACAGTTAAAGAGTATGTCGAACGTGCTGCCGGTTACGCCGTTTTACCGCCTG 1740
 C W E S G K V F N Y D N D Q T R L E A Q 600
 TGTTGGGAGTCAGGGAAGTCTTTAATTACGATAACGATCAAACCCGGCTCGAAGCGCAG 1800
 I Q Q F N P R D V E G Y R Q F L D Y S R 620
 ATTCAGCAGTTAATCCCGCATGTCGAAGGTTATCGTCAGTTTCTGGACTATTCACGC 1860
 A V F K E G Y L K L G T V P F L S F R D 640
 GCGGTGTTAAAGAAGGCTATCTAAAGCTCGTACTGTCCCTTTTTATCGTTCAGAGAC 1920
 M L R A A P Q L A K L Q A W R S V Y S K 660
 ATGCTTCGCGCCACCTCAACTGGCGAAACTGCAGGCATGGAGAAGCGTTTACAGTAAG 1980
 V A S Y I E D E H L R Q A F S F H S L L 680

GTTGCCAGTTACATCGAAGATGAACATCTGCGCCAGGCGTTTTCTTCCACTCGCTGTTG 2040
 V G G N P F A T S S I Y T L I H A L E R 700
 GTGGGCGCAATCCCTTCGCCACCTCATCCATTTATACGTTGATACACGCGCTGGAGCGT 2100
 E W G V W F P R G G T G A L V Q G M I K 720
 GAGTGGGGCGTCTGGTTTCCGCGTGGCGGCACCGGCGCATTAGTTCAGGGGATGATAAAG 2160
 L F Q D L G G E V V L N A R V S H M E T 740
 CTGTTTCAGGATCTGGGTGGCGAAGTCGTGTTAAACGCCAGAGTCAGCCATATGGAAACG 2220
 T G N K I E A V H L E D G R R F L T Q A 760
 ACAGGAAACAAGATTGAAGCCGTGCATTTAGAGGACGGTTCGAGGTTCTCGACGCAAGCC 2280
 V A S N A D V V H T Y R D L L S Q H P A 780
 GTCGCGTCAAATGCAGATGTGGTTCATACCTATCGCGACCTGTTAAGCCAGCACCTGCC 2340
 A V K Q S N K L Q T K R M S N S L F V L 800
 GCGGTTAAGCAGTCCAACTGCAGACTAAGCGCATGAGTAACTCTCTGTTTGTGCTC 2400
 Y F G L N H H H D Q L A H H T V C F G P 820
 TATTTTGGTTTGAATCACCATCATGATCAGCTCGCGCATCACCGTTTGTTCGGCCCG 2460
 R Y R E L I D E I F N H D G L A E D F S 840
 CGTTACCGCGAGCTGATTGACGAAATTTTAAATCATGATGGCCTCGCAGAGGACTTCTCA 2520
 L Y L H A P C V T D S S L A P E G C G S 860
 CTTTATCTGCACGCGCCTGTGTACGGATTCTGACTGGCGCCTGAAGGTTGCGGCAGT 2580
 Y Y V L A P V P H L G T A N L D W T V E 880
 TACTATGTGTTGGCGCGGTGCCGCAATTTAGGCACCGCAACCTCGACTGGACGGTTGAG 2640
 G P K L R D R I F A Y L E Q H Y M P G L 900
 GGGCCAAAACCTACGCGACCGTATTTTTCGCTACCTTGAGCAGCATTACATGCCTGGCTTA 2700
 R S Q L V T H R M F T P F D F R D Q L N 920
 CGGAGTCAGTGGTACGACCGGATGTTACGCGGTTGATTTTCGCGACCAGCTTAAT 2760
 A Y H G S A F S V E P V L T Q S A W F R 940
 GCCTATCATGGCTCAGCCTTTCTGTGGAGCCGTTCTTACCCAGAGCGCCTGGTTCCGG 2820
 P H N R D K T I T N L Y L V G A G T H P 960
 CCGCATAACCGGATAAAAACCTACTAATCTCTACCTGGTCCGGCGCAGGCACGCATCCC 2880
 G A G I P G V I G S A K A T A G L M L E 980
 GCGCAGGCATTCTGGCGTCATCGGCTCGGCAAAGCGACAGCAGGTTTGTGCTGGAG 2940
 D L I * 983
 GATCTGATTGA 2952

(다) *Haematococcus pluvialis*로부터의 β -C-4 Oxygenase (crtO) RT-PCR cloning

녹조류인 *Haematococcus pluvialis*는 stress condition에서 ketocartenoid astaxanthin을 축적하는 것으로 밝혀져 있다. Astaxanthin은 red cartenoid pigment로서 항산화능을 지닌다. *H. pluvialis*의 β -C-4 Oxygenase는 β -carotene을 canthaxanthin으로 전환시키는 기능을 지닌다. *E. coli*에 crtO를 도입 시 갈색의 canthaxanthin이 생산되며 β -carotene hydroxylase를 지니는 cyanobacterium *Synechococcus PCC7942*에 도입 시 asthaxanthin이 축적되는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 crtO를 세송이 균사체에 도입하고자 다음과 같은 cloning을 시도하였다.

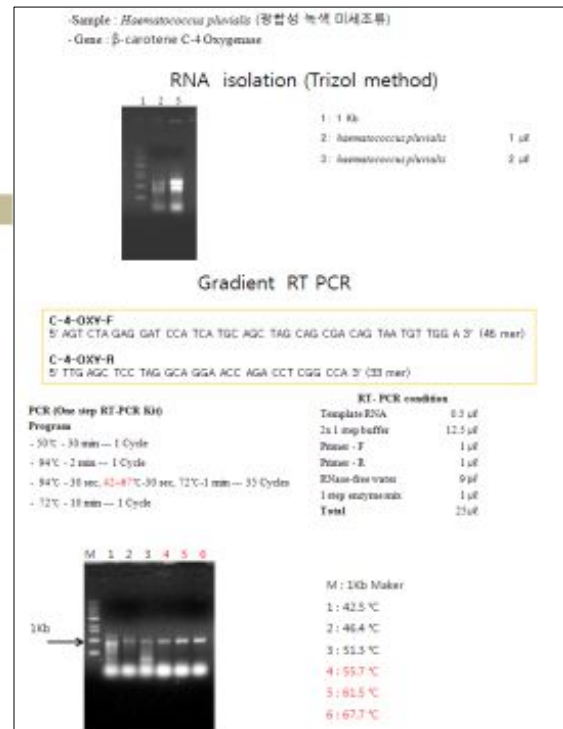
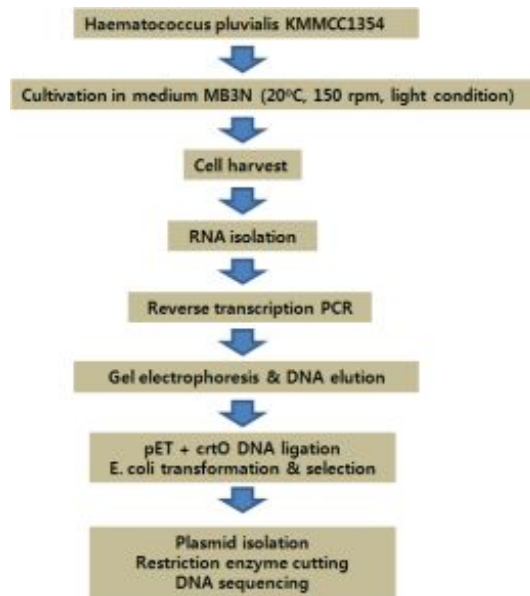


Fig. 277. RNA isolation and RT-PCR

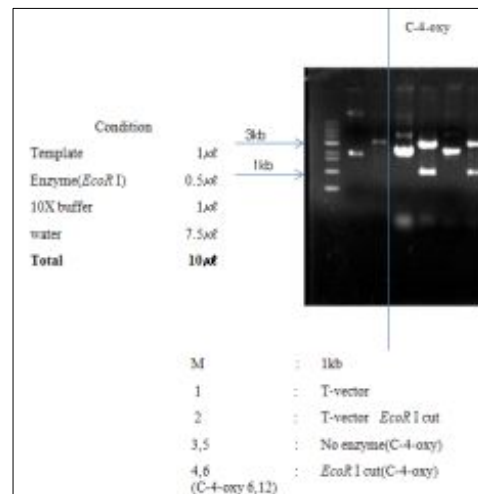


Fig. 278. Identification of crtO clone by restriction enzyme

* DNA sequencing에 의한 crtO 확인

clone 1: c-4-oxygenase(CrtO)(1015bp,329aa)

```

AGTCTAGAGGATCCATCATG CAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTACCGGAA 60
      M Q L A A T V M L E Q L T G S
GCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGTTGCAGGCAGCTCTGACGTGTTGCGTA 120
A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T
CATGGCGACCCAGTACTCGTTCGGTCAGAAGAGTCAGACGGCCCGCCGGGACTGA 180
W A T Q Y S L P S E E S D A A R P G L K
  
```

AGAATGCCTACAAGCCACCACCTTCCGACACAAAGGGCATCACGATGGCGCTAGCTGTCA 240
 N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I
 TCGGCTCTGGGCCGAGTGTCTCCACGCCATTTTCAAATCAAGCTTCCGACCTCCT 300
 G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L
 TGGACCAGCTGCACTGGCTGCCGTGTCAGATGCCACAGCTCAGTTGGTTGGCGGTAGCA 360
 D Q L H W L P V S D A T A Q L V G G S S
 GCAGTCTGATGCACATCGTCGTCGTATTCTTTGTCTGGAGTTCTGTACACAGGCCTTT 420
 S L M H I V V V F F V L E F L Y T G L F
 TTATCACCACGCATGATGCTATGCATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTGAATG 480
 I T T H D A M H G T I A M R N R Q L N D
 ACTTCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTGTACGCCTGGTTTGATTACAACATGCTGCACC 540
 F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R
 GCAAGCATTGGGAGCACCACAATCACACTGGTGGAGTGGGCAAGGACCCTGACTTCCACA 600
 K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R
 GGGGAAACCCCGCATGTGCCCTGGTTTGGCAGCTTTCATGCCAGCTACATGTCGATGT 660
 G N P G I V P W F A S F M S S Y M S M W
 GGCAGTTTGGCGCCTCGCATGGTGGACGGTGGTCTGCAGCTGCTGGGTGCGCCGATGGC 720
 Q F A R L A W W T V V C S C W V R R W R
 GAACCTGCTGGTGTTCATGGACGGCCGCGCCATCCTGTCCGCCTTCCGCTTGTCTACT 780
 T C W C S W T A A P I L S A F R L F Y F
 TTGGCAGCTACATGCCCCAAGCCTGAGCCTAGCGCTGCGTACAGGCTCCCCACCAATCG 840
 G T Y M P H K P E P S A A S G S P P I V
 TCATGAACTGGTGAAGTCGCGCACTAGCCAGGCTCCGACCTGGTACGCTTCTGACCT 900
 M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C
 GCTACCACTTGCACCTGCATGGGAGCACCACCGCTGGCCCTTCGCCCCCTGGTGGGAGC 960
 Y H F D L H W E H H R W P F A P W W E L
 TGCCAACTGCCCGCTGTCTTGGCCGAGTCTGGTTCTTCCAGGCTCAA 1015
 P N C R R L S G R G L V P A *

AGTCTAGAGGATCCATCATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGA
AGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGTTGCAGCAGCTCTGACGTGTTGCG
TACATGGGCGACCCAGTACTCGCTTCCGTCAGAAGAGTCAGACGCGCCCGCCGGGAC
TGAAGAATGCCTACAAGCCACCACCTCCGACACAAAGGGCATCACGATGGCGCTAGCT
GTCATCGGCTCTTGGGCCGAGTGTCTCCACGCCATTTTCAAATCAAGCTTCCGAC
CTCCTTGGACCAGCTGCACTGGCTGCCGTGTCAGATGCCACAGCTCAGTTGGTTGGCG
GTAGCAGCAGTCTGATGCACATCGTCGTCGTATTCTTTGTCTGGAGTTCTGTACACA
GGCCTTTTATCACCACGCATGATGCTATGCATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCA
GCTGAATGACTTCTTGGCAGAGTATGCATCTCCTGTACGCCTGGTTTGATTACAACA
TGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCACCACAATCACACTGGTGGAGTGGGCAAGGACCCT
GACTTCCACAGGGGAAACCCGGCATTGTGCCCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTA
CATGTGATGTGGCAGTTTGGCGCCTCGCATGGTGGACGGTGGTCTGCAGCTGCTGGG
TGGCCGATGGCGAACCTGCTGGTGTTCATGGACGGCCGCGCCATCCTGTCCGCCTTC
CGCTTGTCTACTTTGGCACGTACATGCCCCAAGCCTGAGCCTAGCGCTGCGTACAGG
CTCCCCAATCGTCATGAACTGGTGAAGTCGCGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGG
TCAGCTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTGCATGGGAGCACCACCGCTGGCCCTTC
GCCCCCTGGTGGGAGCTGCCAACTGCCCGCTGTCTGGCCGAGTCTGGTTCTCTGC
CTAGGAGCTCAA (1015bp)

MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAARPLKNAYKP
 PPSDTKGI TMLAVIGSWAAVFLHAIFQIKLPTSLDQLHWL PVS DAT AQLVGGSSSLMHI
 VVVFVLEFLYTGFLITTHDAMHGTIAMRNRQLNDFLGRVCISLYAWFDYNMLHRKHWEH
 HNHTGEV GKDPDFHRGNPGIVPWFASFMSYSMSMWQFARLAWWTVVCSWVRRWRWCWS
 WTAAPILSAFRFLYFGTYMPHKPEPSAASGSPPIVMNWWKSRTSQASDLVSFLTCYHFDL
 HWEHHRWPFAPWELPNCRRLSGRGLVPA* (329aa)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
X86782.1	H.pluvialis mRNA for beta-carotene C-4 oxygenase	1454	1454	95%	0.0	96%
DQ086233.1	Haematococcus pluvialis beta-carotene C-4 oxygenase gene, complete cds	660	1540	92%	0.0	100%
GU143688.1	Haematococcus pluvialis beta-carotene ketolase (bkt1) gene, complete cds	654	1164	69%	0.0	99%

Clone 2

T-Vector + C-4-oxygenase

primer

C-4-OXY-F

5' AGT CTA GAG GAT CCA TCA TGC AGC TAG CAG CGA CAG TAA TGT
TGG A 3'(46 mer)

C-4-OXY-R

5' TTG AGC TCC TAG GCA GGA ACC AGA CCT CGG CCA 3' (33 mer)

EcoRI

TCANCAGCTCCGGCCGCCAGGCGGCCGCGGGAAATTCGATAGTCTAGAGGATCCATCATGC
AGTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGA
AGGAGAAGGAGGTGACAGGAGCTCTGACGTGTTGCGTACATGGGCGACCCAGTACTCGC
TTCGTCAGAAGAGTCAGACGCGGCCCGCCGGGACTGAAGAATGCCTACAAGCCACCAC
CTTCCGACACAAAGGGCATCACGATGGCGTAGCTGTCATCGGCTCTGGGCCGAGTGT
TCCTCCAGCCATTTTTCAAATCAAGCTTCCGACCTCCTGGACCAGCTGCACTGGCTGC
CCGTGTCAGATGCCACAGCTCAGTTGGTTGGCGGTAGCAGCAGTCTGATGCACATCGTCG
TCGTATTCTTTGTCCTGGAGTTCTTGTACACAGGCCTTTTTATCACCACGATGATGCTA
TGCATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTGAATGACTTCTTGGGCAGAGTATGCA
TCTCCTTGTACGCTGGTTTGATTACAACATGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCACCACA
ATCACACTGGTGAGGTGGCAAGGACCCTGACTTCCACAGGGGAAACCCGGCATTGTGC
CCTGGTTTGCCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTCGATGTGGCAGTTTGC GCGCCTCGCAT
GGTGGACGGTGGTATGCAGCTGCTGGGTGCGCCGATGGCAACCTGCTGGTGTTCATGG
CGGCCGCGCCATCCTGTCCGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGTACATGCCCCACA
AGCCTGAGCCTAGCGCTGCGTCAGGCTCCCCACCAATCGTCATGAANCTGGGTGGAAAGT
CGCGCACTAACCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTTCTGACCTGCTACCACTTCNACCTG
CACTGGGANACCACNGCTGGCCCTTCCCCCGGGGGGGANCTGNCCCAANTGGC
CCNTTTTNTGGNCNAAGNN

[Nucleotide blast]

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
X86782.1	H.pluvialis mRNA for beta-carotene C-4 oxygenase	1487	1487	95%	0.0	96%
DQ086233.1	Haematococcus pluvialis	676	1590	91%	0.0	100%

	beta-carotene C-4 oxygenase gene, complete cds					
GU143688.1	Haematococcus pluvialis beta-carotene ketolase (bkt1) gene, complete cds	638	1473	91%	3e-179	99%

(라) Myb 유전자 cloning

Anthocyanin 생합성 유전자발현 조절에 관여하는 transcription factor 중 transgenic plant에서의 그 기능이 확인된 Myb transcriptional factors의 cloning을 아래와 같이 시도하였다. 화색소 생합성을 위한 조절유전자 기능을 보이는 Myb transcription factor는 DNA binding protein으로서 promoter 인식과 밀접한 관계를 보인다. 전사조절인자 효율은 여러 parameter에 의하여 영향을 받는데 flavonoid 생합성 유전자 promoter에 대한 전사인자의 binding affinity, 기존 전사인자와의 협력관계 등인데 벚꽃에서의 발현조절 가능성에 대한 연구는 현재까지 이루어지지 않았다.

* 포도, 복분자, 뽕 열매(오디)로부터의 RNA추출을 시행하였으며 그 결과 포도 열매로부터의 RNA추출은 성공하였으나 복분자 및 오디로부터의 추출은 성공하지 못하였다. 보통 엽조직등 으로부터의 RNA추출은 수월한 편이지만 열매의 경우 열매의 종류에 따라 그 결과를 얻기가 매우 힘든 경우가 종종 있는데 따라서 본 연구에서는 포도의 Myb cloning을 우선적으로 수행하였다.

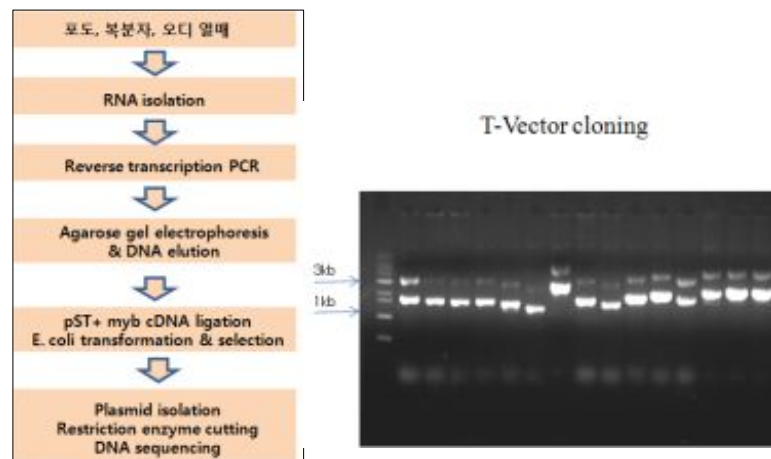


Fig. 279. Isolation of plasmid containing myb cDNA

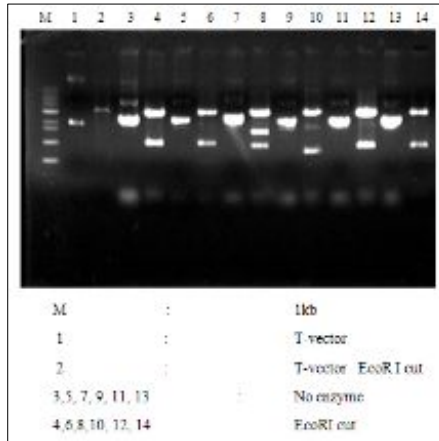


Fig. 280. Restriction enzyme analysis of myb cDNA-containing plasmid

* DNA sequence analysis of myb candidate clone 1

VL MYB A2 -F

5' AGT CTA GAG GAT CCA TCA TGG AGA GCT TAG GAG TTA G 3'(37 mer)

VL MYB A2-R

5' TTG AGC TCA TCA GAT CAA ATG ATT TAC TTG TG 3' (32 mer)

V-6 *EcoR* I

```

GCGNCCGCTCCGGCCGAGGCCGCGGGGAATTCGATTAGTCTAGAGGATCCATCATG
GAGAGCTTAGGAGTTAGATAGGGTGCATGAANCCAAGAAGAAGAGTCCCNCCCAGCAG
GNAATCNAAGAGAGAAATGGAGTATTAANTTGTGGCTTNTTTTNCATTTTGCTGTNGGA
GTTTNTTTTTTNTCTTGAGTTTTCAGGCTTGAAGTGCATGCGAAAAAGCCGAAATTGAN
ATGGCNCANCCATTTGAAGCCAGATATCANGAGCGGAGAGTTTTCGTTANATGAGATTGA
TCTCATGATCCGGCTTCANAATTTATTAGGGAACAGGCATGTCATANTAACCTCAAATACT
AGCTNGATAACCATATTTCTAATGATATGACTTTAATCTGATTAGAAAAGCCTTCATGC
CGTGCTTGACTTGATAGTTTTCATCTGTGCATGCTCNGCTTGNANAGGTGGTCCTTGA
NTACGANTANACTTCNNGGAGGACTGCNAANGATGTCAAGAATTAATGGCNTACTACC
GCTCCAAAAGATGGTTCACCTCCTGGACAGAGGAAAGATAAAACCTAAACACATTCTA
AAACCAAGTTTTAAAGCCTCANCCCTATAAGTTATCCAAACCTCGCCAAGGTTTGAAC
TAAAACTACAGCTGTGGATGCTTTTGACNCGCAAGTTAATACNTCTAGTAAACCATCNT
CCAGGTTACCACAACCAATGATGATATGTCNTGGGTGGAAAGCCNATTANTTGGGCNT
GCCAAAATGGATCAAGAACTGACTTTTTGATTTGTAGTTCNGGAGGGGAGCTTATCTC
CNGCCTCTGGGCNNAANAACATCNCACNCAACAAAGGGGAACNTGGGAGGNNVTGGG
GGGAACNANTCCNCGNCGNNGGNNNGGNNNTTTCCNNNNCCNNNNNGGNNNCCNNNN
NNNNNNNCCNCCNCCNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

```

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ886417.1	Vitis vinifera R2R3 MYB transcription factor (MYBA1) gene, MYBA1-red allele, complete cds	433	433	63%	2e-117	79%
DQ345541.1	Vitis vinifera cultivar Roditis truncated MybA1 (mybA1) gene, mybA1-ROD allele, complete cds	433	433	63%	2e-117	79%
FJ687568.1	Vitis vinifera Grand Noir de la Calmette transcription factor MYBA3 (MybA3) gene, MybA3-5 allele, complete cds	427	427	63%	7e-116	78%
FJ687566.1	Vitis hybrid cultivar Colobel transcription factor MYBA3 (MybA3) gene, MybA3-5 allele, complete cds	427	427	63%	7e-116	78%
FJ687559.1	Vitis vinifera Alicante Bouschet transcription factor MYBA3 (MybA3) gene, MybA3-5 allele, complete cds	427	427	63%	7e-116	78%
FJ687553.1	Vitis vinifera Pinot noir transcription factor MYBA1 (MybA1) gene, MybA1-white allele, partial sequence	427	427	63%	7e-116	78%
FJ687552.1	Vitis vinifera Pinot noir transcription factor MYBA1 (MybA1) gene, MybA1-red allele, complete cds	427	427	63%	7e-116	78%
AB442010.1	Vitis vinifera DNA, retrotransposon Gret1, complete sequence and VvmybA1 gene for myb-related transcription factor, complete cds	427	427	63%	7e-116	78%
DQ886418.1	Vitis vinifera R2R3 MYB transcription factor (MYBA1) gene, MYBA1-white allele, complete cds	427	427	63%	7e-116	78%
DQ403722.1	Vitis vinifera cultivar Alphonse Lavalle MybA1 (mybA1) gene, mybA1-ALF allele, complete cds	427	427	63%	7e-116	78%

* DNA sequence analysis of myb candidate clone 2

VL MYB A2 -F

5' AGT CTA GAG GAT CCA TCA TGG AGA GCT TAG GAG TTA G 3'

VL MYB A2-R

5' TTG AGC TCA TCA GAT CAA ATG ATT TAC TTG TG 3'

v-12

EcoR I

GCCGCCAGCTCCGGCCGCCAGGCGGCCGGGAATTCGATTAGTCTAGAGGATCCATCAT
GGAGAGCTTAGGAGTTAGAAAGGGTGCAATGGATCCAAGAAGAGGATGTCCCCCGNGGAA
ATGCATTGAGAAATATGGAGAAGGAAAGTGGCNCNGNTTCCCTCCGANCAGGTNACAN
GAAAGAGAAAGGGATCAGTATTTATNTGNGTTTTTTTACTTCTGTTTTGCTTACAGAGTT
TCATTTTCTGANTTTGACAGGNTGAATACATGCCNAAAANCTGCNNGTTGAGATGGCTC
AATTANTTGAANCCGGATATCAAGAGAGGAGAGTTTGCNNTAGACGAGGTTGATCTCATG
ATTANGCTTCACAATTTGTTGGGGAACAGGCCAGTCTATAATAACTCAAGTACTAGCTTG
NTAATGATANTACATTAGTTCTGAAGCTGTTCACAACTCCNNAAGAGCTGTTACAGCNGA
NACTTTGNCGTGANGTTNNGCGNGTNTGATGGTCTTGANTGCNNGTAGGCTTCCANGGA
NGACTGCTAATGATGTCAANAACNTNNGCATAGTCACTTCAAANGGAGGTTTCCANC
TCCAGCCAAGAAGGAGAGANACACCCCAAACATTCNNAACCAAGCTATANAGCCT
CACCTTCAAGTTCTCAAAGCCTTGCCNANGTTTGAACATAAACTNCAGCTGTGGAT

ACTTTTGACACACAGTCAGTACTTCCAGGAAGCCATCANCCACTTCACCACAACCGAAN
GATGACATCANATGGNTGGGAANGCCNGTTANCTGAGCATGCTCANATGGATCACGAAAC
TGACTTNTCGGCTTCTGNANAGATGCTTATCGCAGCCTCAAGACAGANNANACTGCNAC
ACACAAAAAGGGACCCNGGGGNGGGGTATGATTGNACCAATCCNGGGGGGGGGGGGGG
GGATTNCCCCNTTGNNGNGGGCCTTCNGGGGANACCCCNCCNCNANNNAAANCCNT
TTGNTCNGGNGNNCNCNAANCCCN

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ687553.1	Vitis vinifera Pinot noir transcription factor MYBA1 (MybA1) gene, MybA1-white allele, partial sequence	1197	1197	89%	0.0	89%
DQ886418.1	Vitis vinifera R2R3 MYB transcription factor (MYBA1) gene, MYBA1-white allele, complete cds	1197	1197	89%	0.0	89%
AB242301.1	Vitis vinifera gypsy-type retrotransposon Gret1 genes for GAG-POL precursor, GAG-POL precursor and VvmybA1 gene for myb-related transcription factor, partial and complete cds, cultivar: Pinot Noir	1197	1197	89%	0.0	89%
AB242300.1	Vitis vinifera gypsy-type retrotransposon Gret1 genes for GAG-POL precursor, GAG-POL precursor and VvmybA1 gene for myb-related transcription factor, partial and complete cds, cultivar: Pinot Blanc	1197	1197	89%	0.0	89%
AB111101.1	Vitis vinifera gypsy-type retrotransposon Gret1 DNA and VvmybA1 gene for myb-related transcription factor, complete cds, cultivar: Ruby Okuyama	1197	1197	89%	0.0	89%
AB111100.1	Vitis vinifera gypsy-type retrotransposon Gret1 genes and VvmybA1 gene for myb-related transcription factor, complete cds, cultivar: Italia	1197	1197	89%	0.0	89%
DQ277700.1	Vitis vinifera cultivar Pinot Noir transcription factor MybA (mybA) gene, mybA1-2 allele, complete cds	1197	1727	89%	0.0	89%
AM448353.2	Vitis vinifera contig VV78X150532.18, whole genome shotgun sequence	1182	1182	89%	0.0	89%
DQ886417.1	Vitis vinifera R2R3 MYB transcription factor (MYBA1) gene, MYBA1-red allele, complete cds	1181	1181	89%	0.0	89%
FJ687552.1	Vitis vinifera Pinot noir transcription factor MYBA1 (MybA1) gene, MybA1-red allele, complete cds	1175	1175	89%	0.0	89%

```

ATGGAGAGCTTAGGAGTTAGAAAGGGTGCATGGATCCAAGAAGAGGATGTCCCCCGAGG 60
M E S L G V R K G A W I Q E E D V P P R
AAATGCATTGAGAAATATGGAGAAGGAAAGTGGCATCTGGTCCCTCCGAGCAGGGTTG 120
K C I E K Y G E G K W H L V P L R A G L
AATACATGCCGAAAAAGCTGCAGGTCACACGAAAGAGAAAGGGATCAGTATTATCTGCG 180
N T C R K S C R S H E R E R D Q Y L S A
TTTTTTTACTTCTGTTTTGCTTACAGAGITTCATTTTCTCACTTTTGGAGATGGCTCAA 240
F F Y F C F A Y R V S F S S L F E M A Q
TTATTGAAGCCGATATCAAGAGAGGAGTTTGCATTAGACGAGGTTTCATCTCATGAT 300
L F E A G Y Q E R R V C I R R G S S H D
TCGGCTTACAATTTGTTGGGAACAGGCCAGTCTATACTACCTCAAGTACTGGCTTGAT 360
S A S Q F V G E Q A S L Y Y L K Y W L D
AATGATATTACATTAGTTCTGAAGCTGTTCAACTTCGAAAGAGCTGTTTCAGCAGATA 420
N D I T L V L K L F T T S E R A V Q Q I
CTTTGTCTGACGTTGTGCGGGTATAGATGGTCTTGATTGCGGGTAGGCTCCAGGGAGG 480
L C L T L C G Y R W S L I A G R L P G R
ACTGCTAATGATGTCAAGAAGTATTGGCATAGTCACTTCAAAAAGGAGGTTTCAGCTC 540
T A N D V K N Y W H S H H F K K E V Q L
CAGCAAGAAGGGAGAGATACACCCCAACATTCTAAAACCAAGCTATAAAGCCTCAC 600
Q Q E G R D T P Q T H S K T Q A I K P H
CCTCACAAGTTCTCAAAGCCTTGCCAAGGTTTGAAGTAAAACTACAGCTGTGGATACT 660
P H K F S K A L P R F E L K T T A V D T
TTTGACACACAAGTCACTTCCAGGAAGCCATCATCCACTTACCACAACCGAATGAT 720
F D T Q V S T S R K P S S T S P Q P N D
GACATCATATGGTGGGAAAGCCTGTTAGCTGAGCATGCTCAAATGGATCAAGAACTGAC 780
D I I W W E S L L A E H A Q M D Q E T D
TTTCTGGCTTCTGGAGAGATGCTTATCGCAAGCCTCAGGCCAGAAGAACTGCAACACAG 840
F L A S G E M L I A S L R P E E T A T Q
AAAAAGGGACCCATGGATGATGATTGAACAAATCCAGGGAGGTGAGGGTATTTTCCA 900
K K G P M D G M I E Q I Q G G E G D F P
TTTGATGTGGGCTTTGGGATACTCCCAACACACAAGTAAATCATTGATCGA 954
F D V G F W D T P N T Q V N H L I *

```

다. 색소 관련 유전자 도입

(1) 고등담자균류에서의 형질전환 vector

형질전환 vector로서 개발된 것들은 E. coli나 yeast 등을 대상으로 한 것들이 대부분인데 이에 비해 사상균류(담자균류 또는 자낭균류)를 위하여 개발된 형질전환 vector는 많지 않다. 즉, promoter-polylinker-terminator의 구조를 지닌 사상균류를 위한 형질전환 vector는 드문 편이다. 비교적 개발 초기에 보고된 형질전환 vector는 fungal selectable marker로서 ignite/basta 저항성 (bar) gene을 지니는 것으로 E. coli plasmid vector의 polylinker를 subcloning으로 도입한 것이 있다. 대표적으로 pBARGPE1의 경우 A. nidulans gpdA promoter와 A. nidulans trpC terminator를 양 옆에 둔 polylinker를 지니는데 이를 본 연구에서 with multiple unique sites. gpdA promoter는 -679 ~ +53 서열을 포함하고 있다. bar gene은 400 µg/ml의 농도로 E. coli 선발 시 유용하다.

고등 담자균류인 버섯은 박테리아, 효모, 동식물등과 달리 promoter와 관련된 연구

(2) 발현 vector의 개발

- * *A. nidulans* gpdA promoter를 지닌 pBARGPE1의 이용
- * Hygromycin 저항성 유전자 (hygromycin phosphotransferase: hph)를 지니는 식물 발현 vector인 pCambia plasmid의 이용
- * 버섯류로부터의 gpd promoter의 cloning, subcloning 및 이용성

(가) pBARGPE1 vector cloning

원래의 연구계획에서는 색소관련 등의 유전자를 pBARGPE1에 도입하여 이를 세송이에 형질전환 및 색소생산의 변화결과를 제시하는 것이었다. 그러나 pBARGPE1의 selection marker의 이용에 있어서 세송이 균사체의 phosphinothricin에 대한 sensitivity가 높은 농도에서 나타남으로써 고가의 phosphinothricin을 고농도로 사용한다는 것이 실험상의 문제점으로 제시되었다. 한편, bar gene의 도입 및 형질전환 시 형질전환체의 출현도 낮아지고 multi-copy gene integration의 가능성도 제시됨으로써 hph selection marker (hygromycin 저항성) gene을 지니는 pCambia1300를 이용하게 되었다. pCambia1300의 경우 bacteria selection marker로서 km 저항성을 지니며 세송이 selection marker로서 hygromycin 저항성을 유전자를 지닌다. 세송이 균사체의 경우 hygromycin sensitivity는 실험을 통하여 50 µg/ml로 나타났다.

(나) gpd promoter cloning

버섯으로부터의 gpd promoter의 cloning : 세송이버섯에서의 발현vector를 제조함에 있어서 pBARGPE1의 경우 자낭균류인 *A. nidulans*의 gpd promoter를 지니고 있다. 버섯에서의 형질전환 및 발현을 위하여 근래 자낭균류의 것을 대신하여 담자균류의 gpd promoter (homologous or heterologous)를 이용하여 laccase나 peroxidase의 발현연구가 보고되고 있는데 이는 자낭균류의 gpd promoter 활성이 담자균류에서 충분치 않기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 담자균류의 gpd promoter cloning 및 subcloning을 실시하였다.

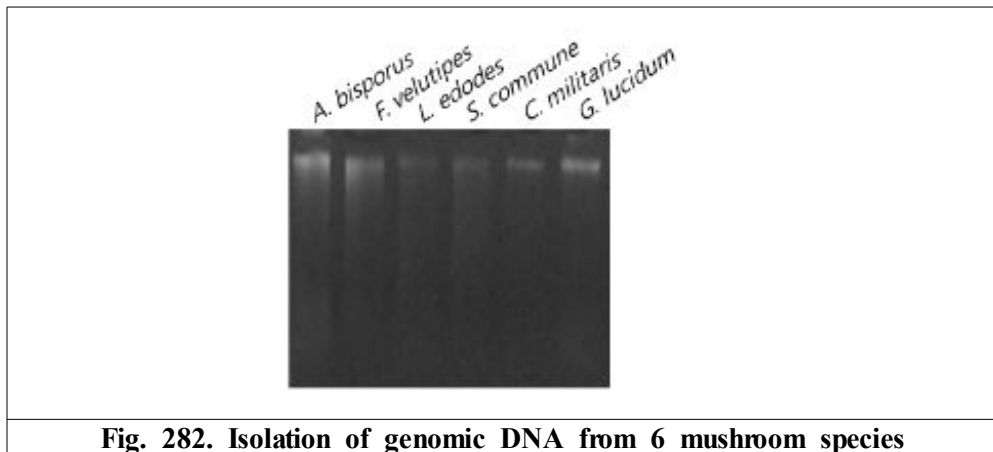
(Primer design)

	Primer sequence (5'-3')
<i>Agaricus bisporus</i> gpdII	Abi II-gpd-F: TAGGATCCGCGGAAGAAGAATTCAGAGGTCGCAAGT Abi II-gpd-R: GGCGGATCCGAGAGACAAACCATGGCGATAAGC Promoter sequence: TAGGATCCGCGGAAGAAGAATTCAGAGGTCGCAAGTAGATTGAAAGTTCAGTACGTTTTTAACAATAGAGCATTTCG AGGCTTGCATCTCTGTGTCAGGCTAGCAGTTTATAAGCGTTGAGGATCTAGAGCTGCTGTTCCCGCGTCTCGAATGTT CTCGGTGTITAGGGTTAGCAATCTGATATGATAATAATTTGTGATGACATCGATAGTACAAAAACCCAATCCGGTCA CATCCACCATCTCCGTTTTCTCCATCTACACACAACAAGCTTATCGCCATGGTTGTCTCTCGGATCCGCC
<i>Flammulina velutipes</i> gpd	Fve-gpd-F: CGAAGCTTTCTAGGTCGTCCTCGT

	<p>Fve-gpd-R: CGCCATGGTTGTAGATGAGGAGATG</p>
<i>Ganoderma lucidum</i> gpd	<p>Glu-gpd-F ATGGATCCAAAGCCGCTCTCATG</p> <p>Glu-gpd-R ATCCATGGTGAGAGGGGGATGAAGA</p> <p>Promoter sequence: TCCAAAGCCGCTCTCATGGCATGGCACAGAGGTATATCGTTACATATATCCGTTTGTGTCAACGTCGAGGGGTCCCCCTC GTTCAAGCCTCTTTCAGACATGGGCCACCCATGCTCAAGATGCCAAGGCCACGCTGTATATCCATAAGTAAGATATGC GCATCCTCGTTTCGCTTGAATTTGGTGTTCGTTGAACAACCTGGTCGAGAGGCAAGAAGTCGAAGTGACTTCTCTTG ACTTTCTATGTCGACCTCAAGGTCGCTCCGGGGCCACAGGCTAAATACGACCACCAATCAATGGCCAAACATCAGC ATGGTCCGATATATAACAATAACCCCTGGTTTGGCGTAGCAATGCCAGGAAATTGCTAGTGTCTCATCTCAATCTGAGC ACAGGCATGGAACGTCGGTCTGAAAAGCCGAGGCCGAAAGTAGGGTACTTGATGAAAAGCTGAATTTGCGAGGCTCAGA CACCTGGAGGAGTTCTTGGCTCGCGCACGAGGGTTCGAACATTATTCAAAGAAGGTGAACAAAGGTCGCCCAAGGCCGG TCAACAGGTAATTGGAAGAAGGGAGGTTAACGTTACCCGACCAATTACATAAATAAGAGTGATTCTGATCGATGGATGTC GGTTGGGTATTGTGTGAGAAAGAGACGAGGTGACGCTCGACATGGCTGGAGATGGCGGGGAAATGGACGAGTGGGATG GTTGATTGCAGCAACCAATCCGGGGCCAGCGGATGTGATACCCATCCGCGTCTGTGACAGTGCATATGGCGAGACAGG CCGAGTCAAAGATGGCAGCTTGAAGCTGTGATGCCGGCAGCTCAGCACAAGTTTCTGTGGTGTGTTGACAGGCACTG AGGAACGTGAGCAGGCTTAGAGGGAGCTAGGCTGGGCGACGTTGGTCTGGGTATGCGAGGAAGACATCGGAGAGATGGC AAGGGCGAGGGACGGCCGAGTCTAGGCTGAGGCTGAAGAGTCAGACGCAACTAGCGCTATTGGCGGGAGACCGCCCA GTCCGGCAAGCGCCGAGTGACGAGGTGGTACGCCCGCAGTCGCCCAGTCCGATAGTGTGCCGATTGGATCTGGG ATAACATCGGTCGAGGGGTATAATGCTCTCTCGCCCTCTCTCTTGTCCAGCTCATCTTACTACTCTTCATCC CCCTCTCAAC</p>
<i>Cordyceps militaris</i> gpd	<p>Cmi-gpd-F: ATAAGCTTCGCAGTGCAGTGCCAA</p> <p>Cmi-gpd-R: GGCCATGGTTCTTGATTAGAAAAGTGAGG</p> <p>Promoter sequence: CGCAGTGCAGTGCCAACAGGGTGCCTTGACGCTGCCGCATGCTGAGGCTGGTGAATGACTAGCCGGAGACATTGCTAT TCGGGCTTGTCTGTTATCGATTCCGTTGCCAGGCGCATATTACGGCGTGAGTGTGTAATGGGAATGAGTCAGCCGGCG CCAGATCGGAGGACGCTGAATGAGACCAAGAGTGTACTTTTCCCGCGCGGCCGACTAAGACGGTTTCACTAATACGC CATGGAATCATGGATGGGAGCCTTGTGCTGTCATCTTGGTGGCCAAATTGCTATTCTGTAGTTCGCGCGTGGCCAACT TGACGGTTCACTGGTTTTGTGCTTGATGACTGACAAAGAGGGCCAGAGATGAGACGACGAGTCCGCGTTGACCATCA GCCAACCGTTCGAGAAATCATCAGTTGCGCTACAGTCAACATAGCGGGTGGTCAAAGTTTGGTGGGCACGGGTTGCCG CACGAGTTGGAACGTCAGTAAAGTGGGGAGGGGAAGCAACCAGAACGAGGCCAATGAAATGGATGAAGGCGTCTGGGA GGGAAGCACGAGCGTGAATGAATGGACGGTTGCGTGACTCTGGTCTCGCATTTTCGATCGAGTCAAGGAACCCGATGGT TGCCTCTGTCTTGGAGAGCTCGTCGAGGCCAAGCTGCGAGTATATGGTTGGTATGCGCTGGCATTGCCCCCTCTCT GCCCTCCATGGACGGACCTGCAGCTCTTGGGCTGGCAAGGTGTGCGCTACGTCGAGATGCGGTTAGTAAAGCTGGCAT AAGCTGGCATAAAGTTGGCTGTCTTGAGAAATCAGGCCAGCAGTCTTGACCTCTCTGGCTACAGGCTCTCCAGCGGTC AGCCACCGCCACTCCAGCGCTGTTTTCACTGACGATGGCCTGTTTTTTGTGCTCTGGCAGCTGGCAAGCTGGGTC CCGGCAGTGCACGGCCAAGCCACCCAGGACTACAAAACATTTGCCACCCCTCTCTTCCCGTGCCTCTCTCTTT TTCTCCCCTCCATTACCTCATTTTCAGTTCAAAGGAACAAAAGTGAATTTCCATCCGTCACACCTGGCTCCATC ATCTCGAGCTCATGCTTCTTGACCATCTACCACGCTCTACCCTCAACAGCTCTACCCACCAAGGCTGCGCTCTT TCCCCTCTCTCCAGACCCCGCCATCCACCCTAACCTAAAGTTACCCTCGTAAACGCCAAAGTCCCAACAGGTT TTCTTCTCTCACCTACTTTTCTAATCAAGAACAATG</p>
<i>Schizophyllum commune</i> gpd	<p>Sco-gpd-F : ATAAGCTTCTTCGACCCGCGCACCTGCAT</p> <p>Sco-gpd-R: CGCCATGGTTGTGTGATGGGATGCGATG</p> <p>Promoter sequence NNAAGCTTCTTCGACCCGCGCACCTGCATGGATGCGCATGGATAGAATAGAGCGTCGCCCTCGAGGGGGACTCGACCAGGG CTGGTGGTGGCGCCGACGGGACTGGCTGGCATTGTCAGATGGCGCGCAGTCCAGGCCCGCCCGATGTTTCATCCCG TTTTGTCAGTATCGATCGGATCTTTCGGGCGTGGGTATAAAAGCGCGCCGCCCGCTCTCCCTCTTCTCCAGCACTCC CATCCAGAGCACTTCCCTCTCC/CATCGCATCCCATCACACAACCATGGNN</p>
<i>Lentinula edodes</i> gpd	<p>Led-gpd-F: ATAAGCTTGACGGTTCAGGCA (HindIII)</p> <p>Led-gpd-R: CgCCATGGTAATTCAAGCAGTCAAT (NcoI)</p> <p>313 bp PCR product</p> <p>Promoter sequence: GCACGGTTCCAGCAACCTTAGTCATGGGGGATAGAAGTGAAGAACGTTTGTGATTGGCAGTCCATCCAAAGGACTC GGCCAAATAATCTATCCAATCGCAGGTCGAGGTAATAAGTGTTTTAGGGTCTAGACTTTTAGGGCTATTGTGCAAGT CACAACATCACGCAATCAAGATTGACTGAAGCGGATTATCTATAAAAGGATCAGTTGTGTTTTTGTGCCGATCTTT CCTTGTCCACAACCTTCGATTCTAATAACCTCCAATCCATTGACTGCTGAATTTAAATG</p>

① Fungal genomic DNA 분리

A. bisporus, *F. velutipes*, *L. edodes*, *S. commune*, *C. militaris*, *G. lucidum* 6종의 버섯균주로부터 genomic DNA를 실시하였다. Potato dextrose agar (PDA) 배지에서 배양한 각 버섯 균사체를 긁어모으고 균사체 1 g을 glass bead 3 g, 1.2 ml extraction buffer (100 mM Tris- HCl pH 8.0, 20 mM Na₂EDTA, 0.5 M NaCl, 1% SDS), 0.5 ml buffer saturated phenol/CHCl₃/isoamyl alcohol과 섞어서 막자로 강하게 30 sec 분쇄하여 끈적거릴 정도로 준비하였다. 여기에 4 ml extraction buffer 및 2 ml buffered phenol/CHCl₃/ isoamyl alcohol을 첨가하여 완전히 섞은 후 transfer pipet을 이용해서 e-tube로 옮기고 원심분리 (13,000 rpm, 5 min)를 실시하였다. 상정액을 새 tube로 옮기고 0.6 vol isopropanol 첨가 및 실온에서 10분 방치하고 원심분리 (4°C, 15 min, 13,000 rpm)를 실시하였다. DNA pellet은 95% EtOH로 세척 후 건조시키고 TE buffer (RNase 20 ug/ml 포함)에 녹인 후 37°C, 30 min 처리를 실시하였다. 이어서 silica membrane tube로 옮기고 원심분리 (12,000 rpm, 1 min), 500 ul PB buffer 투여 및 원심분리 (12,000 rpm 1 min), 700 ul PE buffer PE 및 원심분리 (12,000 rpm, 1 min)를 실시하였다. 새로운 collection tube에 옮겨 100 ul EB buffer 첨가 및 원심분리 (12,000, 1 min)로 DNA 용액을 수집하였다.



② Gpd promoter cloning

PCR 및 gel elution에 의하여 분리한 각 버섯류의 gpd promoter는 일단 T-vector에 cloning을 실시하였다. 재조합 T-vector plasmid는 E. coli XLBlue MRF에 형질전환을 실시하고 선발된 형질전환체로부터 plasmid 분리 및 제한효소 처리에 의하여 재조합상태를 확인하였다. pT-gpd는 *Hind*III/*Bam*HI double digestion을 실시 후 이를 pBI121을 *Hind*III/*Bam*HI처리에 의하여 준비한 CaMV35S promoter가 제거된 pBIΔCaMVPro에 도입하였다. 이로써 pBI-gpdPro를 제작하게 되었는데 결과적으로 6 종의 gpd promoter 중 실제 *L. edodes*, *A. bisporus*, *G. lucidum* gpd-promoter의 cloning에 성공하였다.

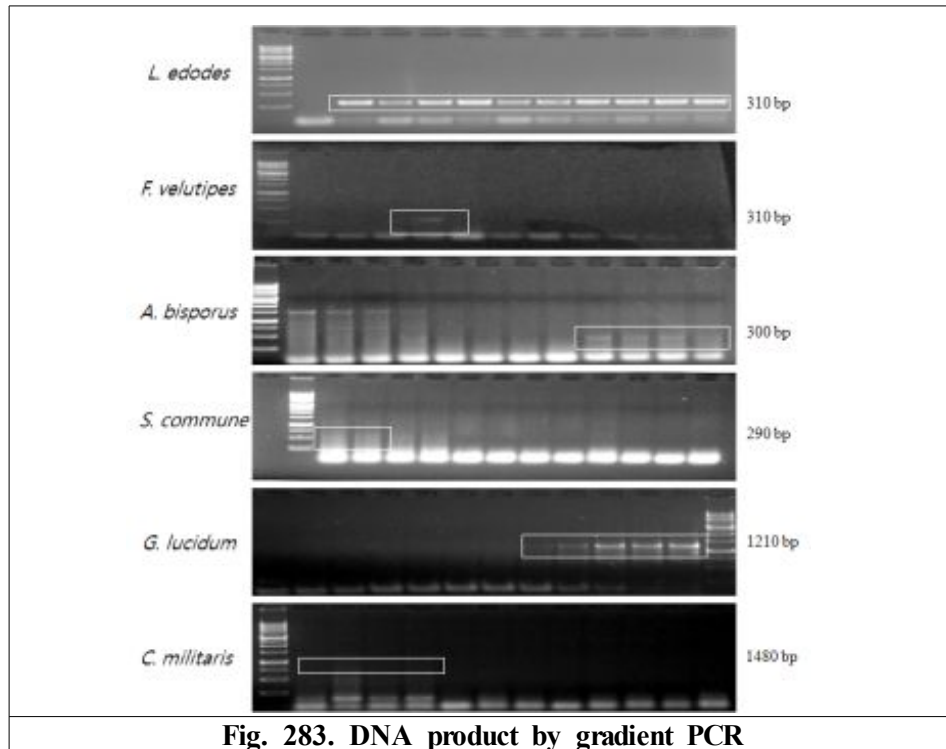


Fig. 283. DNA product by gradient PCR

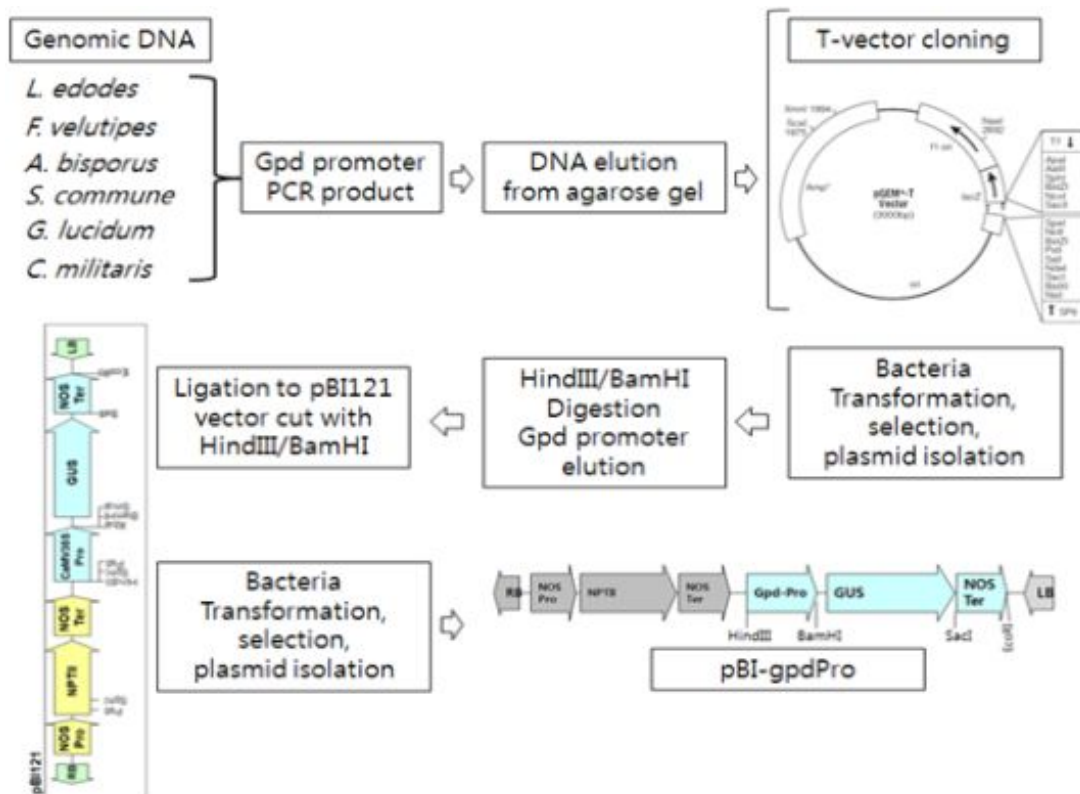


Fig. 284. Schematic diagram of *gpd* promoter cloning into pBI121

pBI-gpdPro는 *Hind*III/*Eco*RI 처리에 의하여 gpdPro:GUS:NosTer DNA fragment를 제조하고 이는 pCambia1300의 multiple cloning site에 도입을 시도하였다. pBI121의 경우 km 저항성유전자를 지니고 있으나 식물형질전환에서의 selection marker로서 이용되지만 버섯류 형질전환의 selection marker로는 이용할 수 없다. 따라서 hygromycin selection marker를 지니는 pCambia1300에 gpdPro:GUS:NosTer DNA를 도입하고 새송이 균사체에 형질전환을 통하여 promoter에 따른 GUS 발현을 분석하였다.

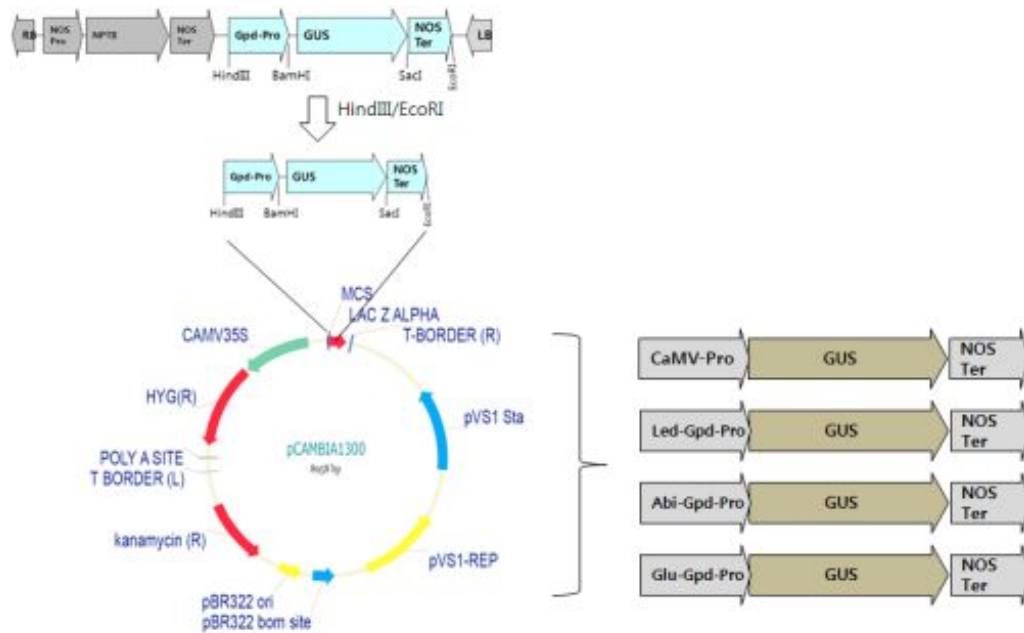


Fig. 285. Schematic diagram of gpd pro/GUS/Ter DNA cloning into pCambia1300

③ GUS 발현을 통한 gpd promoter 활성 비교

Promoter 활성을 비교하기 위하여 4종의 재조합 pCambia plasmid (CaMV35S promoter, *L. edodes* gpd-promter, *A. bisporus* gpd-promter, *G. lucidum* gpd-promter 포함)을 새송이 균사체에 *Agrobacterium*법을 이용하여 도입 한 후 균사체내의 GUS activity를 fluorometric GUS assay에 의하여 비교하였다.

막자사발을 이용하여 PDB 배지에서의 액체배양을 통하여 수집한 균사체를 cold GUS extraction buffer (50 mM NaPO₄ [pH 7.0], 10 mM EDTA, 0.1% sarkosyl, 0.1% Triton X-100, and 10 mM DTT)를 첨가하여 균질화 시키고 원심분리(14,000 rpm, 5 분, 4°C)에 의하여 상등액을 모아 분석에 이용하였다. 10 µl의 상등액을 90 µl의 assay buffer (1 mM 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide를 포함한 extraction buffer)와 섞고 37°C에서 3 시간 반응시켰으며, 이어서 200 µl의 0.2 M Na₂CO₃을 첨가

하여 반응을 종료시켰다. Fluorescence는 PerkinElmer VIVTOR 3 microtiterplate reader를 사용하여 측정하였다. Total protein양은 Bio-Rad protein assay용액을 이용하여 결정하였다.

결과적으로 이들 각 promoter를 달리한 형질전환균사체의 GUS enzyme activity는 모두 비형질전환 균사체의 것보다는 훨씬 높았지만 promoter간의 그 활성차이는 크게 다르지 않는 것으로 나타났다.

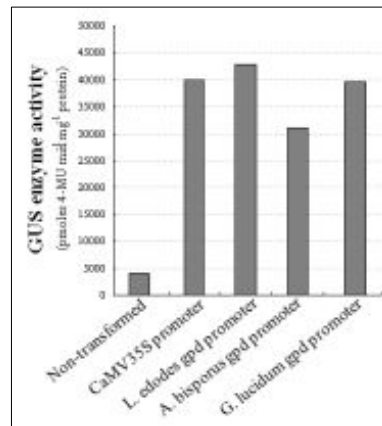


Fig. 286. Fluorometric determination of GUS enzyme activity of *P. eryngii*.

(다) 색소유전자 발현 vector 제조

① Cloning

색소 생합성관련 유전자의 cloning을 위하여 phenylpropanoid pathway를 통한 anthocyanin합성에서의 transcription factor인 Myb을 포도, 석류, 오디(뽕), 복분자로 부터, carotenoid 생합성관련 β -C-4 Oxygenase (β -caroten ketolase)를 녹조류인 *Haematococcus pluvialis*로부터, 그리고 PAC의 cloning을 수행.

② Subcloning into expression vector

PAC, β -C-4 Oxygenase (crtO), myb 유전자를 pCambia1300으로 도입하는 작업을 아래와 같이 실시하여 발현벡터 제조를 제조하였다.

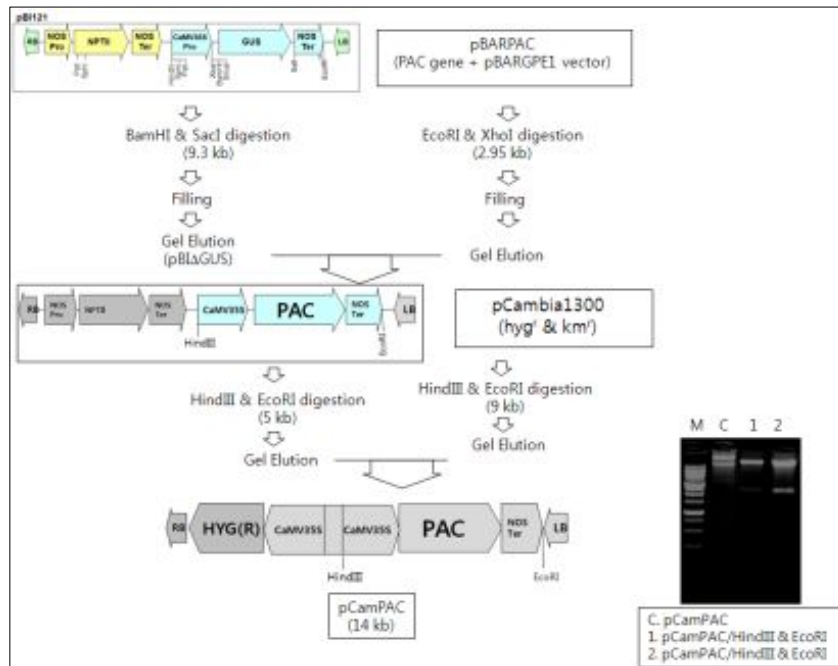


Fig. 287. Construction of pCamPAC

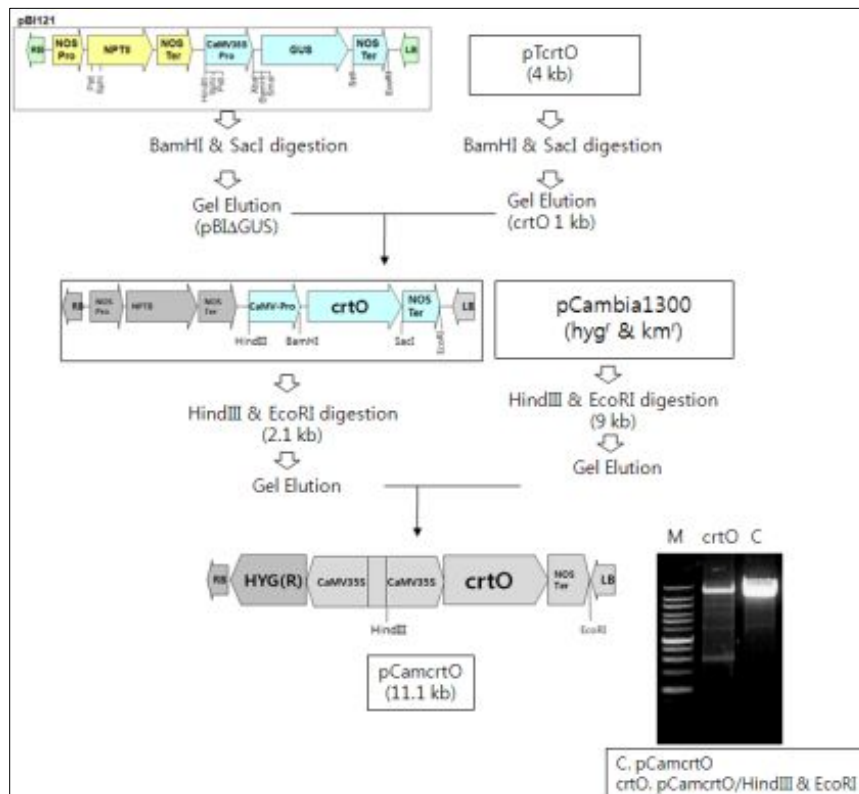


Fig. 288. Construction of pCamcrtO

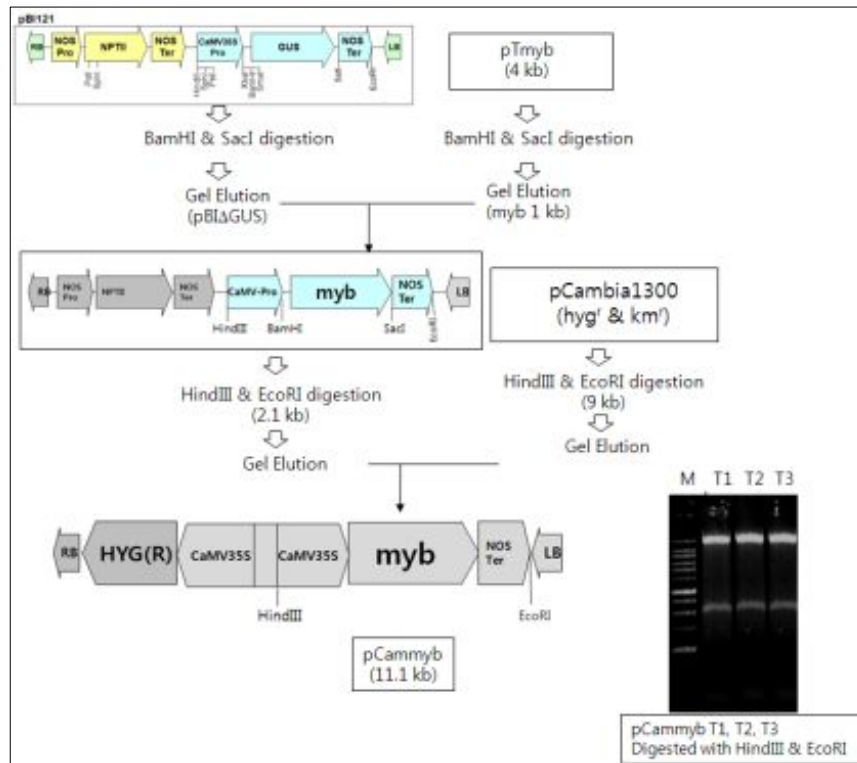


Fig. 289. Construction of pCammyb

라. 색소관련유전자 균사체 형질전환, 기능성검정, 자실체 생산

(1) pCamPAC, pCamcrtO 및 pCammyb의 균사체 도입 및 확인

새송이 균사체의 형질전환을 위하여 hygromycin phosphotransferase 유전자(*hph*) 및 색소발현관련유전자를 지닌 pCamPAC, pCamcrtO 및 pCammyb를 각각 이용하였다. 각 plasmid vector를 freeze-thaw 방법(Chen *et al.*, 1994)으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하여 선발 후 LB 배지(kanamycin 및 streptomycin 각 50 µg/ml 포함)에서 배양(18 hr, 28°C, 180 rpm)하였으며 원심분리(5 min, 10,000 rpm)로 수집하였다. 이어서 MS 배지(Murashige & Skoog, 1962)로 재현탁(OD₆₀₀=0.5)하여 형질전환에 사용하였다. PDA 배지 상의 균사체는 disc 형태로 제조하여 Al₂O₃ particle과 섞어 3 분간 강하게 흔들어준 다음 이들 물리적 상처를 지닌 균사 disc들을 MS 배지에 투여하였으며 여기에 같은 부피의 *Agrobacterium* 세포배양액을 첨가하여 동시배양(2 day, 22°C, 100 rpm)을 실시하였다. 이 후 fungal disc를 PDA 배지(hygromycin 및 cefotaxime 각 50 µg/ml 및 250 µg/ml 포함)에 얹어 배양(25°C)을 실시하였다.

Hyg 배지에서 일차적으로 선발된 균사체 pellet들을 대상으로 2차 선발을 실시하였다. 즉, 1차 선발된 각 균사체 말단부로부터 pellet을 채취하여 새로운 hyg배지에 옮겼으며 그 후 균사체가 직경 3-4 cm 정도 생육이 이루어졌을 때 가장자리 부위 균사체

를 pellet으로 취해 2차 선발을 수행하였다. 다시 이들로부터의 가장자리 pellet을 PDA에 옮겨 생육시킨 후 형질전환분석에 이용하였다. 형질전환체에 따라 PDA에서의 생장속도 면에서 확연한 차이를 보이는 것도 관찰되었는데 유전자도입 분석을 위하여 상대적으로 정상적인 생육속도를 보이는 것들을 선택하여 분석하였다.

Hygromycin저항성 균사체의 형질전환 확인을 위하여 PCR을 실시하였다. Genomic DNA 분리를 위하여 PDA에서 배양한 균사체를 끓여 1.5 ml tube에 수집하고 glass bead 및 추출buffer[2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0) 각각 0.2 ml을 혼합하여 교반(1 min)을 실시하였다. 여기에 0.2 ml의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 첨가하여 교반(3 min) 후 0.2 ml TE buffer를 첨가하여 원심분리(12,000 rpm, 5 min)를 실시하였다. 상정액은 ethanol(2 vol)과 섞어 원심분리(12,000 rpm, 5 min) 후 침전물을 0.4 ml TE에 녹인 후 20 µl 4 M ammonium acetate 및 1 ml ethanol 첨가 후 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)하였다 (Hoffman & Winston, 1987). 침전물은 TE에 용해시켜 PCR 반응에 이용하였다. PCR [95°C, 5 min: 30 cycle 반응 (94°C, 30 sec; 68°C, 30 sec; 72°C, 2 min): 72°C, 5 min]을 위하여 forward primer (5'-GTCGAGAAGTTTCTGATCGA-3') 및 reverse primer(5'-GCTGCATCATCGAAATTGCC-3')를 사용하였으며 *hph* 유전자로부터의 830 bp DNA 증폭을 기대하였다.

* DNA 도입 검증결과

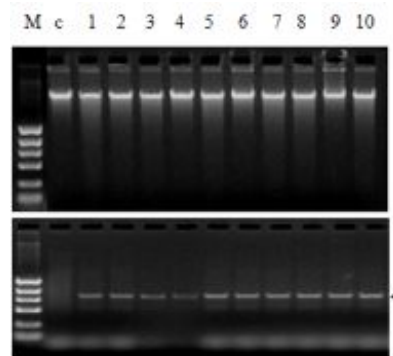


Fig. 290. Isolation of genomic DNA from *P. eryngii* mycelia and confirmation of *hph* DNA integration by PCR in non-transformed (c) and pCamcrtO-transformed (1-10) mycelia.

Hygromycin 저항성에 근거하여 선발한 pCamPAC, pCamcrtO 및 pCammyb 형질전환 균사체의 DNA 도입확인을 위하여 dot blot hybridization을 실시하였다. 즉, 10-15 µg 정도의 genomic DNA를 boiling에 의하여 변성시킨 후 이를 nitrocellulose membrane에 vacuum blotting을 실시한 후 hybridization buffer (5' SSC, 0.1% SDS, and 5% dextran sulfate)를 이용하여 24 h, 60°C에서 반응하도록 하였다. Hybridization signal은 Bright-Star detection system을 이용하여 관찰하였다. Probe는

각 pCamPAC, pCamcrtO 및 pCammyb plasmid를 template로 이용하여 PCR을 실시한 후 증폭된 DNA조각을 BrightStar Psoralen-Biotin Nonradioisotopic Labeling Kit를 이용하여 labelling하였다.

* Dot blot hybridization 결과

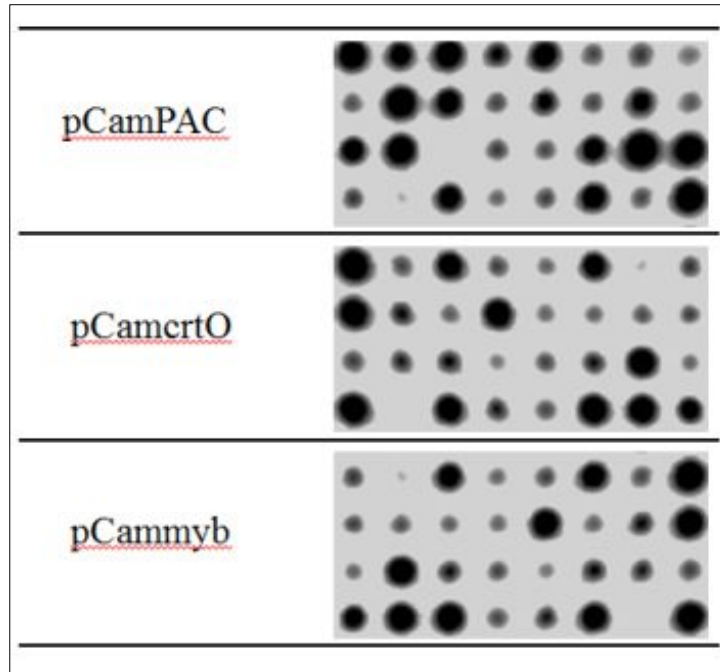


Fig. 291. Confirmation of transgene integration by dot blot hybridization

Dot blot hybridization 결과 hygromycin 저항성 균사체들 중 상당수의 형질전환체에서는 hybridization signal이 나타나지 않았으며 따라서 signal이 확실한 형질전환 균사체를 대상으로 다음의 실험에 이용하였다.

(2) EPS (exopolysaccharides)의 기능성 검정

EPS 수집: Dot blot hybridization으로 확인된 형질전환균사체를 종균으로 이용하였다. 종균배양은 fungal disc형태의 접종원 4개를 50 ml 배지를 함유한 250 ml flask에 접종하여 25°C에서 180 rpm으로 10일간 배양하였다. 세포외 다당체 (EPS)를 회수하기 위하여 배양액을 원심분리 (13,000 rpm, 20 min)로 분리한 후 여기에 4 vol의 ethanol을 가하여 침전시켰다. 침전된 EPS는 다시 원심분리 (13,000 rpm, 20 min)하여 회수하였으며 증류수에 녹여 투석한 후 사용하였다. 총 당의 함량은 phenol-sulfuric acid 법을 이용하여 측정하였다.

Cell viability test: 난소암 세포주인 SKOV-3(ATCC HTB-77)는 10% FBS 포함 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂ 및 37°C 조건에서 배양하였다. 96-well flat bottom microplates에 세포를 분주(1x10⁵ cells/well)하여 24 시간 배양시킨 후 각 well

에 methanol 추출액 10 μ l를 첨가하여 배양(48 hr)을 지속한 후 배양액을 제거하고 PBS(pH 7.4)로 세척하였다. RPMI 1640 배지에 용해시킨 100 μ l MTT 용액(0.5 mg/ml)을 처리(4 h, 37°C)하고 원심분리(1000 rpm, 5 min) 후 MTT용액을 제거하였다. 100 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가 후 formazan 용해액은 ELISA microplate reader를 이용하여 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포성장 억제율은 (ODt/ODc) x 100%로 계산하였으며 ODt 및 ODc는 각각 처리 세포 및 무처리 세포의 흡광도를 의미한다.

Cell viability test 결과: *Agrobacterium* 이용 형질전환은 T-DNA 삽입변이에 따른 기능성 유전체학 연구에 중요한 수단으로서 기능의 손실과 획득 및 관련 유전 정보의 확인이 가능하다. 본 연구에서는 최종 선발된 형질전환체들의 생리활성 관련 변화를 비교분석하였다. 무작위로 42 종을 선택하여 이들로부터의 EPS를 SKOV-3(ovarian cancer cell line)의 세포활성에 미치는 영향을 MTT assay에 의하여 분석하였다. 그 결과, 비형질전환 균사체 추출액의 경우 암세포활성에 영향이 없었으나 형질전환체에서는 다양한 변화가 나타났다 (Fig. 30). 즉, 대조군과 별 차이가 나타나지 않는 경우, 오히려 세포생장을 촉진시키는 경우, 그리고 세포활성을 억제하여 SKOV-3 암세포에 대한 독성 유발의 강한 생리활성을 보여주는 경우로 구분되었다. 세포사멸등과 같은 성장저해 기작이나 EPS의 세부적 변화와 관련된 결과는 포함되지 않았다. 그러나 형질전환 및 T-DNA 삽입변이를 효율적으로 수행함으로써 특정 생리활성이 강화된 세균이 변이체의 제조 가능성을 충분히 제시할 수 있었다.

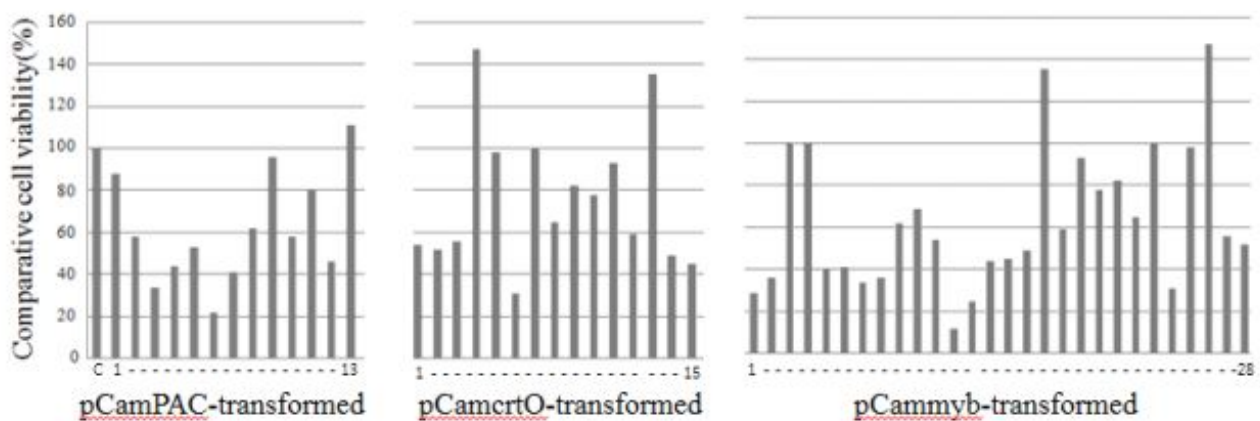


Fig. 292. Cytotoxicity of EPS from the transformants to SKOV-3 ovarian tumor cells.

식물인 애기장대풀 유전체는 125 Mb로써 사상균류가 평균 37 Mb 정도 (Gregory et al., 2007)를 감안하면 형질전환을 이용한 유전체 기능분석이나 생리활성 조절 및 개발이 보다 수월할 것으로 추측할 수 있었다.

(3) 자실체 생산

형질전환 균사체의 각 4종 (pCamPAC-1, 2, 3, 4: pCamrto-1, 2, 3, 4: pCammyb-1, 2, 3, 4)을 확인 및 사용하였으며 원균보존은 PDA 사면배지에 이식, 배양 후 4°C에 보관하였다. 접종원 제조는 사면배지에서 PDA plate로 이식하여 25°C, 10일간 배양하여 사용하였다. 종균제조는 버드나무:미강을 8:2로 혼합하여 수분을 65%로 조절하여 850 ml PP병에 590 g을 충전하여 살균(120°C, 90 min)하였다. 이를 25°C까지 냉각하였으며 접종원을 5절편으로 준비하여 배양 (20°C)을 실시하였다. 자실체 생산을 위한 배지의 조성은 참나무:미송:미강:밀기울을 3:3:1.5:1.5 비율로 혼합하여 수분 65%로 조절하였고, 850 ml PP병에 590 g을 충전하고 살균(120°C, 90 min)하였다. 톱밥종균 약 30 g을 접종하여 배양 (20°C)을 35일 지속시킨 후, 균굽기를 실시하고 생육 (15°C, 85% moisture)을 지속시켰다.

자실체에 대한 특성을 조사 하였으며 다음과 같은 결과가 나타났다. 비형질전환 자실체에 비해 형질전환 자실체 모두 크기, 무게, 두께 면에서 열등한 수치가 측정되었으며 이는 자실체 형성속도가 훨씬 늦어진 결과로 해석하고 있다 (Table 30). 또한 색소형성 면에서 비형질전환 자실체의 near white에 비해 형질전환 자실체 모두 마찬가지로 near white를 나타냄으로써 색깔의 차이가 전혀 나타나지 않았다 (Fig. 31, 32, 33).

	Height (mm)	Weight (g)	Diameter (mm)	Quality	Stem Color
Control	101.5	26.8	26.3	++++	near white
pCamPAC-1	67.3	20.1	21.6	++	near white
pCamPAC-2	71.1	19.4	19.1	++	near white
pCamPAC-3	84.5	22.5	22.1	++	near white
pCamPAC-4	77.8	21.8	18.6	++	near white

	Height (mm)	Weight (g)	Diameter (mm)	Quality	Stem Color
Control	93.3	29.1	30.3	++++	near white
pCamort-1	56.3	19.7	23.1	++	near white
pCamort-2	73.5	19.1	20.1	++	near white
pCamort-3	74.1	20.4	19.8	++	near white
pCamort-4	67.5	19.8	19.6	++	near white

	Height (mm)	Weight (g)	Diameter (mm)	Quality	Stem Color
Control	93.3	29.1	30.3	++++	near white
pCamort-1	56.3	19.7	23.1	++	near white
pCamort-2	73.5	19.1	20.1	++	near white
pCamort-3	74.1	20.4	19.8	++	near white
pCamort-4	67.5	19.8	19.6	++	near white

Table 30. Characteristics of transformed *P. eryngii* fruiting bodies.



Fig. 293. Harvested fruiting bodies of PcamPAC-transformed *P. eryngii*.



Fig. 294. Harvested fruiting bodies of Pcamort-transformed *P. eryngii*.

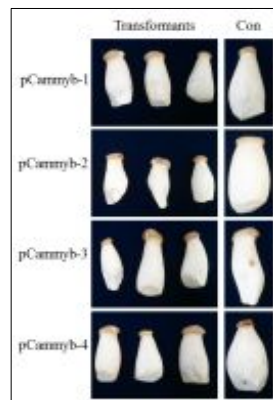


Fig. 295. Harvested fruiting bodies of Pcammyb-transformed *P. eryngii*.

(4) 색소관련 유전자 발현 확인

(가) 유전자 삽입 확인

균사체에서의 유전자 도입 확인을 위하여 실시했던 dot blot hybridization을 각 형질 전환 자실체에 대하여도 실시함으로써 도입 유전자의 안정성을 확인하였다. 자실체로부터의 10-15 µg 정도의 genomic DNA를 boiling에 의하여 변성시킨 후 이를 nitrocellulose membrane에 vacuum blotting을 실시한 후 hybridization buffer (5' SSC, 0.1% SDS, and 5% dextran sulfate)를 이용하여 24 h, 60°C에서 반응하도록 하였다. Hybridization signal은 Bright-Star detection system을 이용하여 관찰하였다. Probe는 각 pCamPAC, pCamcrtO 및 pCammyb plasmid를 template로 이용하여 PCR을 실시한 후 증폭된 DNA 조각을 BrightStar Psoralen-Biotin Nonradioisotopic Labeling Kit를 이용하여 labelling하였다.

Dot blot hybridization 결과 모든 형질 전환 자실체에는 해당 transgene의 삽입이 안정적으로 유지되어 있는 것으로 확인되었다.

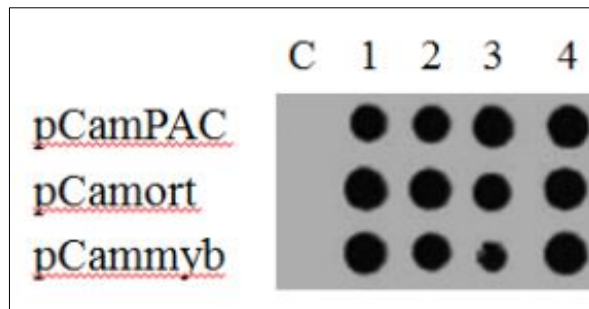


Fig. 296. Detection of transgene in transformed fruiting bodies by dot blot hybridization

(나) 유전자 발현의 확인

형질 전환 자실체로부터의 PAC, crt-O 및 mybHBsAg의 mRNA 생산을 분석하였다. 자실체 100 mg 정도를 수집한 후 이를 glass bead와 Trizol 용액을 섞어 막자사발에서 분쇄하고 그 추출액으로부터 RNA를 분리하였다. 10 µg 정도의 total RNA를 이용하여 AMV reverse transcriptase 및 Taq polymerase를 이용한 RT-PCR [42°C 30 min, 95°C 10 min, 33 cycle PCR(94°C 30 sec, 45 °C 30 sec, 72°C 1 min), 72°C 3 min]을 수행하였으며 이 때 primer는 1 kb 정도의 DNA가 증폭될 수 있도록 설계하였다.

RT-PCR 결과 도입 유전자의 mRNA 발현은 자실체에서도 정상적으로 이루어짐이 확인되었다.

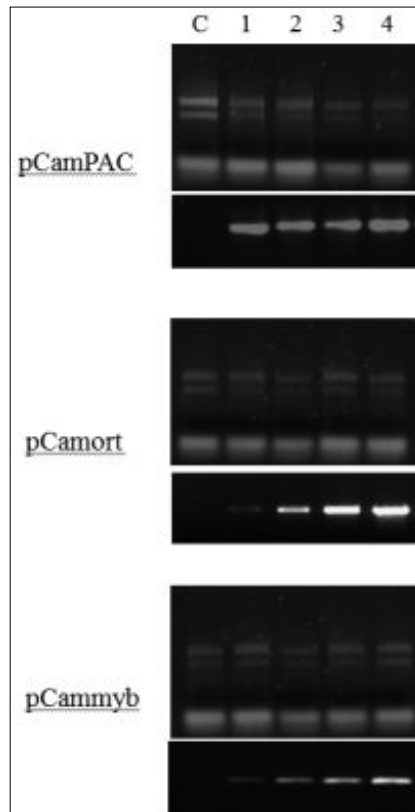


Fig. 297. RNA isolation and RT-PCR analysis for mRNA expression.

(다) 고찰

본 연구에서는 새송이에서의 색소 생합성 유도를 위하여 식물의 anthocyanin합성 transcription factor인 Myb, 녹조류인 *Haematococcus pluvialis* carotenoid 생합성관련 β -C-4 oxygenase (β -caroten ketolase), 그리고 두 종류의 carotenoid biosynthetic gene인 *Capsicum*으로부터의 phytoene synthase (Psy) 및 *Pantoea*로부터의 caroten desaturase (CrtI)을 지니는 PAC gene cloning 및 이들 유전자들을 균사체로 도입하였다. 결과적으로 각 유전자의 도입은 비형질전환 자실체에서의 near white와 확실히 구분되는 색소형성은 이루어지지 않는 결과가 나타났다. 이에 대한 원인은 여러 가지로 해석될 수 있으나 가장 중요한 원인으로서는 새송이버섯에서의 색소발현을 위한 system이 달혀져 있는 near white 상황에서 식물 및 녹조류로부터 유래한 색소발현관련 유전자의 도입 및 그 발현이 영향을 미치지 않는 것으로 추측되는 바 이에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 곳으로 사료된다.

선발 사용한 형질전환체의 자실체의 증량이나 크기 면에서 비형질전환 자실체에 비하여 모두 열등한 이유로서는 도입유전자에 의한 insertional mutagenesis에 의한 생장지연 현상으로 추측하고 있다. 보다 많은 형질전환체의 배양을 통한 정상적 생육을 보이는 것을 선발할 필요가 있다.

마. Mouse모델이용 식용 간염백신용 새송이 개발

(1) 식용백신개발 배경

전통적 vaccine (attenuated/killed pathogens)에서 진일보된 subunit vaccine은 재조합단백질이나 합성 peptide 형태로 그 생산이 이루어지고 있다. Subunit vaccine은 전통의 것에 비해 안전성이 뛰어나고 면역반응을 보다 효율적으로 유도하는 것으로 평가되고 있다. 그러나 생산, 정제, 냉장저장 과정 등에 의한 비싼 가격 형성으로 subunit vaccine (말라리아, dengue 또는 HBV 등)에 대한 요구가 절실한 저개발 빈곤 국가에는 그 혜택이 못 미치고 있다. 따라서 보다 저렴한 subunit vaccine의 제조가 필요하게 되었으며 edible vaccine의 생산이 그 해결방법으로 제시되었다. Edible vaccine의 형태로 생산하는 subunit vaccines 생산은 그 생산과 관련된 생산량, 비용, 수월성, 규모 확대 용이성 면에서 장점을 지니는데 특히 저렴한 비용이 가장 큰 장점이다. Edible vaccine의 생산방법은 비교적 단순한데 재조합된 antigen gene을 적절한 형질전환법 (식물이나 조직의 종류에 따라 *Agrobacterium* 방법, electroporation, biolistic bombardment 등의 선택)에 의하여 식물에 도입하고 선발, 재분화, 증식, 세대 별 발현안정성 검정 등의 과정을 거쳐 종자, 줄기, 열매 등을 edible vaccine으로 이용하는 것이다.

Edible vaccine은 입을 통한 subunit vaccine의 섭취를 의미하는데 바나나, 감자, 토마토, 쌀, 상추 등 다양한 식물을 이용하여 동물 및 사람의 질병 가령 홍역, HIV, 콜레라, 수족구병, 간염바이러스, 광우병 등의 예방을 위한 연구가 20년 이상 지속되어 왔다. Edible vaccine을 섭취하는 경우 이는 장의 mucosal immune effector sites인 Peyer's Patches (PP) 가까이 이르러 소화효소나 미생물 효소에 의하여 분해된다. PP를 통과하는 항원 (subunit vaccine)은 입과 구조 내 M cell과 접촉하며 결국 B cell, T cells 및 대식세포 등을 자극하여 면역반응을 유도하는 것으로 밝혀져 있다. 활성화된 B cell의 경우 mucosal associated lymphoid tissue (MALT)로 이동 및 분화되어 IgA 분비 역할을 보이는데 IgA는 장의 상피세포를 통하여 분비됨으로써 점막면역작용을 나타내게 된다. Edible vaccine은 점막면역계뿐만 아니라 체액면역계 반응 모두를 유도할 수 있는 것으로 밝혀져 있다

식물백신의 문제점 : 형질전환식물에 근거한 edible vaccine은 많은 장점에도 불구하고 실용화 과정에서의 여러 걸림돌이 산재하고 있는 현실이다. 즉, 적정 투여량의 결정이 매우 까다롭다는 것이 그 중 하나이다. 즉, 인체를 대상으로 edible vaccine을 투여하는 경우 과일/식물조직의 크기, 성숙도 등에 따라서 subunit vaccine의 함량이 일정치 않음으로써 개개인의 몸무게, 나이에 따른 적정량 결정이 매우 힘들다는 것이다. 즉, 일정 발현량을 지니는 edible vaccine 소재의 준비가 매우 까다로운데 식용하는 과일, 줄기, 종자 별, 식물 별, 세대 별, 저장 기간 별, 저장 온도 별 일정한 dosage

결정이 어렵기 때문이다. 섭취량의 결정은 매우 중요하며 적은 경우에는 항체형성이 일어나지 않을 수 있으며 많은 경우에는 immunotolerance를 우려해야만 한다. 또 다른 걸림돌은 단백질의 적정 발현량 조절이다. 보통 식물 단백질의 0.01-2%로서 면역 반응 유도를 위하여 parenteral injection의 10-100 배 이상의 단백질 투여가 요구된다. 발현량을 높이기 위하여 codon optimization, strong promoter, enhancer, UTR, protein fusion 등의 genetic engineering이 시도되어 왔으며 근래에는 plastid transformation이 많은 주목을 받고 있다. 그러나 특정 유전자 발현과다로 인한 식물 성장 또는 형태에서의 이상이나 또는 gene silencing의 야기가 항상 우려되고 있다. 한편, 형질전환식물의 제조에 매우 오랜 시간이 소요되는 만큼 항원의 선정, 식물 종류에 따른 edible vaccine의 효능 차이 등에 대하여 보다 신중한 접근이 필요하다. 현재, 식물의 선택에 있어서 edible vaccine으로서의 가장 적합한 종류는 결정되지 못한 상황에 있다는 것이다. 즉, edible vaccine 생산을 위한 식물의 선택을 위하여서는 형질 전환 및 재분화 수월성, 재배 가능지역, 재배 용이성, 성장속도, 저장성, 조리여부 등등이 고려되고 있으나 최고의 식물은 제시되지 않고 있다. 담배의 경우 재조합단백질 생산을 위한 가장 잘 알려진 model 식물이다. 세계적으로 대량으로 재배되며 형질전환 종자를 장기간 저장할 수 있고 이로부터의 단백질 정제가 수월하다는 장점은 있으나 식용식물에 해당하지 않는다. 감자의 경우 임상실험단계까지 이를 만큼 가장 많은 연구가 이루어져 왔다. 유전자도입, 저장, 번식 등에서 강점을 보이지만 조리하여 섭취하는 경우 항원변성에 의하여 면역원성 저하가 우려되고 있다. 바나나의 경우 저개발국가에서 그 재배가 흔한데 바나나 수확까지 3-4년 정도가 소요된다. 조리가 필요 없다는 장점이 있으나 바나나가 포함하는 단백질 함량이 원래 낮아 재조합단백질 축적이 충분하지 않은 것으로 알려져 있다. 토마토의 경우 생육이 빠르고 널리 재배되고 있지만 빨리 부패함으로서 동결건조 및 capsule 형태의 edible vaccine이 제시되고 있다. 벼의 경우 단백질 발현량에서 우수하며 정장 및 수송에서 강점을 보이는데 생장이 늦고 특정 재배시설이 요구되고 있다. 상추의 경우 생장이 빠르고 직접 소비할 수 있다는 장점을 보이지만 쉽게 부패한다는 단점이 있다. 기타, 콩, 알팔파, 당근, 옥수수 등 다양한 식물 들이 연구되고 있는데 무엇보다 재배지역/공간 이외로의 DNA contamination이나 GMO에 대한 일반인들의 거부 의식이 난제로 남아 있다.

식물세포나 hairy root를 이용하는 경우 생물반응기에서 무균상태로 배양할 수 있음으로써 외부 환경으로의 오염문제를 해결할 수 있다. 이들 system은 주로 재조합단백질을 단기간 내에 중소규모로 생산하기 위한 목적을 주로 하며 edible vaccine연구는 드문 편이다. Single cell이 아닌 multiple cell로 구성된 미분화 조직 또는 뿌리조직을 생물반응기에서 장기간 배양하는 할 경우 gene silencing이나 somaclonal variation 등에 의한 불안정한 단백질 발현의 문제점을 지니고 있다.

Microalgae는 물에서 자라는 단세포 식물로 구분할 수 있다. 배양 또는 형질전환관

련 기술이 잘 알려져 있으며 지상의 식물보다 generation time이 짧고 배양기에서 비교적 저렴하게 키울 수 있다는 장점을 지닌다. Algae를 이용한 biofuel 연구는 잘 알려져 있는데 이 때 부산물로서의 algae유래 단백질 또는 재조합단백질 연구도 관심을 받고 있다. 가령 고등녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*를 기반으로 한 단일항체, 치료용단백질 그리고 subunit vaccine의 연구가 보고된 바 있다. 엽록체 개수가 세포당 100,000 개 정도까지도 존재함으로써 single copy의 nuclear gene에 비해 과다발현을 이룰 수 있다는 특성을 이용하는데 근래, malaria transmission blocking vaccines (TBV)의 개발을 위한 *Plasmodium falciparum* surface protein (Pfs25, Pfs28) 발현연구가 보고된 바 있다. Subunit vaccine을 비교적 저렴하게 생산할 수 있다는 장점을 지니고 있으나 edible vaccine으로서의 이용은 아직 초기 연구단계에 있다. Algae는 GRAS로 구분되고는 있으나 식용으로 쓰이지는 않고 있다.

(2) 버섯균류의 특징

자낭균류 (Ascomycetes)에 속하는 사상균은 산업적으로 매우 유용한 biofactory로서 유기산, 비타민 등의 1차 대사물, 항생제, alkaloids, gibberellin 등의 2차 대사물 그리고 분비효소 (amylase, protease, cellulase, hemicellulase, pectinase, catalase, lipase, phosphatase, glucose oxidase, laccase, mannase 등) 등의 생산을 담당하고 있다. 사상균은 원래 왕성한 효소분비 특성을 지님으로써 분비특성을 이용한 재조합단백질 생산 연구가 주목받고 있다.

한편, 자낭균류는 박테리아/효모와 달리 사람과 유사한 고등진핵세포의 post-translational modification 체계를 지녔다는 점, genetic engineering에 의하여 재조합 사상균체 제조가 충분히 가능하다는 점, 박테리아/효모와 같이 성장속도가 매우 빠르다는 점 등은 사상균을 이용한 세포공장 개발의 장점으로 제시되고 있다. 박테리아/효모 등에 도입되는 plasmid가 세포 증식과정에서 불균등 배분 및 손실의 우려가 있는 반면 자낭균 도입 재조합 vector DNA는 염색체 내에 안정적으로 삽입된다는 장점을 지닌다. 그러나 의약품 단백질 (heterologous rProtein: interleukin-6, porcine pancreatic phospholipase A, tissue plasminogen activator, monoclonal antibody, hen egg white lysozyme 등)의 생산은 자낭균 유래 homologous rProtein의 생산 수준과 비교할 때 상대적으로 낮은 편인데 heterokaryosis (동일 세포 내 이질 염색체 공존)에 의한 발현 불균형 및 발현 감소 가능성 기타 proteolysis 등을 주요 원인으로 분석하고 있다.

자낭균은 대부분 filamentous form을 지님으로써 생물반응기 내에서 점질성에 ball 형성 및 통기/영양분 공급 불균형이 문제되고 있다. 산업용 filamentous fungi는 GRAS로 구분되는 것이 많은 것은 사실이지만 aflatoxin 생합성관련 유전자 보유에 의한 독소생성 우려가 상존한다. 현재 *Aspergilli* (*A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A.*

nidulans 등)나 *Trichoderma reesei* 외에도 *Fusarium veneratum*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *Nurospora crassa*, *Mortierella alpinis*, *Chrysosporium lucknowense* 등이 재조합단백질 생산을 위하여 연구되고 있다.

버섯은 자실체 형성 담자균류를 지칭하며 식용 및 약용 관련 연구가 주를 이루는데 재조합단백질생산연구는 활발하지 않은 편이다. 근래, 치마버섯 (*Schizophyllum commune*), 구름버섯 (*Trametes versicolor*), 주걱간버섯 (*Pycnoporus cinnabarinus*) 등을 이용한 hydrophobin이나 laccase 등의 발현 생산이 보고된 바 있다. 버섯은 자낭균류와 마찬가지로 효소분비활동이 매우 왕성하며 자연 상태에서 죽은 나무로부터의 영양분 흡수를 위한 lignin 분해효소 (lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase)나 hydrogen peroxide 형성효소 (glyoxal oxidase, aryl-alcohol oxidase) 등을 다량 분비한다. 버섯은 농장에서 대규모 단기간 재배가 가능하고 산업용 자낭균과 달리 식용이 가능함으로써 인체 안전성이 보장되었다는 점 등이 장점이다. 버섯은 산업용 자낭균류에서의 문제점 (proteolysis, heterokaryosis, fermentation)을 유사하게 지닐 것으로 여겨지고 있다.

(3) Hepatitis B virus antigen (HBsAg) cloning

간염바이러스(Hepatitis B virus: HBV)에 대한 vaccine은 1986년 미국에서 상업적 판매 허가 후 생명공학을 이용한 생산에 의하여 보급되고 있다. 그러나 간염백신 (HBsAg: HBV 표면항원단백질)은 간염 문제가 실제 심각한 빈민국에서의 이용은 어려운 실정에 있다. 따라서 경제적 식용백신에 대한 기대가 절실한 만큼 이미 다양한 형질전환식물을 이용한 저렴한 식용백신개발연구가 이루어져 왔다. 실제 임상실험을 통하여 그 효과가 입증된 바 있다. 그러나 앞서 언급한 식물에서의 다양한 문제점이 극복되지 못함으로써 이에 대한 대체법이 요구되는 실정이다. 본 연구에서는 새송이를 이용한 식용 간염백신연구를 수행하였다.

(가) HBsAg cloning과 대장균발현

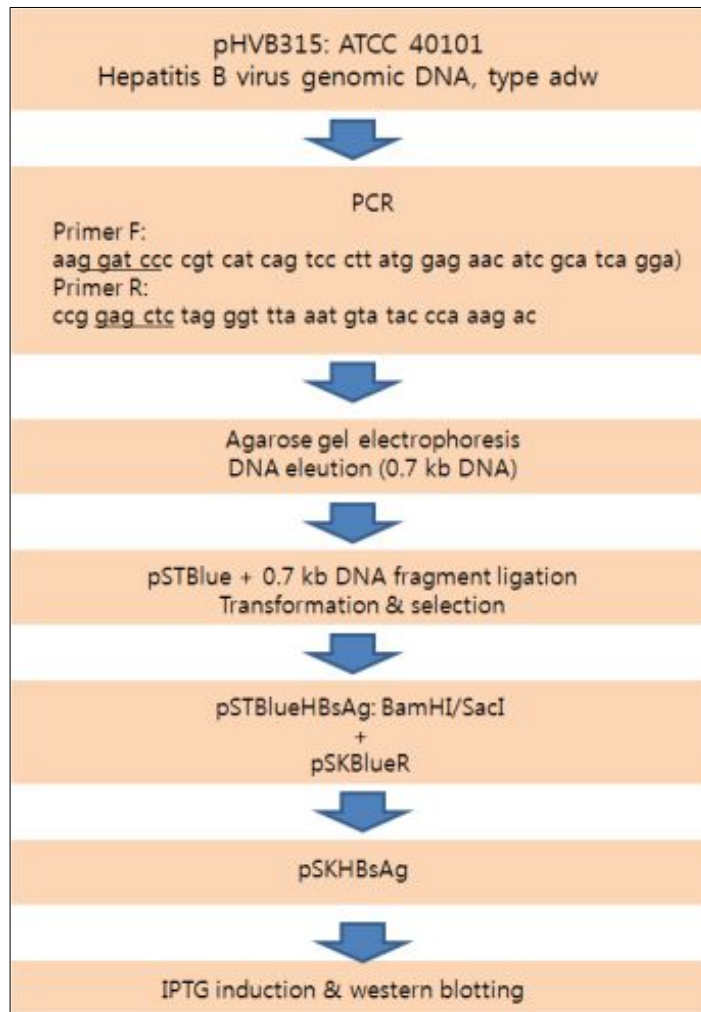


Fig. 298. Cloning and bacterial expression of HBsAg.

```

80
est ATGGAGAACATCGCATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTTACAGGCGGGGTTTTTC
pub ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTTACAGGCGGGGTTTTTC
10
est TTGTTGACAAGAAATCCTCACAAATCCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
pub TTGTTGACAAGAAATCCTCACAAATCCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
Est TTTCTAGGGGGAGCACCCACGGTCTCTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCCAACCTCCAATCAC
pub TTTCTAGGGGGAGCACCCACGGTCTCTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCCAACCTCCAATCAC
Est TCACCAACCTCTTGTCTCCAATTTGTCTGGCTATCGCTGGATGTGTCTGGGGGTTTTT
pub TCACCAACCTCTTGTCTCCAATTTGTCTGGCTATCGCTGGATGTGTCTGGGGGTTTTT
est ATCATATCCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCTCATCTTCTTGGGTCTCTCTGGACTAC
pub ATCATATCCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCTCATCTTCTTGGGTCTCTCTGGACTAT
est CAAGGTATGTTGCCCGTTGTCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACGACGCGGGAOCA
pub CAAGGTATGTTGCCCGTTGTCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACGACGCGGGAOCA
est TGCAGACCTGCACGATTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCTTGTGCTGT-CA
pub TGCAGAACCTGCACGATTCCTGCTCAAGGAACCTCTTGTGTTCCCTCTTGTGCTGTACA
est AAACCTTCGGACGGAAACTGCACCTGTATTCOCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAAGA
pub AAACCTTCGGACGGAAACTGCACCTGTATTCOCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAAGA
est TTCCTATGGAGTGGGCCTCA
pub TTCCTATGGAGTGGGCCTCA
MENIASGLLG PLLVLQAGFF LLTKILTIPQ SLDSHWTSLN FLGGTPVCLG
QNSQSQISSH SPTCCPPICP GYRWMCLRRF IIFLCILLC LIFLLVLLDY
QGMLPVCPLI PGSSTTSTGP CRTCTTPAG TSMFPSCCT KPMDGNCTCI
PIPSSNAFAK YLHEWASVRF SWLSLLVPPV QWFVGLSPTV WLSVIVMIWY
WGPSLYNILS PFIPLLPFF CLWVYI

```

Fig. 299. Analysis of PCR-cloned HBsAg DNA sequence.

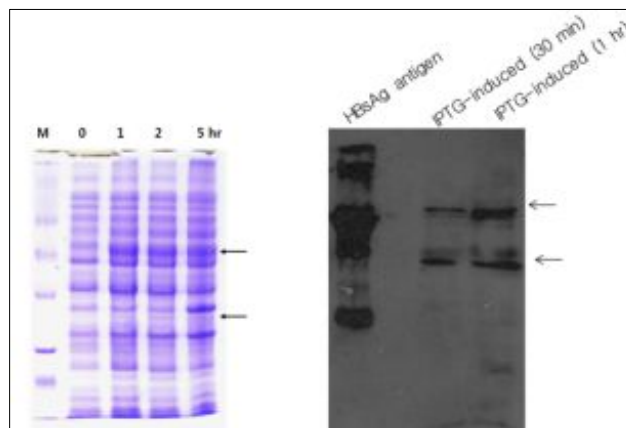


Fig. 300. Identification of IPTG-induced HBsAg protein in *E. coli* by SDS-PAGE and western blotting.

(나) HBsAg 발현백터 제작

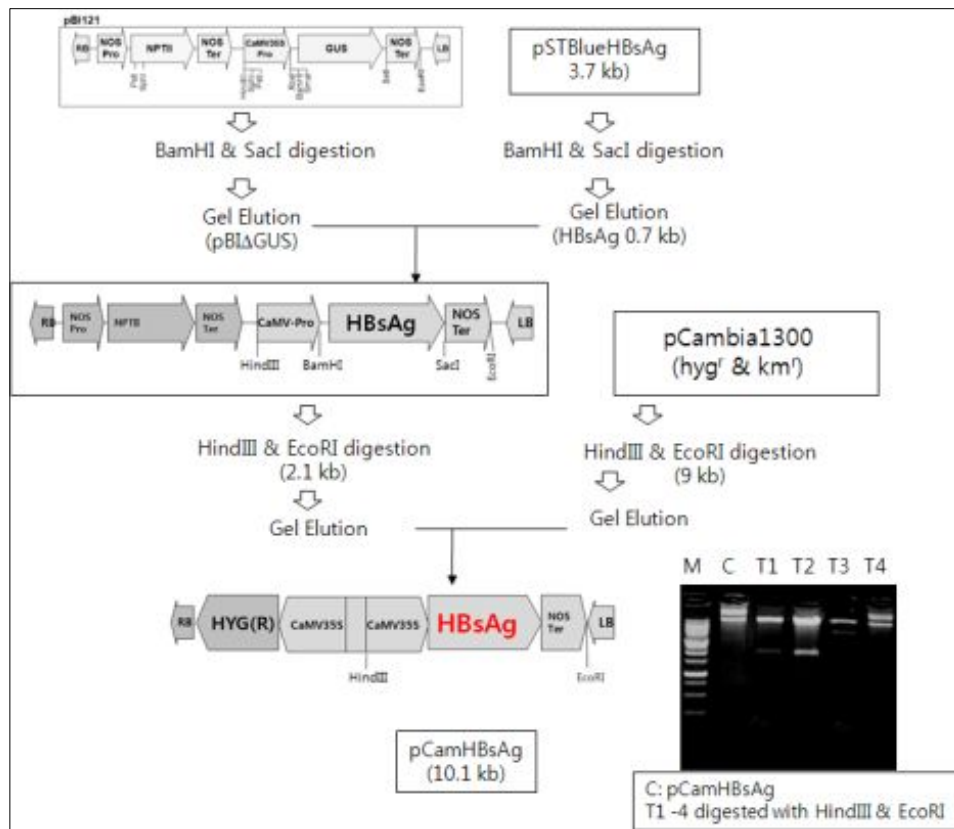


Fig. 301. Construction of pCamHBsAg

(4) Fungal transformation

사상균류의 재조합단백질 발현을 위한 전제조건은 효율적 형질전환수단이다. 그러나 보편화된 간편한 방법은 존재하지 않고 있다. Protoplast 방법은 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에 처음 성공적으로 도입된 후 사상균류 형질전환에 대표적으로 이용되어 왔다. 그러나 낮은 효율과 원형질체 제조나 재분화의 번거로움이 상당한 단점으로 지목되고 있다. Electroporation, biolistic bombardment, *Agrobacterium* 방법 등의 대체적 방법도 사상균류에 따른 최적 조건의 개발이 용이하지 않다. *Agrobacterium*법의 경우 간편성과 용이성에서 가장 실용적이거나 역시 저효율의 문제점이 있다. *Agrobacterium*법 (*Agrobacterium*-mediated transformation: AMT)는 식물 형질전환에 흔히 이용되며 T-DNA 삽입에 의하여 특정 유전자 기능 상실이나 기능 획득을 기대할 수 있으므로써 유전자 및 전사조절인자 등의 규명에 매우 유용하게

쓰이고 있다.

AMT의 일상적 이용을 위하여서는 효율성이 높아야 하며 이를 위해 다양한 방법이 식물에 적용되어 왔다. 즉, 화학물 처리 [*vir* gene 유도 phenol 화합물 (acetosyringone, vanillin, syringaldehyde 등), 계면활성제, 항피사화합물 (cystine, ascorbic acid, dithiothreitol, silver nitrate 등), 삼투조절물질 (sucrose, glucose 등)]나 물리적 인자 적용 [vacuum infiltration, physical wounding (sonication, carborundum 사용 등)] 또는 생물적 환경적 인자 적용 (균밀도, 동시배양 온도나 시간 등)이 그것이다.

본 연구에서는 물리적 상해를 이용한 AMT 방법을 개발하게 되었으며 새송이 (*P. eryngii*)를 중심으로 형질전환 방법의 보편화를 위하여 (*T. fusiformis*), 영지 (*Ganoderma lucidum*), 노루궁뎅이 (*Hericium erinaceum*), 잎새 (*Grifola frondosa*), 표고 (*Lentinula edodes*), 양송이 (*Agaricus bisporus*), 팽이 (*Flammulina velutipes*), 신령 (*Agaricus blazei* Murrill), 잣버섯 (*Lentinus lepideus*), 잣빛만가닥 (*Lyophyllum decastes*), 치마 (*Schizophyllum commune*), 구름 (*Trametes versicolor*) 등의 형질전환도 수행하였다.

(가) 새송이 형질전환 및 HBsAg 발현

P. eryngii (KACC 50028) 균사체는 농업유전자원정보센터로부터 분양받았으며 potato dextrose agar (PDA) 배지를 이용하여 25°C에서 배양하였다. 균사체 저장을 위하여 agar plug 형태 균사체를 2 ml 멸균 tube에 3-4개를 넣어 밀봉한 후 4°C에서 보관하였으며 또는 10% glycerol 포함 potato dextrose broth (PDB)에 균사체 agar plug을 담겨 -80°C에서 장기 보관하였다.

*Agrobacterium*을 이용한 균사체 형질전환은 진공침윤 또는 단순 침윤에 이은 동시배양에 의하였다. 발현 vector는 HBsAg DNA를 삽입시킨 pCamHBsAg를 사용하였다. *E. coli* XLBlue MRF로 도입하여 선발된 균주로부터의 pCamHBsAg는 제한효소 처리로 확인 후 이를 *A. tumefaciens* LBA44404에 도입하여 균사체 형질전환에 사용하였다. LB (kanamycin 및 streptomycin 각 50 µg/ml 포함)에서 28°C, 180 rpm으로 16 시간 진탕배양한 *Agrobacterium* 세포는 원심분리에 의하여 수집하였으며 이를 PDB로 현탁시켜 OD₆₀₀=0.5 정도로 준비하였다.

Agrobacterium 현탁액 3 ml을 균사체로 거의 덮힌 PDA plate에 투여하고 20 분간 진공침윤 또는 단순 침윤을 실시하였다. 이어서 물기를 제거한 후 22°C에서 2 일간 동시배양을 수행하였다. 이 후 칼이나 cork borer 등을 이용하여 균사체를 보통 3-5 mm 지경의 pellet 형태로 제조하여 hyg 50 µg/ml 및 250 µg/ml cefotaxime 포함된 선발

PDA 배지에 옮겼으며 25°C에서 배양하였다. Mechanical wounding-assisted ATM을 위하여 40 - 400 µm 평균직경의 Al₂O₃ 혼합입자를 균사체 표면이 완전히 덮히도록 투여한 후 plate를 parafilm으로 밀봉하고 손으로 잡은 후 위아래로 움직이며 3분간 강하게 마찰을 주었다. 멸균수를 이용하여 Al₂O₃ 입자를 충분히 제거 후 이를 대상으로 AMT 및 형질전환체 선발을 수행하였다. Hyg 저항성 균사체가 출현하는 경우 균사체가 가장자리를 pellet으로 제조하여 새로운 항생제 선발 배지에 옮겼으며 최종적으로는 PDA에 다시 마찬가지로 pellet 형태로 옮겨 균사체가 충분히 생육 후 실험에 사용하였다.

균사체로부터 genomic DNA 분리를 위하여 PDA배지 표면에 멸균 셀로판지를 얹은 후 그 위에 균사체 pellet을 얹어서 균사체가 충분히 자라도록한 후 이를 수집하여 100 mg 정도를 준비하였다. 이는 막자사발에 옮겨 200 mg 정도의 glass bead (40-100 µm 크기), 300 µl extraction buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% SDS] 및 300 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol와 섞어 끈적한 상태까지 분쇄하였다. 이 후 400 µl extraction buffer 및 400 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 첨가한 후 transfer pipet을 이용하여 1.5 ml tube로 옮겨 원심분리 (13,000 rpm, 5 min)를 실시하였다. 상정액은 새로운 1.5 ml에 옮기고 여기에 0.6 vol isopropanol을 첨가하고 원심분리 (13,000 rpm, 20 min, 4°C) 하였다. DNA 침전물은 95% ethanol로 세척 후 TE buffer에 녹이고 RNase A를 처리 (37°C, 30 min) 후 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 추출을 행하였다. 수용층에 대하여 0.5 vol 7.5 M ammonium acetate 및 2.5 vol ethanol을 첨가 후 -70°C에서 30 min 처리하고 원심분리 (13,000 rpm, 15 min, 4°C)를 수행하였다. DNA pellet은 95% ethanol로 세척 후 TE buffer에 녹여 보관하였다. PCR [95°C, 5 min: 30 cycle 반응 (94°C, 30 sec; 68°C, 30 sec; 72°C, 1 min): 72°C, 5 min]에 사용된 primer (forward, 5'-GTCGAGAAGTTTCTGATCGA-3': reverse, 5'-GCTGCATCATCGAAATTGCC-3')는 *hph* gene에서 830 bp의 DNA 증폭이 이루어질 수 있도록 준비하였다.

형질전환균사체로부터 HBsAg의 mRNA 생산을 분석하였다. 균사체 100 mg 정도를 수집한 후 이를 glass bead와 Trizol 용액을 섞어 막자사발에서 분쇄하고 그 추출액으로부터 RNA를 분리하였다. 10 µg 정도의 total RNA를 이용하여 AMV reverse transcriptase 및 Taq polymerase를 이용한 RT-PCR [42°C 30 min, 95°C 10 min, 33 cycle PCR (94°C 30 sec, 45 °C 30 sec, 72°C 1 min), 72°C 3 min]을 수행하였으며 이때 primer (forward: 5'-aacatggagaacatcacatca-3'. reverse, 5'-ctagggtttaatgtataacc aaagac-3')는 0.7 kb HBsAg DNA가 증폭되도록 디자인하였다.

Filamentous fungi에 따라 hyg에 대한 농도별 감수성의 차이를 보이기 때문에 먼저 *P. eryngii* 형질전환체 선발을 위한 hyg 최저 농도를 결정하였다. 균사체 pellet을 30-100 µg/ml hyg 포함 PDA 배지에 옮겨 균사체 생육을 관찰하였으며 그 결과 50 µg/ml hyg 포함 배지에서 생장이 이루어지지 않음으로써 이를 형질전환체 선발을 위한 hyg 농도로 결정하였다.

P. eryngii 균사체의 형질전환을 위하여 pCamHBsAg를 지니는 *A. tumefaciens* LBA4404를 100 개 정도의 균사체 pellet과 동시배양을 실시 후 hyg 선발배지에서 10-15일 정도까지 hyg 저항성 균사체 출현을 관찰하였다. 그 결과, hyg 저항성 균사체의 출현은 전혀 관찰되지 않았다. 진공침윤 및 단순침윤, 18, 22, 25 및 28°C에서의 동시배양 그리고 1, 2 및 3일간의 동시배양 기간 등에 따른 차이점은 전혀 나타나지 않았다. 따라서 본 실험조건에서의 *P. eryngii* 형질전환을 위한 AMT는 그 실용성이 없는 것으로 판단되었다.

다음은 물리적 마찰이 가해진 *P. eryngii* 균사체 pellet에 대하여 AMT를 수행하였다. 산업용 연마제들 중의 하나인 Al₂O₃ 입자를 물리적 마찰에 이용하였는데 이는 새송이식물 균사체 단세포 형질전환에서 효과가 보고된 바 있다. 본 실험에서는 40 및 400 µm 직경의 두 종류 Al₂O₃ 입자를 반반씩 혼합하여 이를 pellet과 섞어 강하게 교반 후 AMT를 실시하였다. 그 결과 hyg 포함 PDA배지에서 100 개 정도 pellet들 중 20개 정도의 pellet에서 균사체 생육이 관찰되었는데 Al₂O₃ 처리에 의하여 AMT이용 형질전환 효율이 크게 증가하는 것으로 판단되었다. 한편 효율과 관련된 비교적인 AMT 실험에서 단순침윤 후 22°C에서 1-2일 간의 동시배양이 가장 효과적인 것으로 제시되었다.

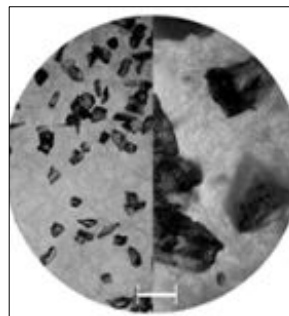


Fig. 302. Microscopic observations of aluminum oxide particles with the mycelium.

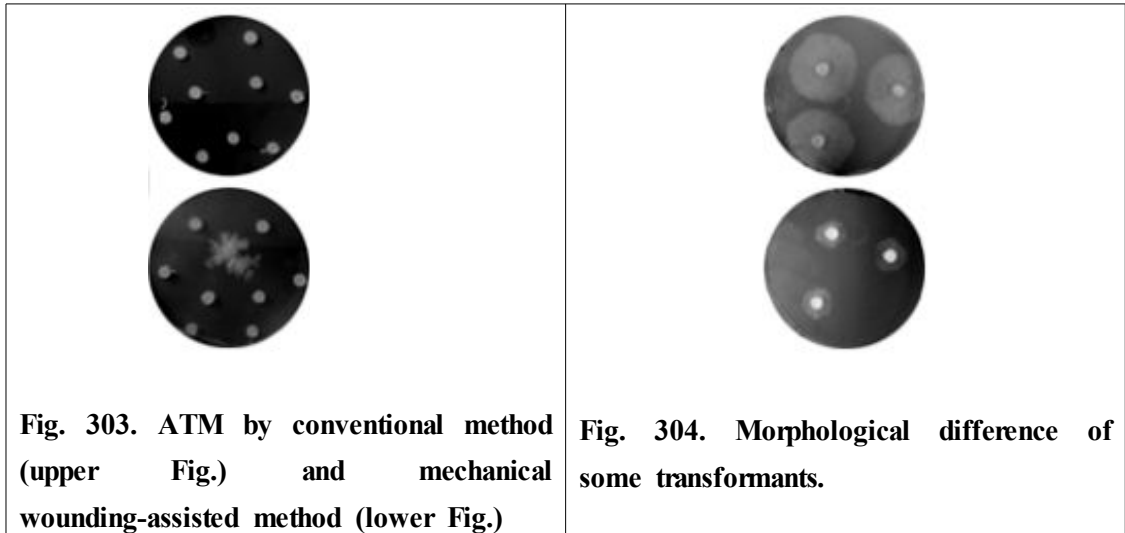


Fig. 303. ATM by conventional method (upper Fig.) and mechanical wounding-assisted method (lower Fig.)

Fig. 304. Morphological difference of some transformants.

Hyg 배지에서 일차적으로 선발된 균사체 pellet들을 대상으로 2차 선발을 실시하였다. 즉, 1차 선발된 각 균사체 말단부로부터 pellet을 채취하여 새로운 hyg배지에 옮겨주며 그 후 균사체가 직경 3-4 cm 정도 생육이 이루어졌을 때 가장자리 부위 균사체를 pellet으로 취해 2차 선발을 수행하였다. 다시 이들로부터의 가장자리 pellet을 PDA에 옮겨 생육시킨 후 형질전환분석에 이용하였다. 형질전환체에 따라 PDA에서의 생장속도 면에서 확연한 차이를 보이는 것도 관찰되었는데 유전자도입 분석을 위하여 상대적으로 정상적인 생육속도를 보이는 것들을 선택하여 분석하였다. 형질전환 및 비형질전환 균사체들로부터 추출한 genomic DNA를 이용하여 PCR을 실시한 결과 비형질전환체와는 달리 형질전환 균사체로부터는 *hph* DNA를 의미하는 830 bp DNA가 확연히 관찰되었다.

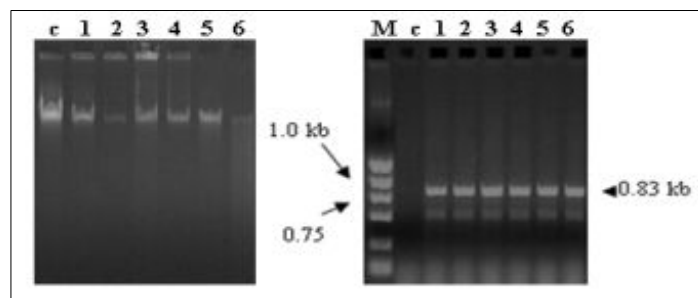


Fig. 305. Isolated genomic DNA (left) and PCR product from *hph* transgene (right)

P. eryngii DNA내에 *hph* DNA 도입이 PCR로 확인됨에 따라서 이들 형질전환체에서의 pCamHBsAg로부터 도입된 HBsAg의 발현을 RT-PCR로 분석하였다. Filamentous fungi에서의 외부유전자 발현을 위하여서는 일반적으로 ascomycetes나

basidiomycetes로부터의 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase genes (*gpd*)의 promoter가 주로 이용되는 편이다. 일부 보고에서는 CaMV35S promoter 이용이 소개된 바 있는데 본 실험에서는 pCHBs의 CaMV35S promoter와 연결된 HBsAg DNA 발현을 RT-PCR로 확인하였다. 균사체들로부터 total RNA를 추출 후 이들을 이용하여 먼저 RT-gradient PCR에 의한 적정 조건을 확인한 후 이를 이용하여 형질전환 균사체들에 대한 HBsAg mRNA생성을 확인하였다. 그 결과 모든 형질전환 균사체들로부터 700 bp PCR 산물을 확인할 수 있었다.

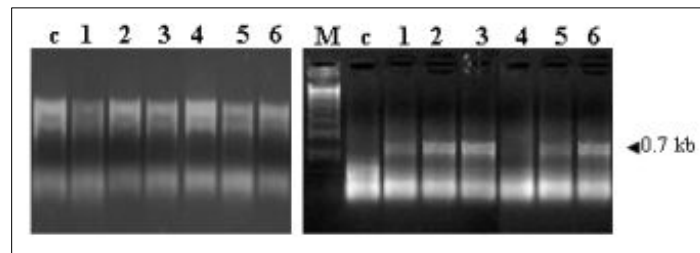


Fig. 306. Total RNA isolation (left) and RT-PCR (right)

본 연구에서는 기존 PMT 방법에 의존한 *P. eryngii* 형질전환과는 달리 AMT에 의한 형질전환체 제조를 시도하였다. 간편성과 용이성에서 장점을 지니는 AMT는 다양한 filamentous fungi의 형질전환에 적용되어 왔으나 그 효율성 및 실용적인 면에서의 개선이 필요한 현실이며 AMT를 이용할 수 없는 경우도 많다. 본 실험에서의 *P. eryngii* 경우 일반적인 AMT 방법의 적용 및 조건 변화 (단순침지나 진공침윤, 동시배양 온도 및 기간의 변화 등)에 따른 형질전환체 출현이 전혀 이루어지지 않았다. 그러나 *P. eryngii* 균사체에 Al₂O₃ 입자와의 단순 마찰을 제공함으로써 평균 20% 정도의 hyg 저항성 균사체가 출현하였는데 이는 매우 효율적인 AMT 방법으로서 제시할 수 있었다. 형질전환체 출현은 보통 10일 이내였으며 2-3차 선발기간을 거치는 경우 한달 정도의 기간 후에 안정적 DNA 도입이 이루어진 균사체를 확보할 수 있었다. 결론적으로 Al₂O₃와 같은 견고 미세입자를 이용한 균사체의 표면 마찰을 통하여 AMT 적용이 까다로운 *P. eryngii*의 형질전환이 훨씬 용이하게 되었으며 또한 HBsAg mRNA의 발현이 확인됨으로써 heterologous protein 발현을 위한 *P. eryngii*의 이용이 매우 용이하게 되었다.

(나) 기타 버섯류의 균사체 형질전환

새송이 균사체에 대하여 확립된 wounding-assisted ATM 법이 기타 버섯류의 형질전환에 대해서도 적용될 수 있는지를 실험하였다.

Ganoderma lucidum (KACC42231), *Lentinula edodes* (KACC42378), *Grifola*

frondosa (KACC50027), *Schizophyllum commune* (KACC43373), *Lyophyllum decastes* (KACC41766)을 Korean Agricultural Culture Collection으로부터 입수하였다. 형질전환용 vector는 pCambia1300 (CAMBIA, Australia)을 이용하였으며 이는 CaMV35S promoter: hygromycin phosphotransferase (*hph*) 구조 및 neomycin phosphotransferase 유전자를 지니는데 이를 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하여 새송이 형질전환체와 마찬가지로 co-cultivation에 이용하였다. 각 버섯의 fungal discs (5 mm in diameter)를 준비하여 이를 bacterial suspension과 섞어 agroinfiltration 및 co-cultivation (22°C, 2 day)을 수행하였으며 이 후 선발배지에 옮겨 형질전환체의 발생을 기대하였다. Wounding-assisted ATM을 새송이에서와 마찬가지로 수행 및 비교하였다.

Genomic DNA를 분리를 위하여 고체배지 상의 균사체를 모아 LN₂를 이용하여 분쇄하고 CTAB 방법으로 DNA를 추출하였다. 도입된 DNA 확인을 위하여 PCR [94°C, 5min: 35×(94°C, 30s; 65°C, 30s; 72°C, 1min): 72°C, 3min]을 실시하였으며 사용한 primers (forward, 5'-GTCGAGAAGTTTCTGATCGA-3', and reverse, 5'-GCTGCATCATCGAAATTGCC-3')는 *hph* gene으로부터의 830 bp DNA fragment 증폭을 위하여 디자인 되었다. Southern blot hybridization을 위하여 10 ug genomic DNA를 *EcoRI*으로 처리 후 1% agarose gel에서 전개시키고 Nytran membrane으로 옮겨 *hph* gene probe와 혼성화 반응을 일으키도록 하였다. pCambia1300 plasmid DNA를 template로 한 PCR product는 Bright-Star Psoralen-biotin nonradioisotopic labeling kit (Life Technologies, Calsbad, CA)으로 labeling하였다. 혼성화 반응 (5xSSC, 0.1% SDS, 5% dextran sulfate, 24 h, 60°C) 결과는 Bright-Star detection system으로 확인하였다.

형질전환체 선발을 위한 Hygromycin 사용 농도는 70, 30, 50, 70, 50 µg/mL 각각이 *G. lucidum*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *S. commune* and *L. decastes*를 위하여 결정되었다. 형질전환 시행 후 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 즉, *G. lucidum*, *L. edodes*, *G. frondosa* 및 *L. decastes*의 경우 일반적 ATM에서는 전혀 형질전환체를 얻을 수 없었는데 이에 비해 *S. commune*의 경우 형질전환율 [(No. of transformed fungal discs/No. of fungal discs tested)×100]은 1-2% 정도로 측정되었다. 200 µM acetosyringone-induced *Agrobacterium* cells을 사용하는 경우 형질전환 효율 증가가 없었는데 다만 *S. commune*의 경우 5-7 배가 증가하였다. Wounding-assisted experiment의 경우 평균 32, 17, 10, 56 및 15% 형질전환효율이 각각의 *G. lucidum*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *S. commune* 및 *L. decastes*에 대하여 측정되었다. *G. lucidum*의 경우 기존 유사 연구에서는 CaMV35S promoter: proinsulin

construct의 발현과 관련하여 효율에 대한 언급은 없었다. Protoplast-mediated transformation은 *L. edodes* 및 *commune*에 대하여 particle bombardment는 *L. decastes*에 대하여 유효한 것으로 보고된 바 있다.

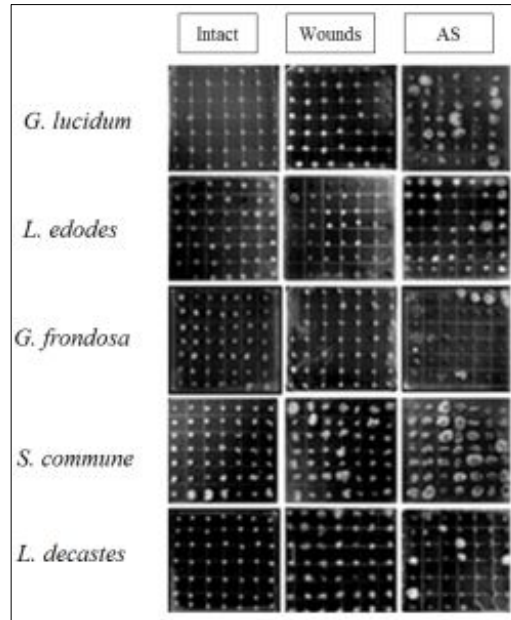


Fig. 307. Transformants are shown from the experiment using intact fungal discs (Intact) or acetosyringone-induced *Agrobacterium* (AS), or fungal discs with mechanical wounds (Wounds).

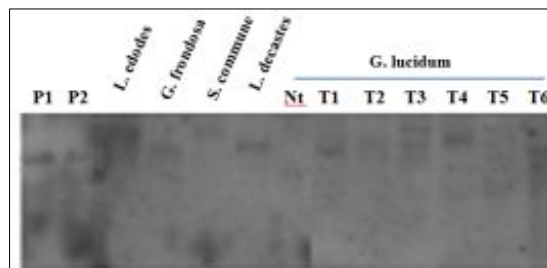


Fig. 308. Southern blot hybridization. P1 and P2 are serially diluted pCambia1300 plasmids digested with *Eco*RI. Nt and T1-T6 represent non-transformant and transformants of *G. lucidum*, respectively.

Southern blot hybridization 결과 integrated *hph* gene이 성공적으로 관찰되었는데 대부분의 hybridization signals이 single band로 나타나 T-DNA integration이 genome의 단일 locus에서 발생했음을 나타내고 있었다.

영지버섯의 경우 형질전환균사체가 다양한 형태로 나타남으로써 T-DNA 삽입에 의한 대사변화가 제기되었다.

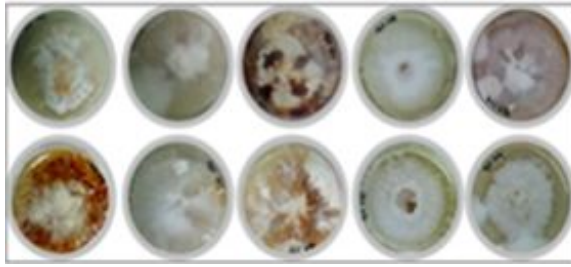


Fig. 309. Morphological differences in *G. lucidum* transformants.



Fig. 310. Confirmation of DNA transfer by PCR. 1-30: Transformants (1-30). Nt: non-transformant (Nt).

(5) HBsAg 발현 새송이 균사체를 이용한 식용간염백신 개발

HBsAg 유전자 도입 및 발현이 확인된 형질전환 균사체를 이용하여 이로부터 자실체 형성과 포자분리 및 품종으로서의 확립을 통하여 식용 간염백신으로서의 기능성을 연구하기 위하여서는 상당한 연구기간이 소요된다. 즉, 새로운 기능성 품종으로서의 확립을 위하여서는 최소 6개월에서 1년의 기간이 필요하다. 한편, mouse를 이용한 식용백신으로서의 기능성을 검정하기 위하여서는 최소 6개월의 기간이 소요된다.

따라서 본 연구에서는 연구기간을 고려하여 HBsAg 발현 균사체를 액체배양을 통하여 확보한 후 이를 이용하여 면역안정성과 식용백신으로서의 이용가능성을 연구하였다.

(가) 배경

Hepatitis B virus (HBV)는 전 세계적으로 퍼져있으며 인체에 치명적이다. HBV는 급성 간염, 만성 바이러스 보균자, 만성간염, 간경변(cirrhosis) 및 간암으로 진행되어 결국 사망에 이르는 질병인이다. 현재 안전하고 효과적인 HBV vaccine을 많은 국가에서 이용할 수 있으나 빈곤국가에서는 vaccine 가격문제로 그 혜택을 많이 받지 못하고 있는 실정이다. 이에 대한 대체안으로서 경제적인 식물에 기반한 식용백신의 개발이 이루어져 왔는데 인간환경으로의 이들 변형식물의 확산에 대한 염려로 인하여 그 사용이 매우 엄격하게 규제되고 있다. 따라서 식물세포배양이나 hairy root 와 같이 일정 규제 시설에서 배양할 수 있는 것으로 그 대체방법이 연구되어오고 있다.

새송이는 오랫동안 식용으로 이용된 버섯으로서 그 식용 안정성이 이미 일반인에

의하여 입증되어 있는 상태이며 또한 발효 장치를 통하여 용이하게 그 배양을 수행할 수 있는 장점이 있다. 또한 본 연구에서와 같이 균사체 형질전환이 가능한 만큼 식용 백신으로서의 개발가치도 충분할 것으로 기대할 수 있다.

(나) 새송이 균사체의 면역안정성 평가

① Mice에 균사체 투여 및 체중과 기관 변화

4주령의 specific pathogen free 슛컷 BALB/c mice를 일주일간 순화시킨 뒤 균 분리하여 실험하였다. Mice는 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 환기횟수 12~15회/시간, 조명시간 12시간 (오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 조건이 설정된 사육실에서 사육하였다. 사료는 멸균된 실험동물용 고형사료를 자유 섭취시켰다. 음용수는 고압증기멸균하여 자유 섭취시켰으며 mice 케이지 역시 고압증기멸균후 사용하였다. Mice는 새송이균사체 투여량에 따라 500, 50, 5, 0.5 mg/kg 체중 투여군과 증류수 투여 대조군으로 나뉘었으며 각 군당 20 마리씩의 mice를 사용하고 기본적으로 2회 반복 실험하였다. mice에게 위장관내 투여 (gastric intubation)하였는데, 1회 투여 용량은 200 μl 였고 4주간 주 5회씩 투여하였다.

일주일 2회씩 3일 간격으로 몸무게를 측정하였으며, 투여 종료 3일 후 mice를 희생 부검하고 비장, 폐, 간, 신장 등 주요 장기의 무게를 측정하였고, 특히 비장은 비장세포 배양을 위해 무균적으로 채취하였다. 심장채혈을 통해 혈액을 채취하고 혈액에서 분리된 혈장은 사용 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 간과 신장은 포르말린에 보관 후 조직표본을 만들었고 hematoxylin-eosin염색을 실시하여 조직병리변화를 평가하였다.

② 혈청내 IgE와 IgG 비장세포 배양액내 cytokine와 IgG 측정

혈장내 IgE 수준을 대조군 mice와 비교분석하기 위해 sandwich ELISA 방법에 의해 total IgE를 정량하였다. Rat anti-mouse IgE capture antibody를 Immulon 2 plate에 첨가한 다음 냉장상태에서 24시간 정치시키고 이후 1% BSA-PBS로 non-specific binding을 차단한 다음 희석된 실험혈장 및 표준 IgE를 첨가하고 냉장상태에서 24시간 정치시켰다. 다음날, biotinylated rat anti-mouse IgE를 첨가하여 2시간 실온에서 정치시켜 detection antibody가 부착하게 한 다음 avidin-peroxidase를 넣고 다시 1시간 실온에서 정치시켰다. 이후 ABTS로 발색을 유도한 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. IgG의 isotype인 IgG1 및 IgG2a의 수준을 측정하기 위해서는 goat-anti mouse IgG1 및 IgG2a capture antibody와 peroxidase conjugated anti-mouse IgG detection antibody를 사용하는 sandwich ELISA 방법을 이용하였다.

IgE 및 IgG1의 isotype switching을 유도하는 interleukin-4 (IL-4)를 중심으로 한 type-2 cytokine과 이 cytokine들의 역할에 길항작용을 미치는 interferon-gamma

(IFN γ)등 type-1 cytokine들의 생성능력을 비교 분석하는 것은 기본적인 세포면역능을 평가하는 방법으로 고려되고 있다. 이를 위해 각 mouse에서 spleen을 채취한 뒤 이 splenocytes들을 24 well-culture plate에 분주한 뒤 CO₂ 배양기에서 48 hr 배양하였다. *In vitro* 활성화를 위해 polyclonal stimulator로 phytohemagglutinin (PHA, 5 ug/1 x 10⁶ cells)을 첨가하였고, 세포배양액 내 cytokine 수준 정량은 sandwich ELISA 방법에 의하였다. B림프구의 *in vitro* 활성화를 위하여 B 림프구 특이 polyclonal stimulator인 lipopolysaccharide (LPS, 1 ug/1 x 10⁶ cells)를 첨가한 후 일주일간 배양하였고, 배양액내 IgG1, IgG2a의 수준 정량은 혈장내 IgG와 동일한 sandwich ELISA방법에 의하였다.

③ 면역병리 비교 결과

4주간 균사체를 위장관내 투여한 mice와 3차 증류수 투여 대조군 mice간 체중의 변화를 관찰한 결과 체중 kg 당 500, 50, 5, 0.5 mg의 균사체를 투여한 실험군 및 대조군 사이에서는 유의한 체중 변화를 관찰할 수 없었다. 4주간 투여 후 채취한 mice의 주요 장기인 비장, 간, 폐의 무게를 균사체 투여 실험군 및 대조군간 비교한 결과 역시 유의한 무게변화를 관찰할 수 없었다. 간과 신장의 조직변화를 관찰하였는데 체중 kg 당 500 mg의 균사체 투여한 실험군과 대조군 사이에서 유의한 조직병리학적 변화를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과들은 체중 kg 당 최대 500 mg까지 균사체를 4주간 아급성으로 투여하는 경우 용매 투여 대조군과 비교할 때 일반적인 면역병리학적 소견에 있어서 유의한 유해성을 초래하지 않음을 보여주는 것이다.

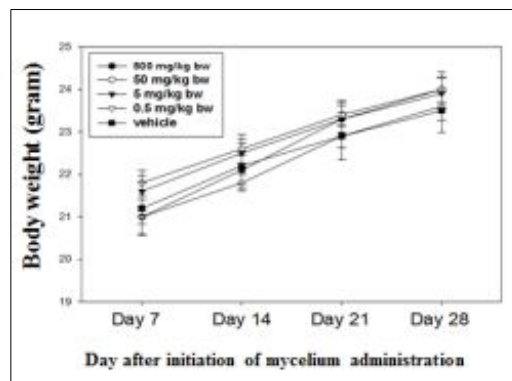


Fig. 311. Changes in body weight gain among the groups administered with various doses of mycelium or the vehicle.

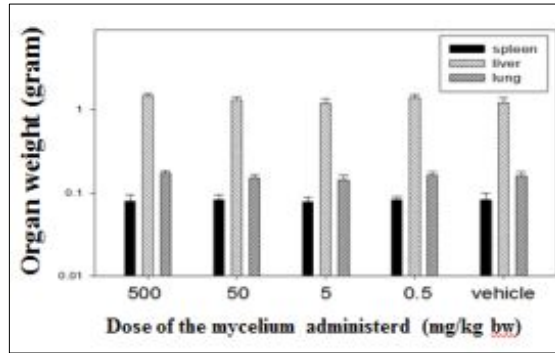


Fig. 312. Changes of spleen, liver, and lung weight among the groups administered with various doses of mycelium or the vehicle.

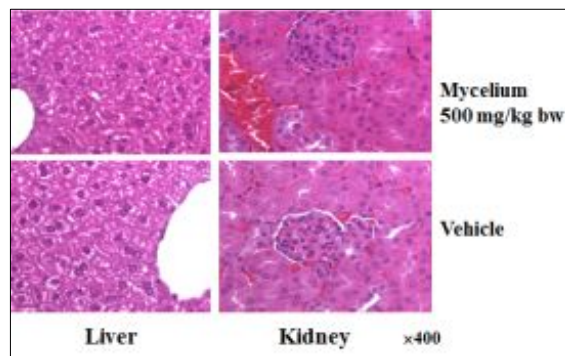


Fig. 313. Histopathological comparison of liver and kidney by Hematoxylin & Eosin staining,

④ 균사체 투여 및 체액면역의 변화

IgE 및 IgG1은 Helper T cell의 한 종류인 type-2 helper T cell에서 분비되는 IL-4에 의하여 isotype switching이 유도되는 항체로서 호흡기 과민반응 등 알레르기성 과민반응 발생시 증가되는 항체이며, IgG2a는 type-1 helper T cell에서 분비되는 IFN γ 에 의해서 isotype switching이 유도되는 항체로 IL-4의 생성 수준이 항진되면 감소되는 것으로 알려져 있다. 이러한 IgE 또는 IgG1과 IgG2a의 상대적 수준의 변화는 체내 체액면역능의 변화를 예측해볼 수 있는 주요 지표로서 여겨지고 있다. 혈장내 IgG1 및 IgE의 농도는 균사체 투여군들과 대조군 사이에서는 유의한 차이가 없었다. 또한 혈장내 IgG2a 농도에 있어서도 5 mg/kg 체중 투여군과 0.5 mg/kg 체중 투여군 간을 제외하고는 유의한 차이가 없었다. 5 mg/kg 체중 투여군의 경우 0.5 mg/kg 체중 투여군에 비해 유의하게 높은 IgG2a의 농도를 보였는데, 이러한 유의성은 체중 kg 당 500, 50mg 투여군과 0.5 mg 투여군간 유의한 차이가 없음을 보면 균사체 투여농도 차이에는 기인하지 않은 것으로 판단된다. 비장세포에서 B 임파구를 LPS로 활성화시켜 항체 생성을 유도한 결과 역시 IgG1이나 IgG2a 농도에서 군간 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 한편, IgG2a와 IgG1 농도비(IgG2a/IgG1 ratio)는 바이러스나 암세포에

대한 저항력을 나타내는 type-1 response와 알레르기 반응으로 대표되는 type-2 response가 개체별로 어느 한쪽으로 편향되어 있는지를 추측하는 지표치로 이용되기도 한다. *In vitro*에서 B 임파구를 활성화시켜 IgG1과 IgG2a 생성을 유도하고 각 항체의 상대적인 수준을 농도비로 계산한 결과, 투여군들과 대조군 사이에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 아울러 혈장내 각 항체의 수준을 비로 계산한 결과에서도 5 mg/kg 체중 투여군과 0.5 mg/kg 체중 투여군 간을 제외하고는 유의한 차이가 없었다. 5, 0.5 mg/kg 체중 투여군 사이의 차이는 IgG2a 수준에 있어서 두 군 간 차이가 있었음에 기인하는 것으로 판단된다. 본 결과는 체중 kg 당 최대 500 mg까지 균사체를 4주간 아급성으로 투여한 경우 IgG1, IgG2a, IgE 항체 수준에 유의한 변화를 초래하지는 않는 것으로, 궁극적으로 균사체 섭취는 type-1 response와 type-2 response 사이에 있어서 불균형을 가져오는 면역독성은 없음을 의미한다고 볼 수 있다.

		Dose of the mycelium administered (mg/kg bw)				
		500	50	5	0.5	vehicle
Plasma	IgG1 (mg/ml)	2.01 ±0.67	2.46 ±1.12	2.51 ±0.76	2.96 ±2.15	2.43 ±0.87
	IgG2a (mg/ml)	0.96 ±0.87	1.09 ±0.43	1.81 ±1.03	0.94 ±0.55*	1.04 ±0.29
	Ratio (IgG2a/IgG1)	0.45 ±0.33	0.50 ±0.25	0.74 ±0.42	0.34 ±0.10*	0.48 ±0.21
	IgE (ng/ml)	198±92	334±123	299±119	235±106	284±66
Culture supernatants	IgG1 (μg/ml)	3.42 ±2.76	2.98 ±2.73	2.45 ±1.56	2.94 ±2.04	4.82 ±3.93
	IgG2a (μg/ml)	1.21 ±0.77	1.10 ±0.48	1.03 ±0.34	1.24 ±0.40	1.43 ±0.88
	Ratio (IgG2a/IgG1)	0.42 ±0.17	0.86 ±0.86	0.53 ±0.19	0.55 ±0.25	0.54 ±0.42

Table 31. Distribution of IgG isotype and IgE in the plasma or culture supernatants

Splenic lymphocytes were stimulated with LPS for one week and the culture supernatants were collected for IgG isotype measurement. Values represent mean±SD of two representative experiments. The ratios (IgG2a/IgG1) were obtained through dividing amount of IgG2a by amount of IgG1. * indicates the statistically significant difference ($p < 0.05$) between the 5 mg/kg bw administered mice and the 0.5 mg/kg bw administered mice.

⑤ 균사체 투여가 면역에 미치는 영향

IL-4와 IFN γ 는 각각 type-2 helper T cell과 type-1 helper T cell에서 분비되는 대표적인 cytokine으로서 어느 한쪽의 cytokine 분비가 우세할 때는 다른 cytokine의

합성, 분비가 저해되는 상호 길항작용을 가지고 있어 체내 type-2 response와 type-1 response간 세포면역의 항상성 유지여부를 판단하는 주요한 척도로 이용되고 있다. 이들 cytokine 생성에 있어서 항상성 조절이 이상이 있을 때는 여러 가지 면역병리학적 이상 상태를 가져오는데, 특히 type-2 response가 상대적으로 우세할 때는 세균, 바이러스 등 미생물 감염에 대한 방어력 저하, 알레르기 발생, 일부 자가면역질환 발생 등을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 비장세포 중에서 T 임파구만을 활성화시키는 PHA를 사용하여 투여 실험군 및 대조군의 비장 T 임파구를 *in vitro*에서 활성화시킨 결과, 투여군들과 대조군 사이에서 유의한 IL-4와 IFN γ 생성의 차이를 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 군사체 투여가 type-1 response와 type-2 response 중 어느 한쪽을 선택적으로 향진 또는 억제하는 비정상적인 세포면역조절작용을 나타내지 않음을 의미하는 것으로 T 임파구 중심 세포면역력에 독성을 미치지 않는 것으로 판단된다.

	Dose of the mycelium administered (mg/kg bw)				
	500	50	5	0.5	vehicle
IL-4 (pg/ml)	8.25±6.85	4.11±4.02	5.76±5.77	12.79 ±11.95	5.92±4.96
IFN γ (ng/ml)	9.33±6.89	8.20±5.76	12.30 ±4.13	11.49 ±11.69	10.06 ±4.82

Table 32. IL-4 and IFN γ production *in vitro* from the mycelium-administered mice splenocytes. Splenic lymphocytes were stimulated with PHA for 48 hours, and the culture supernatants were collected for cytokine ELISA. Values represent mean±SD of two representative experiments.

(다) HBsAg 군사체의 경구투여에 의한 항체형성 분석

① HBsAg 군사체의 mouse투여

Mice의 HBsAg 군사체 투여량은 많은 항원 양을 노출하기 위해서는 500 mg/kg 체중을 사용하는 것을 타당하나 위장관내 투여(gastric intubation)시 현탁액의 농도가 진하여 투여의 어려움이 있어 그다음 농도인 50 mg/kg 체중 투여군과 증류수 투여군으로 나누어 실험하였다. Commercial vaccine을 0.5 μ g sub-immunogenic dose (완전 면역용량은 1회 투여 시 20 μ g)로 1차 면역 주사하였고 일차 실험에서는 HBsAg 군사체 투여군과 HBsAg 군사체와 cholera toxin을 혼합한 투여군, 증류수군으로 나누어 실험하였다. HBsAg 군사체를 위장관내로 투여 하였을 때 소화·흡수가 쉽고, 음식물로 인한 역류를 방지하기 위하여 투여 2시간 전에 절식을 수행하였다.

일차 실험의 경우 1차 면역주사는 commercial vaccine 0.5 μ g sub-immunogenic dose를 근육주사하였고, 일주일 뒤 HBsAg 균사체 (100 ng HBsAg/g mycelium)를 mouse 한 마리당 1.25 mg씩 위장관내 투여하였고, 4주간 주 2회씩 총 8회 투여하였다. 투여가 끝난 뒤 안와채혈을 통하여 간염 항체를 측정하였다. 2차 면역주사는 1차 8회 투여가 끝난 뒤 HBsAg 균사체를 4주간 주 5회씩 총 20회 위장관내 투여를 하였고, 투여 중간에 안와 채혈을 통해 간염 항체의 수준을 측정하였다. 투여가 끝난 뒤 한 달 후에 심장채혈을 통하여 얻은 혈장에서 간염 항체의 수준을 측정하였다.

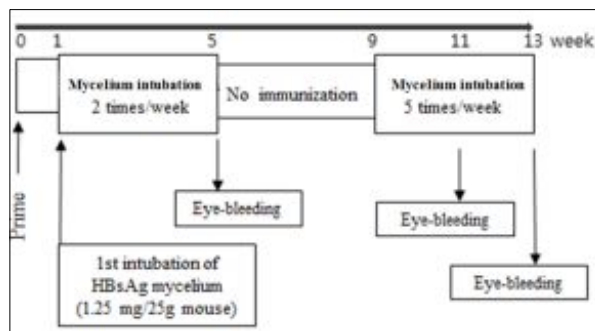


Fig. 314. HBsAg mycelium vaccination schedule (1st)

이차 실험에서는 2차로 HBsAg 균사체를 경구 투여하기 전에 상용백신 0.5 μ g sub-immunogenic dose를 근육주사하고, HBsAg균사체 투여를 1주 2회, 총 8주를 시행하였다. 투여가 끝난 뒤 3일 후에 간염 항체의 수준을 측정하였다.

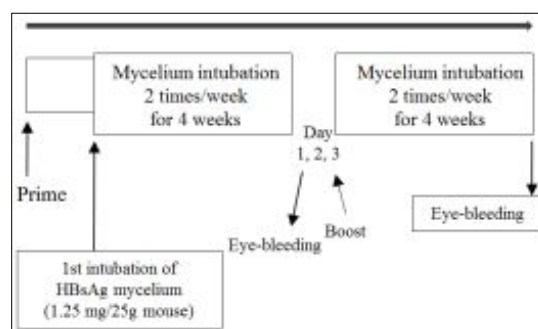


Fig. 315. HBsAg mycelium vaccination schedule (2nd)

혈장 내 존재하는 감염 바이러스 항체의 수준을 측정하기 위하여 자동 면역 효소 분석기 (IMx, Abbot)와 AUSAB enzyme immunoassay (EIA) diagnostic kit (Abbot)을 이용하여 항체의 수준을 정량하였다. 각 군간 측정치의 유의한 차이는 SigmaPlot

을 이용하여 검토하였다. 일차적으로 자료의 정규분포 여부를 검증한 뒤 single factor ANOVA 와 Dunnett's *t*-test 혹은 Kruskal-Wallis ANOVA와 Dunn's test로 유의성을 검정하였다. 필요에 따라 Student's *t*-test 또는 Mann-Whitney test로 추가 유의성 검정을 시행하였고 *p* value가 0.05 이하일 때를 유의한 차이로 판정하였다.

② HBsAg 항체형성 분석 결과 (Prime + oral)

1차 실험에서 HBsAg 균사체를 경구로 4주 동안 8회, 18회, 28회 투여한 후 간염 항체 수준을 측정하였다. 상용백신만을 투여하고 HBsAg 균사체를 경구투여 하지 않은 대조군 (46 mIU/ml)에 비해 상용백신 투여와 HBsAg 균사체 투여군(261 mIU/ml)의 간염 항체 수준이 높았다. 또한, 18회 투여를 정점으로 지속적으로 투여하더라도 항체 수준의 변화는 없었다(18회 : 294 mIU/ml, 28회: 261 mIU/ml). Cholera toxin은 점액 면역 촉진제로서 이를 혼합 투여 시 그 효과를 확인하지 못하였으며 오히려 항체 생성이 저하 되었다.

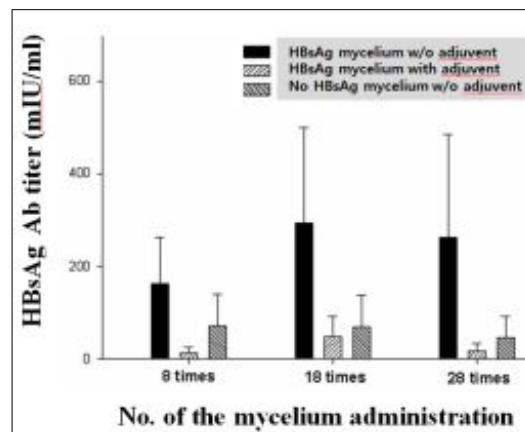


Fig. 316. Elevation of HBs Ab titer in the BALB/c mice administered with the HBsAg-expressing mycelium in the absence (black bar) or presence (clear hatched bar) of cholera toxin adjuvant. Grey hatched bar represents the mice administered with distilled water.

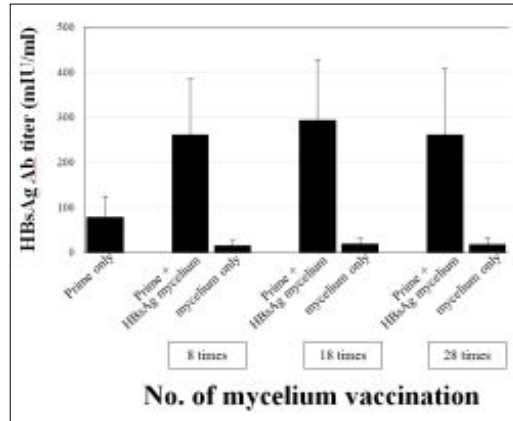


Fig. 317. Elevation of HBs Ab titer in the BALB/c mice administered with the HBsAg-expressing mycelium for various times.

③ HBsAg 항체형성 분석 결과 (Prime + oral/booster + oral)

1차 실험에서 HBsAg 균사체의 면역증대능력을 확인한 바, 생성되는 항체의 수준을 높이기 위해 2차 실험에서는 1차 본 실험과 다르게 4주 동안 8회 투여 후 상용간염 백신을 추가로 주사 후 재차 균사체를 경구 투여 하였다. 그 결과, 상용백신 1회 투여 후 균사체 8회 투여한 다음의 간염 항체 수준(535 mIU/ml)에 비해 추가로 상용백신 1회 투여하고 다시 8회 균사체를 경구 투여한 경우에 (5760 mIU/ml) 약 10배의 간염 항체 수준이 보였다. 상용백신을 2회 모두 투여 하더라도 HBsAg 균사체를 투여하지 않은 경우는 (655 mIU/ml) 2회 모두 상용백신을 투여하고 경구투여한 경우에 비해 약 1/10의 간염항체 수준을 보였다. 아울러 상용백신 2회 투여하고 HbsAg 균사체를 처음 1달 동안만 투여한 경우 역시 추가 1달을 더 투여한 경우에 비해 유의하게 낮은 간염 항체 수준을 보였다. 결론적으로 HBsAg 균사체 섭취는 준 면역용량 투여로 시작된 간염항체 생성에 관한 면역반응을 증폭시켜 개체의 간염 항체 형성능력이 개선되는 결과를 가져왔다.

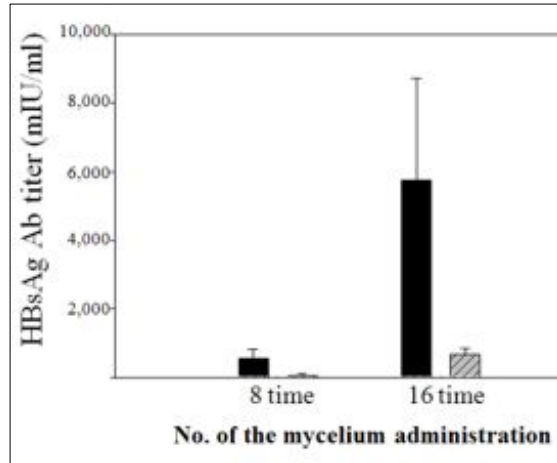


Fig. 318. Elevation of HBs Ab titer in the BALB/c mice administered with the HBsAg mycelium (black bar) and the mice administered with distilled water (grey hatched bar). Both group of the mice were injected two time with sub-immunogenic dose of the commercial vaccine.

(라) 결론

* 본 연구에서는 새송이 균사체를 mice에 위장관내로 반복투여 후 면역안전성을 평가하였으며 HBsAg발현 균사체를 경구로 투여하였을 때 간염 항체의 형성을 평가하였다. 실험결과에 대한 요약은 다음과 같다.

* 체중 kg 당 500, 50, 5, 0.5 mg의 균사체를 투여한 mice의 체중, 비장을 포함한 주요 장기의 무게 및 조직병리학적 소견에서 용매만을 투여한 대조군에 비하여 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

* 체액면역의 주요 지표치인 혈장내 IgG1, IgG2a, IgE 수준 및 비장 B 임파구 활성화에 따른 IgG1과 IgG2a 생성능력에 있어서 투여군들과 대조군간 유의한 차이가 없었는데, 이는 균사체 섭취가 체액 면역능에 유의한 변화를 초래하지는 않는 것으로 판단할 수 있는 근거가 되었다.

* 비장 T임파구를 *in vitro*에서 활성화시킨 결과, 균사체 투여군들과 대조군간 IL-4 및 IFN γ 생성에 있어서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 본 결과는 균사체 섭취가 IL-4와 IFN γ 생성으로 대표되는 type-2 및 type-1 세포면역능에 유의한 영향을 미치지 않는음을 제시하는 것으로 생각된다.

* 1차 경구백신 실험에서는 상용백신을 투여하고 HBsAg 균사체를 경구 투여하지 않은 대조군에 비해 상용백신 투여와 HBsAg 균사체 투여군의 간염 항체 수준이 높았

다. 이로써 HBsAg 균사체의 immuno-booster effect임을 확인 할 수 있었다.

* 2차 경구백신 실험에서는 상용백신 2회 투여 및 HBsAg 균사체 경구 2회 투여군이 상용백신 1회 투여 및 HBsAg 균사체 경구 1회 투여군보다 약 10배의 간염항체 수준이 높았다. 이는 HBsAg 균사체 섭취에 의해 간염항체 생성에 관한 면역반응을 증폭시켜 개체의 간염 항체 형성능력이 향상된 것으로 판단할 수 있다.

* 본 결과는 경구 투여만으로써 면역원성이 발휘되기 힘들지만 상용백신을 이용한 경우에 있어서 상용백신의 항체 형성 능력을 훨씬 증가시켜주는 면역 기능 항진제로서의 HBsAg 균사체 기능이 뚜렷한 것을 알 수 있었다.

바. 항당뇨 기능성 식용백신의 개발

(1) Glutamic acid decarboxylase (GAD67) cloning

췌장에서 생성되는 단백질의 하나인 glutamic acid decarboxylase (GAD67)는 인슐린의 존성 당뇨(Insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM)의 발생 (Type I)에 관련이 되어있는 것으로 알려져 있다. 최근 연구결과에 의하면 GAD67를 mouse에 경구 투여하는 경우 당뇨병을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있는데 이는 GAD67 항원에 대한 항체형성과 이로 인한 자가면역증상의 경감에 의하는 것으로 나타났다. 한편, 경구투여에 의한 효과를 보기 위한 경우 많은 양의 재조합 단백질이 필요하며 이를 박테리아나 동물세포에 의한 생산에 의한 경우 고비용이 소요되어 결국 경제성을 잃게 된다는 결론을 얻게 되었다. 순수 단백질의 경구투여의 고비용 문제를 해결하기 위한 대안으로 형질전환식물에 GAD를 발현 및 생산시켜 이를 식용당뇨백신으로 개발하는 연구가 시도되었다. 형질전환 감자나 담배식물에 GAD67유전자를 발현시켜 IDD의 발생으로 발전되는 non-obese mouse에 경구투여하였을 때, 비처리구에서는 70%가 당뇨병이 발생하였으나 처리구에서는 20% 만이 발생하는 결과가 보고된 바 있다.

본 연구에서는 새송이버섯에서의 GAD67발현을 통한 식용백신의 개발을 염두에 두고 기본적인 cloning을 실시하였다. 버섯으로의 형질전환을 위한 fungal vector로의 재조합을 실시하고 균사체로의 도입 및 그 발현확인 그리고 균사체를 이용한 1형 당뇨 식용백신으로서의 가능성을 연구하고자 하였다.

(가) Bacterial cloning과 발현

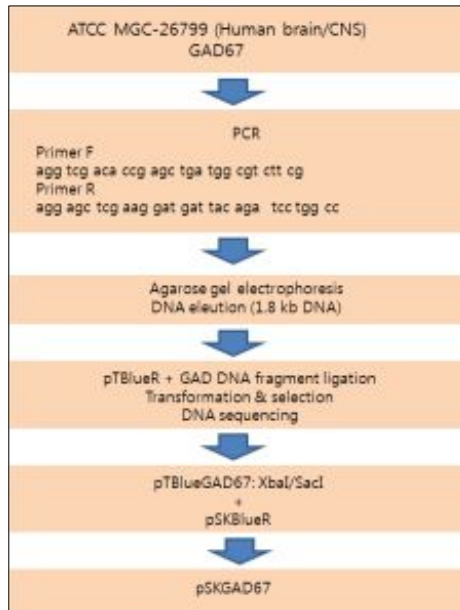


Fig. 319. Cloning of GAD67

PCR (30 cycle 반응: 94°C, 30 sec; 53°C, 30 sec; 72°C, 2 min)을 위하여 GAD염기 서열의 개시 codon에 연결시킨 forward primer (agg tcg aca ccg agc tga tgg cgt ctt cg)와 reverse primer (종결 codon에 이어 *SacI* site를 포함하는 agg agc tcg aag gat gat tac aga tcc tgg cc)를 사용하였다. PCR product는 pT7BlueR (Novagen, Darmstadt)에 접합시켜 *E. coli* DH5에 형질전환 하였다 (pT/GAD1). pT/GAD1의 확인은 restriction mapping과 또한 T3 및 T7 promoter지역을 primer로 이용한 양방향에서의 부분적인 DNA 염기서열분석을 통하여 확인하였는데 기존의 보고와 동일하게 나타났다. 이는 pBluescriptII SK의 *XbaI*과 *SacI* 위치에 subcloning을 실시하여 pSK/GAD1을 얻었다. pSK/GAD1를 지닌 박테리아세포들은 LBamp 배지에서 대수기 초기단계까지 배양한 후 (OD₆₀₀ = 0.5), IPTG (2 mM)를 처리하였으며 적절한 시간까지 배양하여 원심분리 (12,000 x g, 5 min)에 의하여 균체를 수집하였다. 균체는 추출 buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.1% Tween 80, 2 mM PMSF)에 현탁시킨 후 초음파분쇄 (2 min, 3x)하였다. 이로부터의 inclusion bodies는 원심분리 (12,000 x g, 20 min, 4°C)를 통한 침강물질로서 수확하였으며 이를 SDS-PAGE와 immunoblot에 의하여 단백질생성을 분석하였다. SDS-PAGE 분석에서는 IPTG 1 hr 처리에서 약 67,000 Da. 단백질의 유도 발현이 확실히 관찰되었으며 이는 실험상에서 처리된 5 hr까지 지속되었다. SDS-PAGE에서 분석한 inclusion body의 단백질은 PVDF membrane로 전이하여 GAD67에 대한 단일항체와 alkaline phosphatase-reacting chromogenic substrate를 이용하여 western blot 분석을 수행하

였다. 그 결과로써 SDS-PAGE 상에서 IPTG에 의하여 유도 발현되는 67,000 Da.단백질은 전이된 지역에서 mAb-GAD1를 인식하여 반응색깔을 나타냈다. 이로써,1.8-kb DNA가 발현단백질의 크기 및 면역반응의 결과에서 판단할 때 GAD1 단백질 전체 정보를 지님을 확인할 수 있었다.



Fig. 320. Analysis of PCR-cloned GAD67 DNA sequence

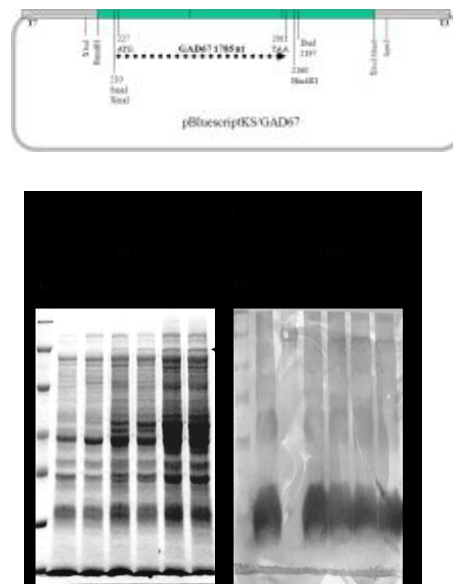


Fig. 321. Construction map of pKSGAD67 and IPTG-induced GAD67 analyzed by SDS-PAGE and western blot.

(나) 새송이 발현용 GAD67 발현벡터 제작

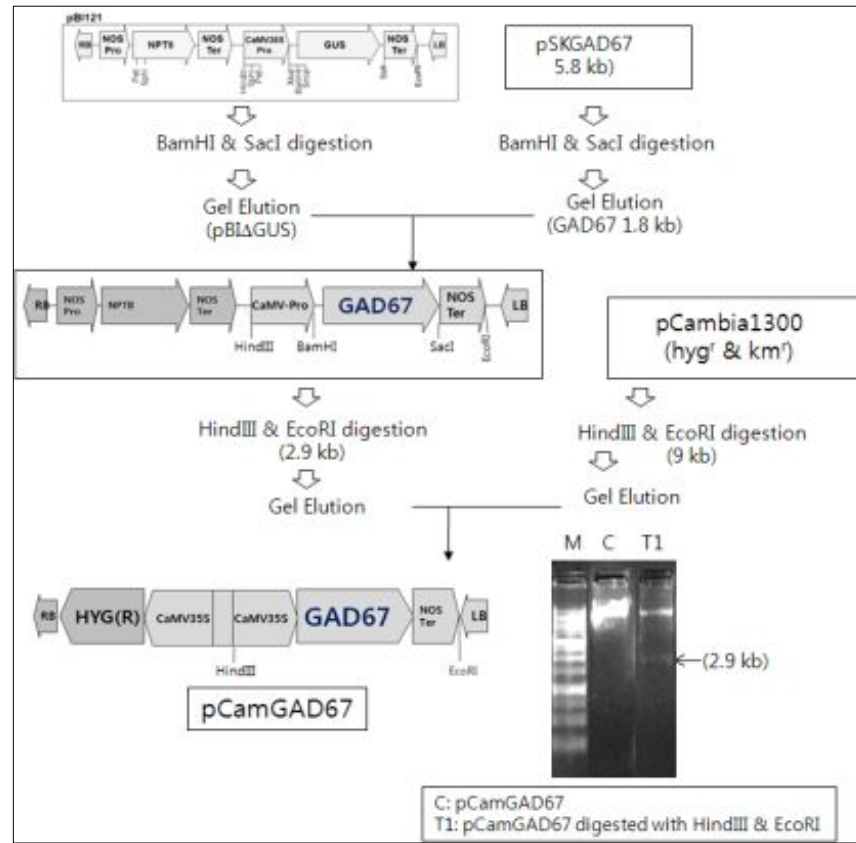


Fig. 322. Construction of pCamGAD67

(2) 균사체 GAD67 발현분석

(가) 균사체 형질전환 및 확인

pCamGAD67을 지닌 *Agrobacterium*을 이용하여 이미 언급한 바 있는 Mechanical wounding-assisted ATM에 의하여 새송이 형질전환을 수행하였다. Hyg 저항성을 지니는 균사체는 2차적으로 균사체 가장자리를 pellet으로 제조하여 새로운 항생제 선발 배지에 옮겼으며 이후 다시 pellet 형태로 새로운 배지에 옮겨 균사체를 충분히 배양 후 실험에 사용하였다. 이들 형질전환체의 HBsAg DNA삽입은 genomic DNA PCR로 최종 확인하였으며 HBsAg 단백질 발현은 western blot에 의하여 확인하였다.

(나) Microwave-assisted protein extraction과 western blot에 의한 GAD67발현 확인
Western blotting을 수행하기 위한 첫 번째 작업은 세포분쇄에 있는데 본 연구를 통하여 microwave를 이용한 간단한 단백질 추출법을 개발하게 되었다. 곰팡이 세포는 매우 단단한 세포벽을 지니고 있으며 이를 파쇄하기 위하여서는 다양한 물리적 화학적 방법이 제시되고 있다. 그러나 동시에 많은 sample로부터 단백질을 추출하기 위하여서는 많은 시간이 요구되는 지루한 작업이 요구된다. 효모와 같은 경우 단백질을 추출을

위하여 hot-alkali 방법이 자주 이용되는데 alkali 조건에서 10 min 정도 끓이는 방법이다. 단점으로는 alkali 조건에서 단백질의 분해가 일어날 수 있고 끓이는 작업 역시 시간적으로 지루할 수 있다. Microwave는 극성을 지닌 분자들의 마찰을 유도하여 열을 발생시키는데 이로써 세포 파쇄가 일어나고 세포내 물질이 방출된다. 이미 mRNA 나 viral RNA의 신속한 추출을 위하여 microwave를 이용한 보고가 있다. 본 연구에서는 pCamGAD67이 도입된 균사체에 대하여 가정용 microwave를 이용한 단백질 추출을 시도하였다. 추출물은 SDS-PAGE로 확인하고 단백질의 안정성은 GAD67에 대한 western blot으로 확인하였다.

① Microwave-assisted protein extraction

100 mg 정도의 균사체를 모은 후 이를 증류수에서 세척하고 250 μ l의 alkaline 또는 neutral extraction buffer로 섞은 후 15 ml glass tube로 옮겨 뚜껑을 단단히 닫았다. Alkaline buffer 구성은 0.1 M NaOH, 4% SDS, 1% b-mercaptoethanol, 5% glycerol이며 neutral buffer 구성은 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 1% b-mercaptoethanol, 5% glycerol이었다. Sample은 10 min 정도 끓이거나 30-45 sec microwave 처리 후 조사, 원심분리에 의하여 상등액을 얻은 후 이를 SDS-PAGE로 분석하였다.

먼저 hot alkali method를 이용하여 yeast와 새송이 균사체의 단백질 추출을 시도한 결과 효과적으로 단백질 추출이 일어남을 알 수 있었다. Microwave방법을 이용하는 경우에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었는데 30 sec정도의 처리만으로도 충분한 결과가 나왔다. 한편 neutral buffer를 이용하는 경우에 있어서도 거의 동일한 결과를 초래함으로써 NaOH가 불필요하다는 것이 제시되었다.

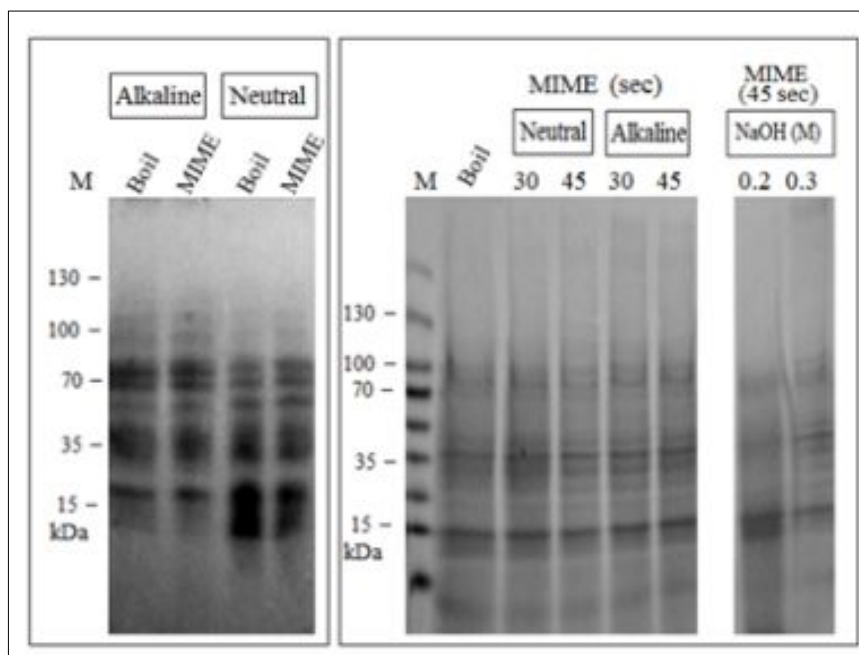


Fig. 323. Microwave irradiation-mediated extraction (MIME) and analysis of protein extracts by SDS-PAGE. Left panel in A: Yeast cells were either boiled for 10 min (boil) or subjected to MIME for 45 sec in either alkaline or neutral buffer conditions. The protein extracts were resolved on 10 - 18% gradient SDS-PAGE gels. Right panel in A: Mycelium cells were subjected to either boiling for 10 min or MIME for 30 or 45 sec in either alkaline or neutral buffer conditions. Mycelium cells were also subjected to MIME for 45 sec in alkaline buffer conditions containing a higher NaOH concentration (0.2 or 0.3 M). M, protein size marker.

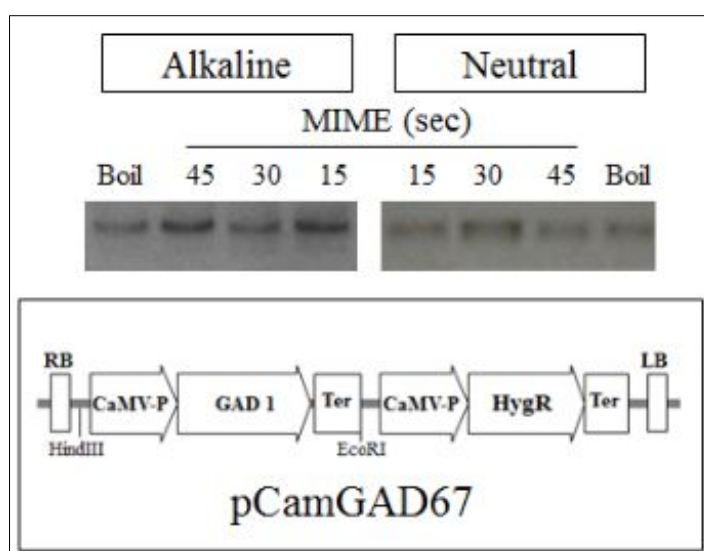


Fig. 324. Microwave irradiation-mediated extraction (MIME) and analysis of protein extracts by western blot. Upper panel shows the GAD67 protein expressed and detected by western blot. Lower panel shows the GAD67 expression plasmid map.

PCR로 확인된 GAD67 형질전환 균사체에 대하여 마찬가지로 boiling 또는 microwave를 처리하고 추출 단백질을 western blot으로 분석하였을 때 단일 단백질 band가 polyclonal GAD67 antibody에 반응하는 것으로 나타남으로써 microwave방법의 실효성이 더욱 입증되었다. 더욱이 15 sec microwave에서도 45 sec 처리와 마찬가지로의 결과가 나타났다.

② Microwave-assisted DNA extraction

간단한 microwave 처리에 의하여 단백질과 같은 거대분자가 추출되는 것에 근거하여 PCR용 DNA도 추출 가능한지 boiling방법과 비교하여 분석하였으며 그 결과 boiling방법은 효과가 없었으나 microwave방법을 매우 효과적인 것으로 나타났다.

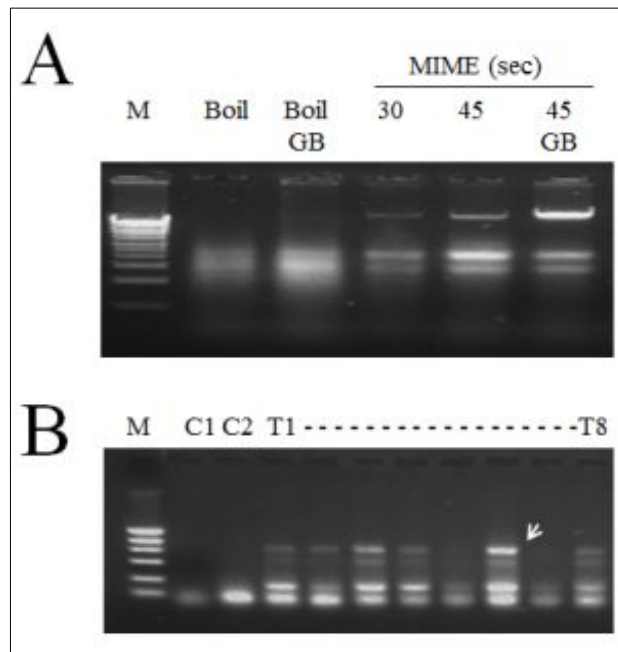


Fig. 325. Preparation of genomic DNA by Microwave irradiation-mediated extraction (MIME). A: Mycelium cells subjected to boiling and boiling with subsequent glass bead vortexing (GB) for 1 min. Mycelium cells were also subjected to MIME for 30 or 45 sec or 45 sec of MIME with subsequent GB. The mycelium cell extracts were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. M, 1 kb DNA size marker. B: The mycelium cell extracts obtained by 45 sec MIME were diluted with distilled water and used as templates for PCR amplification. C1 and C2 indicate wild-type cells. T1 to T8 indicate the transformants expressing GAD67. Arrow indicates a 2.3 kb DNA fragment amplified by PCR. M, 250 bp DNA size marker.

(3) 항당뇨기능성 식용백신연구

간염백신 연구에서와 같이 GAD67 유전자 도입 및 발현이 확인된 형질전환 균사체를 이용하여 이로부터 자실체 형성과 포자분리 및 품종으로서의 확립을 통하여 식용의 항당뇨 백신으로서의 기능성을 연구하기 위하여서는 상당한 연구기간이 소요된다. 따라서 연구기간을 고려하여 GAD67 발현 균사체를 액체배양을 통하여 확보한 후 이를 항당뇨 식용백신으로서의 이용가능성을 연구하였다.

(가) GAD67 균사체의 NOD mice 투여

4주령의 NOD mice를 일주일간 순화시킨 뒤 균 분리하여 실험하였다. Mice는 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 환기횟수 12~15회/시간, 조명시간 12시간 (오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 조건이 설정된 사육실에서 사육하였다. 사료는 멸균된 실험동물용 고형사료를 자유 섭취시켰다. 음용수는 고압증기멸균하여 자유 섭취시켰으며 mice 케이지 역시 고압증기멸균후 사용하였다. NOD mice는 GAD67 균사체 500 mg 및 100 mg/kg bw 투여군과 증류수 투여 대조군으로 나누었으며 1회 100 μl 를 mice 위장관내 투여를 실시하였다. 주 2회 12주 총 24회를 투여하였다. 무작위 방법으로 균을 분리하고 총 3군으로 나누었으며 각 군당 3-5마리로 하였다. 실험은 2차에 걸쳐 동일하게 진행하였다.

Group	Treatment	Volume/ treatment	Cage label	Description
1	GAD67 균사체 500mg/kg bw 투여	100 μl	1군	시험군
2	GAD67 균사체 100mg/kg bw 투여	100 μl	2군	시험군
3	증류수	100 μl	3군	무처리군

(나) 당뇨병 발현에 의한 치사율 (1차 시험)

GAD67 발현 균사체 투여군과 용매투여 대조군의 당뇨병 발현에 따른 치사율을 계산하였으며 당뇨병 발현에 의한 치사는 투여 개시 후 16주 지나서, 즉 주 2회 12주간 투여 종료 후 1달이 지난 다음 발생하였다. 당뇨병 발현으로 치사한 배경적인 근거는 치사한 mice들의 치사 직전 혈당 수치가 GAD67 균사체 100mg/kg bw 투여군과 대조군이 각각 560 ± 52 mg/dl 및 481 ± 50 mg/dl에 의한 것으로 추측할 수 있었다. 통상적으로 300 mg/dl 이상이면 당뇨병 이환 mice로 분류하고 있다.

GAD67 균사체 500 mg/kg bw 투여군에서는 치사율이 0%였던 점과 반면 100 mg/kg bw 투여군에서는 60%였다는 점은 GAD67 발현 균사체 용량에 의존적 결과로 판단되었으며 당뇨병 발현에 대한 방어효과가 있음을 제시하고 있다.

	Number of NOD mice survived/total number administered	Fatality rate concerning occurrence of diabetes mellitus	Remarks	Mean blood glucose level (mg/dl) of mice died (Values measured just prior to death)
GAD67 mycelium 500 mg/kg bw	3/3	0		
GAD67 mycelium 500 mg/kg bw	2/5	60%	Death after 16 weeks later following first treatment	560
Vehicle	1/3	67%	Death after 16 weeks later following first treatment	481

Table 33. Difference in fatality rate concerning the occurrence of diabetes mellitus among the groups (1st trial).

(다) 당뇨병 발현에 의한 치사율 (2차 시험)

	Number of NOD mice survived/total number administered	Fatality rate concerning occurrence of diabetes mellitus	Remarks	Mean blood glucose level (mg/dl) of mice died (Values measured just prior to death)
GAD67 mycelium 500 mg/kg bw	4/4	0		
GAD67 mycelium 500 mg/kg bw	3/3	0		
Vehicle	1/3	67%	Death after 3-5 weeks later following first treatment	481

Table 34. Difference in fatality rate concerning the occurrence of diabetes mellitus among the groups (2nd trial).

(라) GAD67 균사체 투여군과 대조군간 혈당치 비교 (1차 시험)

* 당뇨병 발현에 의한 치사가 발생하기 전까지 (즉, 투여개시후 15주 까지) 2주 간격으로 3번의 혈당 수치를 측정하고 그 결과를 군간 비교하였다. GAD67균사체 500 mg/kg bw 투여군에 비해 100 mg/kg bw 투여군과 대조군에서 혈당치가 시간 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었는데 GAD67 균사체 500 mg/kg bw 투여군에서는 100 mg/kg bw 투여군과 대조군에 비해 혈당치가 증가하는 경향을 볼 수 없었다. 이 결과는 GAD 발현 균사체가 용량 의존적으로 당뇨병 발현에 대한 방어효과가 있음을 제시하고 있다.

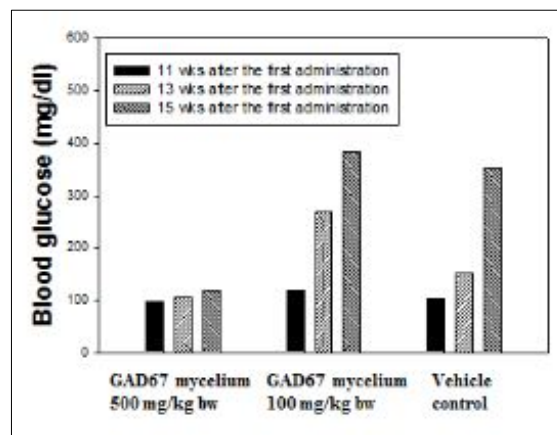


Fig. 326. Comparison of mean blood glucose levels among the mice administered with GAD67 mycelium or vehicle.

(마) GAD67 mycelium 투여 농도별 혈당치의 경시적 변화 (2차 시험)

2차 시험에서 대조군 3마리 중에서 투여개시후 3, 5주가 지나 각각 1마리씩 치사함에 따라 투여 개시 후 15주까지 측정 분석한 혈당치 수준변화에 있어서는 GAD67 균사체 500 mg/kg bw 투여 군과 100 mg/kg bw 투여군간 혈당치의 경시적 변화를 분석하였다. 500 mg/kg bw 투여 군에서는 투여개시 후 1-15주까지 혈당치의 유의한 변화가 없었던 반면 100 mg/kg bw 투여 군에서는 9주를 지나면서 혈당치가 상승하여 13, 15주에서는 당뇨병이환 혈당 수치인 300 mg/dl에 근접한 평균 280, 288 mg/dl을 각각 보였다, 이러한 결과는 1차 시험에서와 유사한 결과로 GAD67 균사체가 용량 의존적으로 당뇨병 발현에 대한 방어효과가 있음을 재확인시켜 주었다.

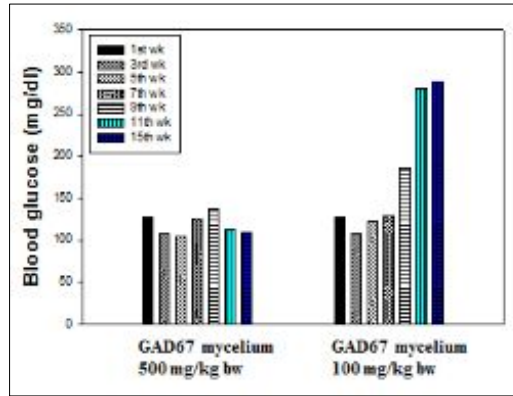


Fig. 327. Comparison of mean blood glucose levels among the mice administered with GAD67 mycelium 500 mg/kg bw and 100 mg/kg bw.

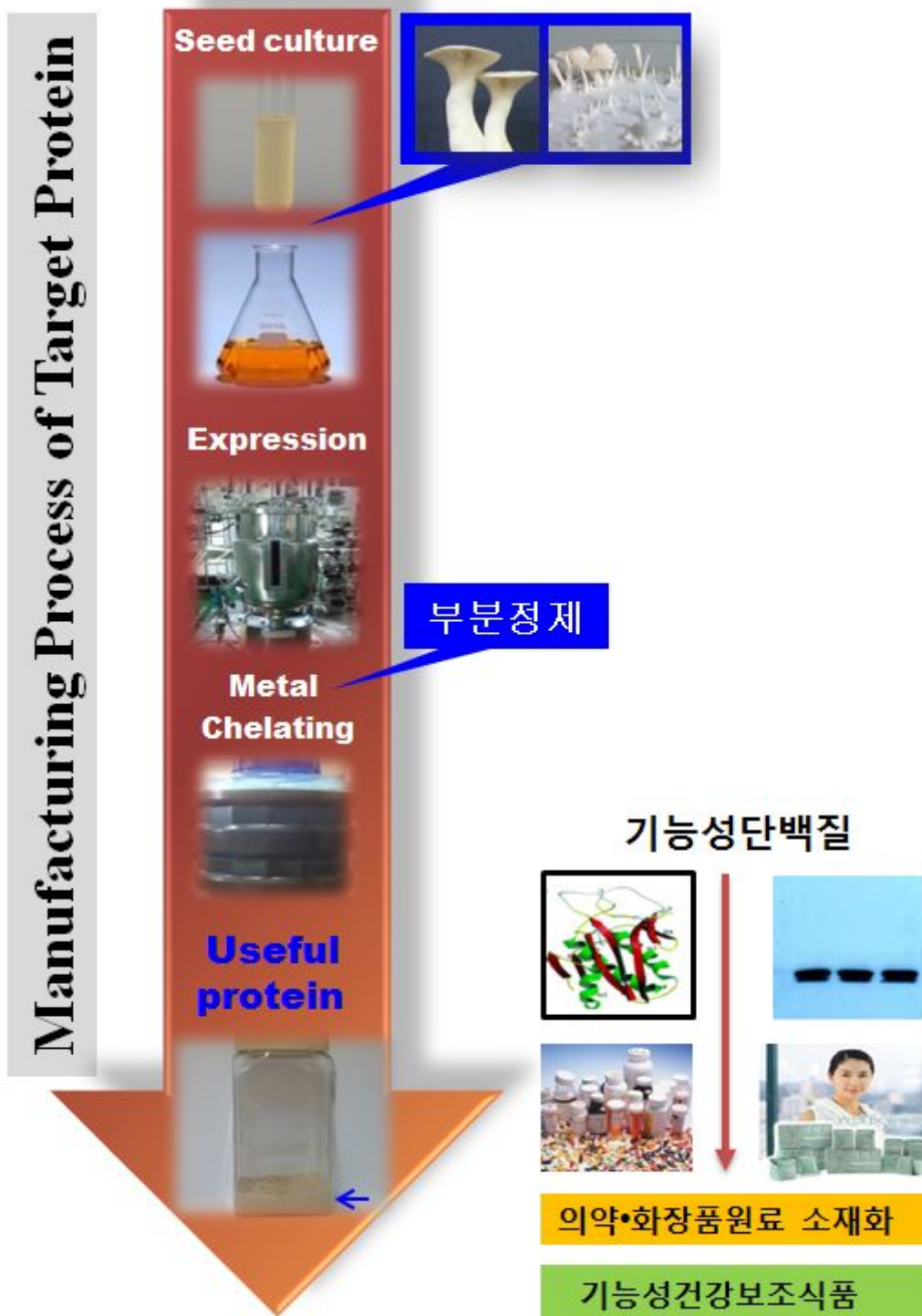
(바) 결론

Type 1 diabetes mellitus (T1DM)는 청소년기에 가장 흔한 만성질환으로서 평생 인슐린의 투여가 필요하며 이로 인한 다양한 만성질환과의 연관성을 제공하고 있다. T1DM의 원인은 췌장의 인슐린 생산세포의 자가면역에 의한 파괴 때문인데 autoantigen은 glutamic acid decarboxylase (GAD67), insulin, tyrosine phosphatase-like IA-2/IA-2 β antigen 등으로 알려져 있다. 특히 GAD67은 세포파괴에 매우 중요한 역할을 지니는 것으로 보고된 바 있다.

GAD67을 주사하거나 스프레이로 비강흡입시킬 경우 질병예방이나 지연이 가능한 것으로 보고된 바 있다. 또한 경구섭취의 경우도 예방효과가 있는 것으로 나타난 바 있다. 경구투여의 경우 immunomodulation이나 immunological tolerance에 의하여 자가면역 질환 치료에 매우 유용할 수 있으나 이를 위해서는 상당량의 antigen이 필요시 된다.

본 연구에서는 NOD mouse에 반복적으로 GAD67 균사체를 투여함으로써 diabetes의 예방효과가 나타남을 확인할 수 있었다. GAD67의 발현량을 증대시키는 방법이 개발될 경우 보다 실질적인 항당뇨 백신을 기대할 수 있을 것이다. 또한 자실체의 생산 및 품종 확립을 통하여 대단위 항당뇨 새송이버섯의 재배도 기대할 수 있을 것이다.

제 3 절 생물학적 활성



1. *In vitro*에서 세포 활성화

가. *In vitro* (Insulinoma cell)에서 세포 활성화 측정

(1) RINm5F Cell의 특성

Insulinoma cell, Insulin 생산

Growth properties (성장특징): adherent, fibroblast type 성장

Cell Passage No.: 20

사용배지: RPMI 1640, 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), 37°C CO₂ Incubator에서 배양.

사용목적에 따라 Hemocytometer로 세포수를 측정하여 사용.

(2) 세포주 및 세포배양 조건

세포주는 ATCC(American Tissue Culture Collection)에서 구입한 RINm5F 세포를 실험에 사용하였다. 흰쥐에서 유래한 췌장 베타세포주 RINm5F(Varey et. al, 1988) 세포는 10% FBS, penicillin (100 U/ml) & streptomycin (100 μ g/ml), RPMI 1640 배지(complete medium, CM)에서 3-4일 간격으로 계대 배양하면서 5% CO₂가 공급되는 항온 항습기에서 배양하였다.

(3) 세포 활성화 측정 (Cell viability assay)

RINm5F 세포를 10% FBS와 1% antibiotics 이 포함된 RPMI-1640 배지를 이용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온항습기에서 배양하여 실험에 사용하였다. 유용단백질 hGH, EGF가 세포에 미치는 영향 및 STZ으로 유도된 당뇨병 실험모델에서 세포 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포수를 hemocytometer를 사용하여 counting한 다음, 96 well plate의 각 well에 2×10^4 농도의 cell 부유액 100 μ l를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 측정하고자 하는 시료 2 mM STZ로 각 well에 첨가한 다음 24시간 배양 후 각 well에 형질전환된 새송이버섯으로 부터 생산된 유용단백질을 농도별로 각 well에 첨가하였다. 24시간 동안 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온항습기에서 배양 후, MTT solution (0.5 mg/ml)을 첨가하였으며, 37°C에서 4 시간동안 배양시킨 후 MTT 회색액을 제거한 후 각 well에 100 μ l DMSO를 첨가하여 5 분간 plate shaker로 흔들어 준 후 ELISA reader를 사용하여 wave length 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RINm5F에 유용단백질 hGH 및 EGF를 일정농도 처리하여 세포성장효과와 streptozotocin에 의해 유발된 전 당뇨 (prediabetes) 모델 RINm5F 세포에 처리 후 세포성장 효과를 관찰 하였다. 그 결과, hGH 및 EGF 단백질 함유 배지에서 세포성장

효과를 관찰한 결과, 세포성장 효과는 5~20%의 세포활성 증가가 나타났으며(Fig. 13, 15), RINm5F의 항당뇨활성은 hGH의 처리 농도를 5 ng/ml의 농도로 처리하였을 때, 약 12% 개선되었으며, EGF를 1 ng/ml의 농도로 처리하였을 때, 약 19% 개선 되었다.

그 결과를 아래 Fig. 328~331에 나타내었다.

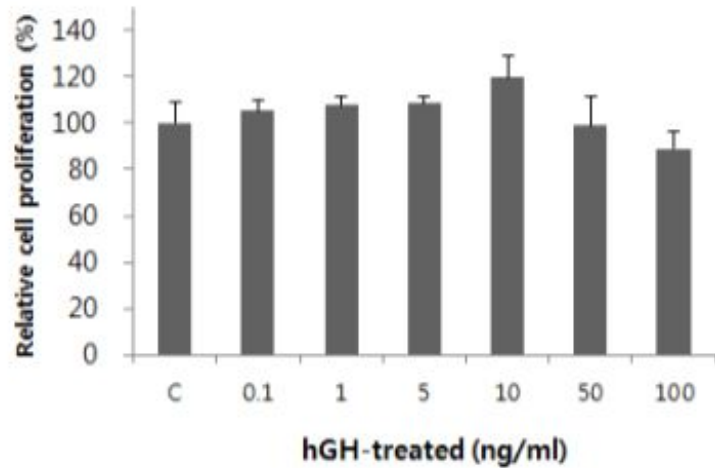


Fig. 328. Effect of hGH (human growth hormone) on proliferation of rat insulinoma RINm5F cells.

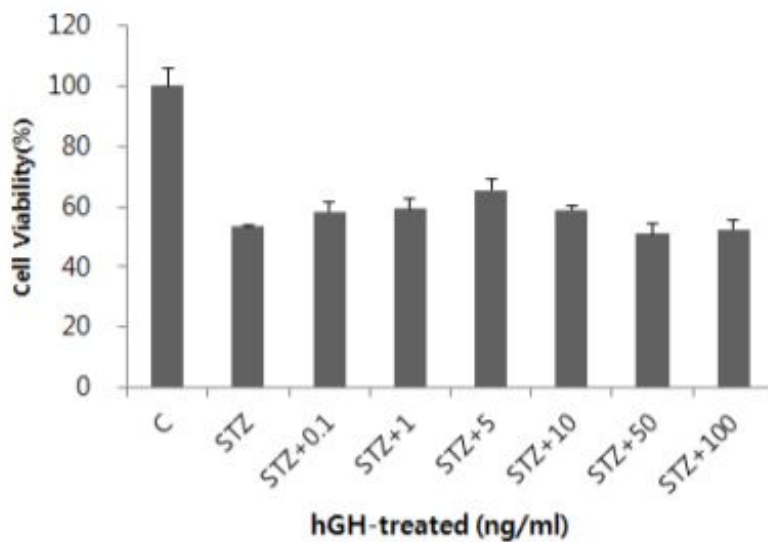


Fig. 329. Effect of hGH (human growth hormone) on proliferation of rat insulinoma RINm5F cells after streptozotocin (STZ) treatments.

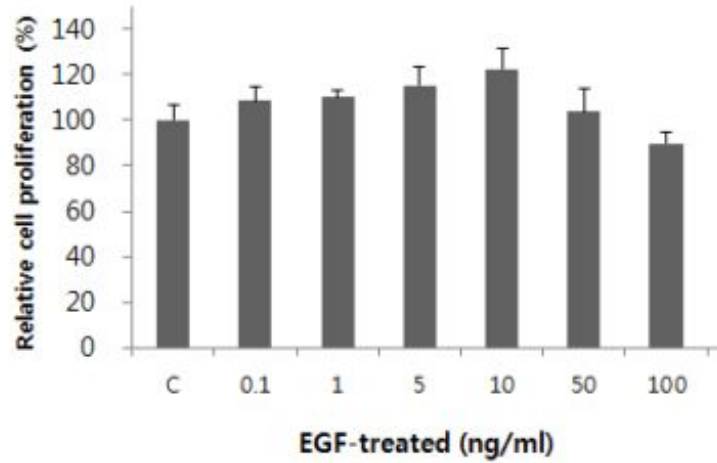


Fig. 330. Effect of EGF (Epidermal growth factor) on proliferation of rat insulinoma RINm5F cells.

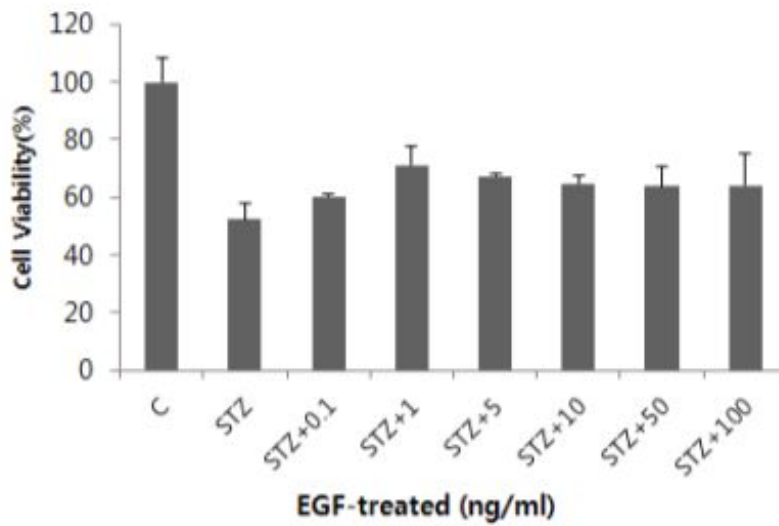


Fig. 331. Effect of EGF (Epidermal growth factor) on proliferation of rat insulinoma RINm5F cells after streptozotocin (STZ) treatments.

2. 성장호르몬 (human growth hormone)

가. In vivo에서 hGH의 생물학적 활성 측정

(1) 시료제조에 의한 실험동물 투여

발현백터 pCamLacPShGH를 함유하는 새송이버섯을 potato dextrose agar (PDA) 배지에 키운 후, cutter를 이용하여 8 mm 정도 disc로 자른 다음 액체배지 (10 ml potato dextrose broth)로 옮겨 seed 배양을 하였다. 그 다음 1 L flask 내에 MCM (2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4 , and 0.046% KH_2PO_4) 배지 300 ml에 seed 배양액 3 ml (1%)을 취하여 접종한 후 25°C에서 shaking 없이 5일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 자체 제작한 50 L fermenter (30 L working volume)를 이용하여 1% 정도 되게끔 (300 ml) seed 배양액을 취하여 접종한 다음 25°C, 0.5 vvm (volume of air per volume of medium per min) 하에서 최소한의 회전 (약 50 rpm)을 시키면서 일주일 정도 본 배양을 시도하였다. 배양 과정동안 샘플 채취에 의해 wet weight 및 dry weight를 측정하였고 발현되는 hGH 양을 SDS-PAGE, western blot, bradford 단백질 정량 등의 방법에 의하여 측정하였다. 그 결과 전체 수용성 단백질의 약 15% 정도 발현되는 것을 확인하였다 (Fig. 137).

얻어진 hGH 균사체는 동결건조 후 직접적으로 사용 (powder 형태 + 말분, Myc) 또는 metal chealting 방법에 의해 부분 정제 (액상 type, p-hGH)를 하여 최종적으로 hGH 농도가 약 1.5 ug/ml (g)이 되게끔 조절하였다. 이렇게 만들어진 두가지 형태의 시료를 이용하여 음용수에는 p-hGH (액상) 농도가 0.1% (p-hGH1)와 0.2% (p-hGH2)가 되게끔 첨가하여 실험을 진행하였고, 동결 건조한 균사체 파우더와 말분을 섞어 hGH농도를 조절한 시료(Myc)는 쥐사료 (삼양사)에 0.1% (Myc1)와 0.2% (Myc2)가 되게끔 섞어서 다시 pellet 형태로 제조한 다음 고품분의 사료를 쥐에 투여하였다. 음용수만을 처리한 그룹을 대조구 (negative control, NC)로 하여, p-hGH1(액상), p-hGH2 (액상), Myc1(고형분), Myc2 (고형분) 등의 시험구를 4 그룹으로 하여 한달 동안 실험을 진행하였다.

(2) 생물학적 활성 검정

(가) 체중 증가, 식이량 및 음용수 변화 측정

그룹별 개체들의 초기 체중을 측정하여 평균값을 구하고, 사료 식이가 종료된 후 체중을 측정하여 증가된 무게와 성장률을 대조구와 비교한 결과 Table 35와 같은 결과가 도출되었다, 즉 시험군에서는 대조구와 비교해 볼 때 전반적으로 약 3-5% 정도의 체중증가를 보였으며, 시료들의 물성 차이에 의해 액상으로 음용수에 첨가한 경우

(P-hGH1 & 2 그룹)가 고형의 사료 (Myc1 & 2 그룹)로 식이한 그룹보다는 성장률에 좀 더 좋은 효과를 주는 것으로 나타났다. 이런 결과는 성장 관련 인자들을 직접적으로 식이 하더라도 성장 및 대사 촉진에 영향을 주는 것으로 판단할 수가 있다.

Table 35. Effects of mycelial extracts containing hGH on growth rate of SD rats

Group	Weight measurement (g) and growth rate			
	First measurement (g)	Last measurement (g)	Increased weight (g)	Growth rate (%)
Control ^a	87.1	343.9	256.8	-
P-hGH1 ^b	86.8	352.2	265.4	3.35
P-hGH2 ^c	86.7	357.2	270.5	5.33
Myc1 ^d	87.1	351.3	264.2	2.88
Myc2 ^e	86.9	354.2	267.3	4.08

^aControl group: group administered with water and commercial feed

^bP-hGH1 group: group administered with water (0.1% of 1.5 µg hGH) and commercial feed

^cP-hGH2 group: group administered with water (0.2% of 1.5 µg hGH) and commercial feed

^dMyc1-mycelia group: group administered with feed (0.1% of 1.5 µg hGH per g of animal feed) and water

^eMyc2-mycelia group: group administered with feed (0.2% of 1.5 µg hGH per g of animal feed) and water

액상 및 고형분 형태로 시료 (p-hGH, Myc)를 투여한 그룹들의 식이량과 음용수를 측정하여 대조구와 비교한 결과 Table 36에서 보는 바와 같이 그룹간에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 36. Effects of mycelial extracts containing hGH on food intake and drink of SD rats

	Group				
	NC	P-hGH1	P-hGH2	Myc1	Myc1
Food intake (g/day)	17.8±0.4	17.5±0.4	18.6±0.6	17.5±0.4	17.4±0.3
Drink volume (ml)	40.0±1.8	39.0±1.2	42.5±2.2	40.0±2.1	45.5±3.6

(나) 생화학적 분석

① 기관무게 측정

실험이 종료 된 후 실험 종료 시점에서 12시간 절식시킨 실험쥐를 ethyl ether로 마취시켜 희생 시킨 후 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취한 다음, 실험쥐를 해부하고 간, 신장, 비장을 적출하여 무게를 측정하였다. 그 결과 Table 37에서 보는 바와 같이 대조구와 비교해 볼 때, 시험구에서 약간 감소하거나 거의 같은 경향을 보이고 있어서 시료 투여에 의해 기관들의 무게에 미치는 영향은 없는 것으로 판단된다.

Table 37. Changes of organ weight by treatment of mycelial extracts containing hGH in SD rats

Organ wt(g) /100 g BW	Group				
	NC	P-hGH1	P-hGH2	Myc1	Myc2
Liver	3.8±0.1	3.4±0.1	3.8±0.1	3.6±0.1	3.7±0.1
Spleen	0.3±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
Kidney	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0

② 혈중 지질 농도 측정

채취한 혈액에서 혈장을 취한다음, 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 등의 농도를 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 측정된 혈중 지질 성분으로부터 Friedwald 등(1972)의 계산식에 의해 계산하였다 [LDL-콜레스테롤 = 총콜레스테롤 - HDL콜레스테롤 - (중성 지방/5)]. Table 38에서 보는 바와 같이 총콜레스테롤 함량은 시험구에서 대조구에 비해 dose-dependent 하지는 않지만 12-15% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 이런 결과는 LDL-cholesterol 함량의 감소에 기인하는 것으로 보여지며, 또한 중성지방의 경우에도 시험구에서 대조구에 비해 15-18% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 이는 성장호르몬을 쥐에 처리하였을 때 plasma lipid가 감소한다는 Frick 등 (2001) 및 Machado 등(2005)의 결과하고도 일치하는 것으로 나타났다. 따라서 hGH를 함유하는 추출물들이 혈액의 lipid profile을 개선시키는 활성을 갖는다고 보여진다. 일반적으로 성장호르몬은 좋은 콜레스테롤인 HDL-콜레스테롤 수준은 증가시키지만, 안 좋은 콜레스테롤인 LDL-콜레스테롤은 감소시킨다고 보고되어 있다 (Carroll 등, 1998). 본 실험결과에서도HDL-콜레스테롤 수준은 큰 변화가 없었지만, LDL-콜레스테롤은 16-28% 정도까지 감소시키는 결과로 보아,

새송이버섯 균사체에서 발현된 hGH의 경우 활성적인 형태로 단백질 합성이 된다는 것을 시사한다. 또한 시료 투여에 의해 총 콜레스테롤 함량의 변화는 신진대사 활동이 왕성한 젊은 쥐에서 세포막의 구성성분들의 합성을 위하여 빠르게 소모되고 있다는 것으로 추측해 볼 수도 있다.

Table 38. Effects of mycelial extracts containing hGH on total cholesterol, triglyceride, and HDL- and LDL-cholesterol levels in plasma of SD rats

Plasma lipid (mg/dl)	Group				
	NC	P-hGH1	P-hGH2	Myc1	Myc2
Total cholesterol	86.4±6.1	72.8±1.4	75.8±2.7	76.0±3.9	74.2±2.9
Triglyceride	98.8±9.9	83.3±2.5	80.8±6.2	80.0±5.4	81.4±7.3
HDL-cholesterol	47.3±2.8	46.9±2.0	46.8±1.1	47.9±1.8	47.0±1.5
LDL-cholesterol	19.0±5.2	13.7±1.2	15.1±2.0	14.5±3.6	15.9±2.0

③ 혈중 parameter (Ca, ALP, BALP) 변화 측정

채취한 혈액에서 혈장을 취한 다음, 칼슘 농도, alkaline phosphatase (ALP) 및 뼈의 alkaline phosphatase (BALP) 등의 농도 변화를 측정한 결과 Table 39에서 보는 바와 같은 결과를 얻었다. 칼슘 농도의 변화는 대조구와 비교해 볼 때 시험구에서 큰 차이는 없지만 P-hGH2 및 Myc2 투여 그룹에서 약간의 증가 있는 것으로 나타났다. 그러나 생체내에서 신호전달 및 단백질 인산화에 관련된 alkaline phosphatase (ALP & BALP)의 경우에는 대조구에 비해 시험구에서 크게 증가한 것으로 나타났다. 즉 ALP의 경우에는 대조구에 비해 15-31%까지 증가하였으며, BALP의 경우에는 29.7-47.5%까지 크게 증가한 것으로 나타났다. 이런 결과는 새송이버섯 균사체에서 발현된 hGH를 함유하는 시료 투여에 의해 신호전달이 왕성하게 일어나 성장 촉진의 결과를 초래하였다고 볼 수가 있고, 특히 BALP의 경우에는 뼈 형성의 좋은 마커 단백질이며 다른 논문들의 연구결과와도 일치하는 것으로 나타났다 (Tobiume 등, 1997; Korpál-Szczyrska 등, 2008). 따라서 BALP는 활성적인 성장호르몬 치료에 의한 성장 반응에 있어서 효과적인 early predictor로서 보여진다.

Table 39. Changes of plasma parameter (Ca, ALP, BALP) by treatment of mycelial extracts containing hGH in SD rats

Plasma parameter	Group				
	NC	P-hGH1	P-hGH2	Myc1	Myc2
Ca (mg/dl)	9.5±0.1	9.4±0.1	10.1±0.2	9.4±0.4	10.1±0.3
ALP (U/l)	1054.8±48.8	1381.4±59.8	1256.0±37.9	1214.2±69.0	1240.3±110.0
BALP (U/l)	741.4±30.1	1094.2±49.8	996.8±20.9	962.0±59.0	992.5±79.2

BALP; Bone-specific alkaline phosphatase. ALP; Alkaline phosphatase

④ 혈중 성장관련 인자들(GH, IGF-1, GHRF)의 변화

hGH를 함유하는 추출물들을 처리한 다음, 혈액 내의 혈장에서 성장관련 인자들(GH, IGF-1, GHRF)들의 변화를 측정된 결과 Table 40에서 보는 바와 같이, 전반적으로 모든 성장에 관련된 인자들은 대조구에 비해 시험구에서 많은 양이 증가되는 것으로 나타났다. 성장관련 인자들은 시험구에서 대조구에 비해 IGF-1은17-26%정도, rat GH는 28-46% 정도, GHRF는 26-42%로 크게 증가한 것으로 나타났다. IGF-1은 모든 포유동물의 신체조직이나 간에서 생산되는 second messenger이며 (Pinchas 등, 1991), 성장호르몬에 의해 조절되어 간이나 다른 조직에서 또 다른 insulin-like growth factor 들을 생산하여 유리시키며, 따라서 IGF-1의 증가는 동물들의 성장에 있어서 가장 중요한 인자로 볼 수가 있다. 성장호르몬유리인자(GHRF)의 경우 대조구에 비해 최대 거의 2배 가까이 증가하였으며, 이런 증가에 의해 단백질, 탄수화물, 무기염류, 지방대사 뿐만 아니라 정상적인 신생 후 성장, 체중증가, 뼈 성장 등에도 필수적으로 요구되는 rat 성장호르몬 수준을 약46%까지 증가시켰다고 볼 수 있다.

Table 40. Effects of mycelial extracts containing hGH on levels of growth-related factors in plasma of SD rats

	Group				
	NC	P-hGH1	P-hGH2	Myc1	Myc2
IGF-1 (ng/ml)	594.2±38.5	695.8±33.7	747.3±31.4	718.3±42.6	739.3±32.9
GH (ng/ml)	6.14±0.86	8.34±0.89	8.74±0.86	7.84±0.36	8.96±0.57
GHRF (ng/ml)	2.23±0.22	2.83±0.24	3.17±0.28	2.81±0.21	2.89±0.28

IGF-1; Insulin-like growth factor-1

GH; growth hormone

GHRF; growth hormone releasing factor

⑤ 뼈 성장 측정

실험전, 후의 경골 및 경골 성장판 (Fig. 332)의 길이는 연구방법에 기술한 것처럼 X-ray mammography system으로 증감지와 필름을 이용하여 촬영하였다. 촬영된 필름은 현상기로 현상하고 필름을 Vidar VXR-12 film digitizer로 스캔하였다. 스캔된 영상은 Image J 프로그램을 이용하여 경골과 경골 성장판의 중앙, 좌, 우 세부위의 profile curve를 구하고 반치폭의 픽셀수로부터 길이를 계산하였다.

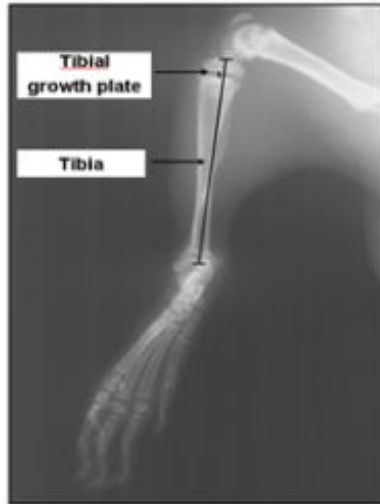


Fig. 332. Image scan of tibia and tibial growth plate of SD rat

그 결과 Table 41에서 보는 바와 같이, hGH를 함유하는 추출물들을 처리한 시험구에서 대조구에 비해 경골의 길이는 약간씩 증가하였고, 액상으로 처리한 그룹에서 (P-hGH1 & 2) 고형분으로 처리한 그룹 (Myc1 & 2) 보다 조금 더 증가한 것으로 나타났다. 경골 성장판의 경우에도 시험구에서 길이가 대조구보다 약간 증가한 것으로 나타났다.

Table 41. Effects of mycelial extracts containing hGH on growth of tibia and tibial growth plate in SD rats

Growth change	Group				
	NC	P-hGH1	P-hGH2	Myc1	Myc2
Tibia (mm)	7.29±0.47	7.63±0.18	7.82±0.10	7.31±0.29	7.31±0.17
Growth plate (mm)	0.61±0.026	0.64±0.056	0.65±0.041	0.62±0.035	0.64±0.030

나. Field 실험

(1) 육계 사육 농장 실험

새송이 버섯 (pCamLacPShGH 함유)을 앞에서 기술한 방법대로 자체 제작한 50 L fermenter (30 L working volume)를 이용하여 대량배양을 한 다음, 균사체를 회수하여 호모게나이저를 사용하여 분해시켰다. 원심분리에 의해 상등액을 회수하여 metal chelating 방법에 의해 단백질을 회수하고 발현되는 hGH 양을 SDS-PAGE, western blot, bradford 단백질 정량 등의 방법에 의하여 측정하였다. 그 결과 전체 수용성 단백질의 약 15% 정도 발현되는 것을 확인하였다 (~600 ug hGH/g mycelium). 이렇게 얻어진 단백질을 말분 (대한제분)에 희석 (1 ug hGH/g 말분)하여 본 사료에 0.1% 정도로 투여할 수 있도록 사료첨가제를 제조하였다. 경상북도 김천시에 위치한 육계농장의 협조를 받아 hGH를 함유하는 사료첨가제가 육계 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Table 42에서 보는 바와 같이 대조구의 경우 10,800수의 어린 병아리를 사용하였고, 시험구의 경우에는 23,500수의 병아리를 사용하여 실험을 진행하였다. 병아리가 입고된 후 일주일 정도의 적응 기간 후부터 출고 전까지 사료첨가제를 투여하였고, 출고시 전체중량은 시험구 36,363 kg (대조구 15,280 kg)이고 평균 한수당 체중은 시험구는 1.59 kg으로 대조구 1.45 kg 보다 9.6% 정도 증체 효과를 나타냈다. 일당 체중 증가율은 시험구에서 54.82 g이며 대조구의 경우 42.64 g으로 일당증가율이 28.6% 정도 시험구에서 높게 나타났다. 시험구와 대조구간의 입식 병아리 수는 달랐지만, 시험구에서는 전체 사료량이 56,915 kg (2.49 kg/수) 소모되었고, 대조구에서는 27,050 kg (1.77 kg/수) 소진되었다. 시험구에서 사료첨가제(hGH 포함)에 의해 신진대사 촉진에 의한 빠른 성장에 의해 수당 사료 요구가 40% 정도 증가된 것으로 나타났다. 그러지만 전체적인 사료요구율 (FE = total feed intake/total body weight)은 시험구에서 1.56이었으며, 대조구의 경우 1.77로서 시험구에서 훨씬 좋은 효과를 보이는 것으로 보여 진다. 또한 생산지수 [PI (Production index) : (ABW x Rate of Survival)/(FE x Culturing Period) x 100]의 경우 시험구에서는 341.95이며, 대조구에서는 235.16으로 사료첨가제(hGH 포함)를 본 사료에 0.1% 투여에 의해 생산성이 크게 증가한 것으로 나타났다. 또한 시험구

의 경우 대조구보다 5일 정도 사육기간이 짧아짐으로서 부가적인 사료 소비를 절감할 수가 있었고 또한 농가의 소득 증대에도 기여한 것으로 나타났다.

Table 42. Field test for biological activity in farm animal (chicken)

Sample	Input Date	No. Input animal	Output Date	Culturing Period (Days)	No. Output animal	Rate of Survival (%)	TBW (kg)	ABW (kg)	ADG (g)	TFI (kg)	FE	PI
Treated group	2014 11.27	23,500	2014 12.26	29	22,870	97.3%	36,363	1.59	54.82	56,915	1.56	341.95
Control	2014 11.27	10,800	2014 12.31	34	10,540	97.6%	15,280	1.45	42.64	27,050	1.77	235.16

Feed containing hGH was supplied to the animals 7 days after input.
 ADG (Average daily gain) : ABW (Average body weight)/Culturing Period
 FE (Feed efficiency) : TFI (Total feed intake)/ TBW (Total body weight)
 PI (Production index) : (ABW x Rate of Survival)/(FE x Culturing Period) x 100

결론적으로 새송이버섯에서 hGH 발현과 더불어 SD rat 실험과 육계 필드 실험으로부터 얻어진 결과에 의하면, 대량배양에 의해 균사체를 확보하고 metal cheating 방법에 의해 hGH를 부분정제 하여 사료첨가제로서 개발하므로서 활용 가치를 확대시켜 부가가치를 창출하여 농가 소득에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 상피성장인자(epidermal growth factors, EGF)

가. EGF를 이용한 화장품 개발 및 안정성 평가

(1) 토너 예시 처방

수상과 유상을 나누어 80℃까지 가열하여 용해시킨 후, Agi mixer (T.K. Homo Mixer Mark II, Tokushu kika kogyo Co., Ltd. Osaka, Japan)를 이용하여 3,000rpm에서 2분간 가용화하고, Triethanolamine(T.E.A)를 넣고 8분간 교반한 후, 40℃까지 냉각한다. EGF을 넣은 후 3분간 가용화시키고 30℃까지 냉각한후 탈포한다 (Table 43).

Table 43. Toner ingredients and formulated conditions

Phase	INCI Name	Content% (W/W)
A	Water	to 100
	Allantoin	0.200
	Disodium Ethylenediaminetetraacetate	Q.S.
	Methyl (ethyl, propyl) paraben, Phenoxyethanol	Q.S.
	Sodium Hyaluronate	Q.S.
	Glycerin	4.000
	Butylene glycol	2.500
	Carbomer	3.000
B	Alcohol	3.600
	ppg-26-buteth-26 & peg-40hydrogenated cator oil	Q.S.
	Propylparaben	0.100
C	Triethanolamine	Q.S.
D	rh-Oligopeptide-1 (EGF)	0.5, 1, 1.5, 2

* Q.S. (Quantum sufficient : Proper quantity)

(2) 에센스 예시 처방

수상에는 보습제인 glycerin, betain, Sodium Hyaluronate, Butylene glycol과 방부제를 넣어 80℃까지 가열하여 용해시킨 후, homo mixer(T.K. Homo Mixer Mark II, Tokushu kika kogyo Co., Ltd. Osaka, Japan)를 이용하여 3,000 rpm에서 2분간 유화하고, 미리 분산한 점증제인 carbopol 940을 넣고 2분간 유화한다. Triethanolamine(T.E.A)를 넣고 3분간 더 유화한 후, 에탄올상을 넣어 1분간 유화하고, EGF을 넣어 2분간 유화한 후 30℃까지 냉각하고 탈기하여 본 실험에 사용한다 (Table 44).

Table 44. Essence ingredients and formulated conditions

Phase	INCI Name	Contents % (W /W)
A	Water	To 100
A	Allantoin	0.20
A	Disodium EDTA	0.01
A	Glycerin	Q.S.
A	Butylene glycol	2.50
A	Sodium Hyaluronate	1.00
A	Carbomer	Q.S.
B	1,2 Hexanediol & caprylyl glycol & caprylhydroxamic acid	Q.S.
B	Alcohol	2.00
B	Perfume	0.01
C	Triethanolamine	Q.S.
D	rh-Oligopeptide-1 (EGF)	0.5, 1, 1.5, 2

* Q.S. (Quantum sufficient : Proper quantity)

(3) 화장품 안정성 측정 : pH측정

pH 측정은 Thermo(Orion 3-Star, Thermo scientific, Singapore)사의 pH meter를 이용하여 2주간 25°C에 보관 후 pH를 측정한 결과, 토너와 에센스 모두에서 보관기간 동안 수치상의 큰 차이는 나타나지 않는 것으로 관찰되었다 (Fig. 333).

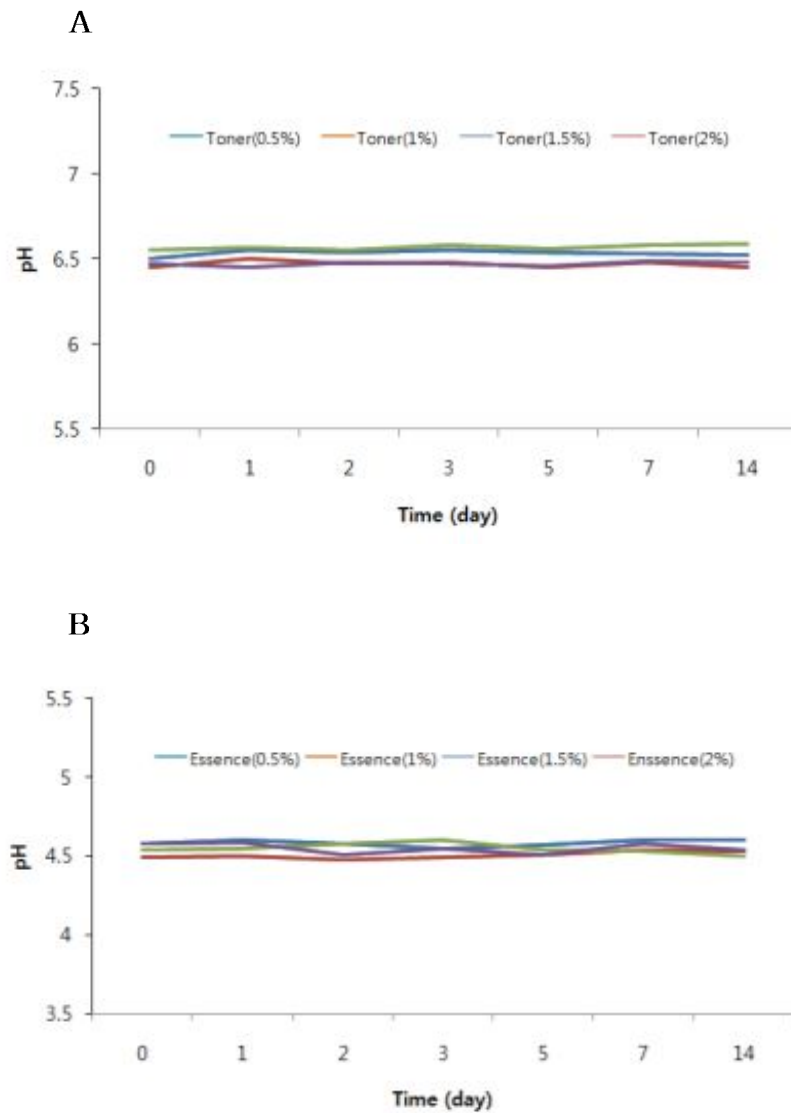


Fig. 333. pH measurement of the Cosmetics. (A) Toner and (B) Essence

(4) 경시적 점도 변화 측정

점도 측정은 Brookfield Viscometer (Brookfield LVDV-II+, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA U.S.A)를 이용하여 측정한다. 25°C에서 스피들(spindle) 토너는 No. 1(100RPM)을 에센스는 No. 2(10RPM)를 선택하여 30초간 점도를 측정한다. 2주간 25°C에 보관한 액정의 점도를 측정한 결과, 보관기간 동안 수치상의 큰 차이는 나타나지 않아 안정한 것으로 관찰되었다 (Fig. 334).

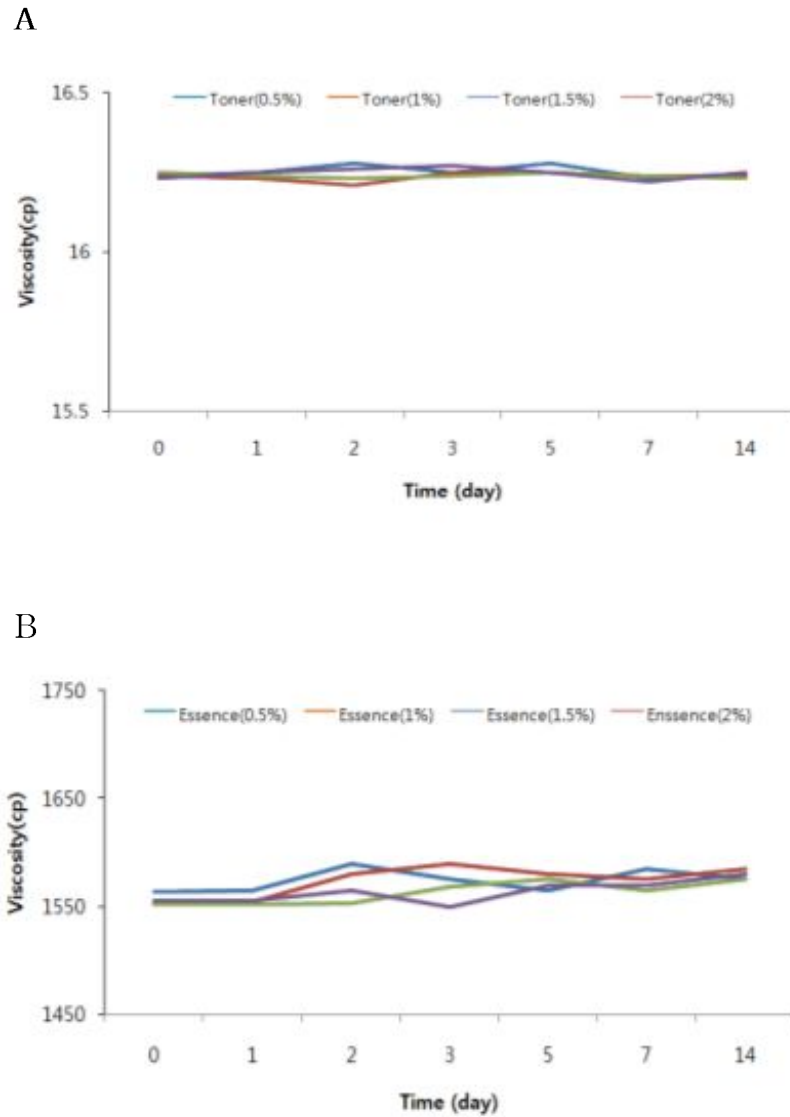


Fig. 334. Viscosity measurement of the Cosmetics. (A) Toner and (B) Essence

(5) 온도별(4℃, 25℃, 38℃, 45℃, 자외선) 경시적 안정도 관찰

EGF 단백질을 함유한 제품을 투명 용기에 담아 4℃, 실온, 25℃, 38℃, 45℃에서 각각 3개월 동안 보관하면서 1일차, 3일차, 5일차, 7일차, 14일차까지 온도별 안정성을 평가하였다.

Table 45. Results of stability test of cosmetics in constant temperature conditions. (4, 25, 45, 38, 45℃, Under UV)

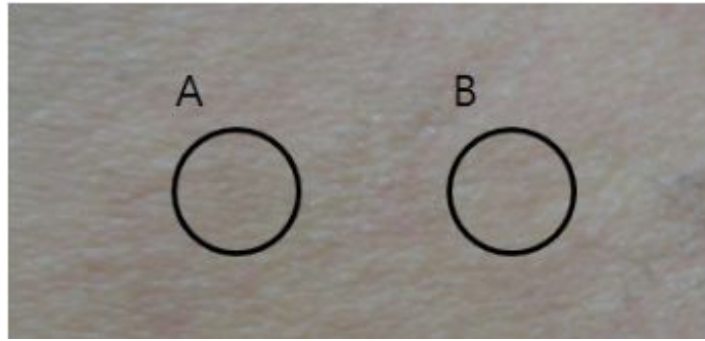
Sample Day	4℃		25℃		38℃		45℃		UV	
	Toner	Essence	Toner	Essence	Toner	Essence	Toner	Essence	Toner	Essence
1	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
3	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
5	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
7	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
14	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

O : Stable X : Unstable

각 처방별로 제조된 토너와 에센스를 투명 용기에 담아 0℃, 25℃, 38℃, 45℃, 자외선에서 각각 2주간 보관 하면서 1, 3, 5, 7, 14일차까지 온도별 안정성을 평가하였다. 0℃, 25℃, 38℃, 45℃에 보관한 토너와 에센스의 경우 14일동안 크리밍이나 응집의 현상 없이 안정한 것으로 관찰되었다. 또한 자외선에 보관한 제품들은 14일차 동안 분리가 일어나지 않아 자외선 안정도가 있는 것으로 관찰되었다 (Table 45).

(6) Patch test를 통한 안전성 실험

개발된 원료나 제품을 이용할 때 피부염이 일어나지 않는 것을 확인하기 위해서 간편한 예비 실험으로서 사람의 팔과 등 부위에 첩포 시험을 하였다. 24시간 Patch test를 통하여 안전성을 관찰한 결과 Fig. 335 같이 토너와 에센스 모두에서 피부에 안정함을 육안으로 관찰할 수 있었다.



※A : Toner B : Essence

Fig. 335. Photograph of human patch test of the cosmetics.

4. 혈전용해제 (Fibrinolytic protease, PLSP3)

가. 효소 활성 측정

(1) Semi-quantitative Enzyme Assay

일반적인 혈전용해제 (TPA, Staphylokinase, Streptokinase, urokinase 등)는 plasminogen을 plasmin으로 활성화 시키는 activator이지만 (약간의 부작용), 본 연구진은 우리나라 고유의 한종 한속인 흰이빨 참갯지렁이 (*Periserrula leucophryna*)로부터 분리한 직접적으로 fibrin을 분해 하는 fibrinolytic 효소에 대한 생물학적 활성 측정 하였다. 단백질 분해효소 분비능을 간접적으로 알아 보기 위하여 protease assay plate (1% skim milk, 0.1% yeast extract, 1.5% agar)에 살균된 paper disc를 올려놓고 추출한 PLSP3 단백질을 점적하여 37°C에서 overnight 배양하여 형성된 clear zone을 확인하였다 (Fig. 336). 그 결과 pCamLacPSLSP3 vector가 도입된 세송이버섯의 단백질에서 효소의 활성을 확인 할수 있었다. 또한 세송이버섯을 통해 생산된 PLSP3 단백질은 혈전용해제로서 산업적 활용 가능성을 제시하고 있다.

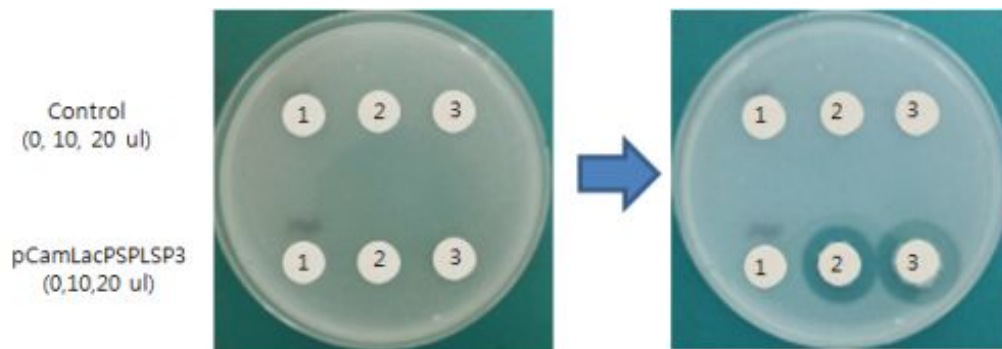


Fig. 336. Protease activity of pCamLacPSLSP3 in *P. eryngii*.

본 연구에서 개발된 pCamLacPShGH, pCamLacPSEGF, pCamLacPSPLSP3, pCamLacPpR1bhGH, pCamLacPpR1bEGF, pCamLacPpR1bPLSP3 벡터가 도입된 새송이버섯 균사체는 생물학적 활성을 가진 재조합 단백질 (**Human growth hormone, Epidermal growth factor, *Periserrula leucophryna* serine protease**)을 생산할 수 있다는 것을 보여주며, 재조합 hGH는 성장을 촉진시키는데 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 이 결과는 transgenic *Pleurotus eryngii*는 생물학적 활성을 가진 유용단백질을 안정되며 효과적인 버섯생산 시스템에서 생산할 수 있으며, 이 발현 시스템은 산업적으로 다양한 유용단백질 생산에 적용될 것이다. 또한 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated 기술을 이용하는 새송이버섯 형질전환 방법의 확립과, 기능적 활성을 가진 새송이버섯의 새로운 품종을 개발하였다. 따라서 이 시스템은 새로운 기능적 버섯의 육종을 위해 이용될 수 있고 유전자변형 농산물 (GMO)을 위한 방어적 지적 재산을 확보 할 수 있을 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 총괄 연구개발 목표 달성도

1. 총괄연구목표 및 달성도

가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허			신품종				유전자원등록	달성도	논문				기타		
	출원	달성도	등록	달성도	품명등록	품종등록	생산판매 신고			품종보호		SCI	SCI 달성도		비 SCI	비SCI 달성도
										출원	등록					
1차년도		1		1					1 ¹⁾	0	1		1	1		
2차년도	1	3	1	공고중							1	1	2			
3차년도	1	6	1	공고중	1 ²⁾		1 ²⁾				2		2			
4차년도																
5차년도																
계	2	10	2	1	1				1	0	4	1	5	1		

1) 유전자원 등록의 경우 원기분석 결과 발굴된 신규 유전자가 없음.

2) 국립종자원에 문의 결과 GMO인 경우 등록 절차의 어려움.

나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화(소재화)	정책자료	교육지도	언론홍보	기타 (학술대회 발표)
활용건수	2	1(1)			1	
달성도	1 (특허 2건)	(1) (시제품 2건)			예정 (과제 종료후)	1

제 2 절 연도별 연구개발 목표 달성 및 관련분야 기여도

1. 제1 세부 : 버섯 원기형성 관련 단백질 분비서열을 이용한 유용단백질 생산시스템 개발

가. 1차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
1차 년도 (2011.12 -2012.12)	제1세부	o 버섯균사체 배양조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> 균사체 분리 및 배양조건 (배지, 온도, 수분, 광 등) 분석 항생제 내성 분석 	“논문 투고” “인력 양성”
		새송이버섯 균사체 원형질 체 분리, 형질 전환, 재생 (regeneration) 조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> 원형질체 분리/세포벽 분해 효소의 영향 비교 분석 세포벽 분해 조건 확립 적절한 삼투압 안정제의 농도, 균사 배양시간 및 pH 분석 형질전환 방법 확립 (PEG, REMI, Agrobacterium) 	“논문 투고” “인력 양성”
		원기 및 자실체 형성 조건 확립 및 원기 형성 분비물 수집 및 단백질 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 자실체 유도 배지 조건 확립 자실체 유도 조건 (광, 수분, 온도) 분석 분비시스템 분석을 위한 버섯 원기형성 분비물 확보. 버섯 분비물 단백질 분석 (SDS-PAGE & 2-D) 	“논문 투고” “특허출원” “인력 양성”
		원기형성 단백질 특성, 아미노산 서열 분석 및 새송이 버섯 cDNA library 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> MALDI-TOF를 이용한 단백질 PMF 동정 CAF-MALDI sequencing을 이용한 단백질 동정 N-말단 아미노산 서열 분석 Blast search 새송이 버섯 RNA 추출 Total RNA로부터 cDNA 합성 cDNA library 제조 	“특허출원”
		부분 유전자 확보, 염기서열 분석 및 cDNA library screening에 의한 full-length cDNA 확보 및 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> Random oligonucleotide 합성 및 RT-PCR 유전자의 클로닝 및 서열분석, Blast search 부분유전자를 이용 plaque hybridization 유전자 확보 및 BLAST search 유전자 등재 여부/DNA 상동성 ORF 및 제한효소 검색, 염기서열에 의한 아미노산 서열 분석 및 비교, 진화서열 검색 	“논문투고” “인력 양성”
		원기형성 단백질 유전자로부터 promoter/ target 서열 분리 및 Fungal 및 plant vector를 이용한 secretion vector 구성	100	<ul style="list-style-type: none"> 발현벡터 구성에 필요한 promoter 분비 서열 분석 새송이버섯 genomic library 구축 PCR에 의한 promoter 및 신호 서열 분리 Report gene 이용 promoter 세기 조사 Fungal(Plant) vector에 원기형성 관련 promoter, 분비서열 도입 버섯 원기형성 단백질 유전자를 이용한 분비 시스템 구축 	“인력 양성” “논문투고” “특허출원”

나. 2차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
2차 연도 (2012.12 -2013.12)	제1세부	Secretion vector로 GFP 유전자 도입 및 균사체 형질전환체 선별	100	<ul style="list-style-type: none"> - 표지시스템으로 헤파리의 녹색 형광단백질(GFP) 유전자 사용 - GFP 유전자를 이용한 형질전환 재생울 분석 형질전환체 분석 	“논문투고” “인력양성” 연구성과공유
		Genomic DNA 추출에 의한 유전자 도입 여부 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환된 균사체 genomic DNA 추출 - PCR 기법으로 형질전환체 확인 	“논문투고” “인력양성” 연구성과공유
		자실체 유도 및 원기에서 GFP 단백질 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 종균배양/ 톱밥 배지에서 버섯 원기 및 자실체 유도 - 원기 형성 단계 단백질 분석 	“논문투고” “인력양성” 연구성과공유
		조직별 GFP 전사체 분석	90	<ul style="list-style-type: none"> - 조직별 RT-PCR - 분비된 총단백질량과 최종적으로 GFP 생산량 측정 - GFP fluorescence 측정 	“논문투고” “인력양성” 연구성과공유
		GFP 발현 및 분비에 영향을 주는 인자 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - GFP 유전자 발현에 영향을 주는 인자 분석 - 광, 습도, 온도, 영양, 유전적 조건 분석 	“논문투고” “인력양성” 연구성과공유
		유용단백질 관련 유전자 (EPO, EGF, G-CSF, hGH, surfactant, fibrinolytic enzyme) 분리 및 준비	100	<ul style="list-style-type: none"> - PCR 및 cloning에 의한 유용 단백질 유전자 분리, 증폭 및 서열 분석 - 클로닝 strategy (LacP, LacPS, LacPR1b) 수립 	“논문투고” “인력양성” 연구성과공유
		Secretion vector로 유용 유전자들의 도입	100	<ul style="list-style-type: none"> - 버섯의 target 서열을 이용한 분비 vector에 유용유전자 도입 - 대장균에서 재조합 발현백터 구축, 확인, 증폭 및 염기서열분석 - 구축된 재조합 발현 및 분비백터 Agrobacterium으로 도입 - Agrobacterium 형질전환체 분석 	“논문투고” “인력양성”

다. 3차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
3차년도 (2013.12 -2014.12)	제1세부	균사체(자실체) 형질전환 선별 및 자실체 유도	100	<ul style="list-style-type: none"> 균사체 또는 자실체 이용하여 최적화된 형질전환 방법 확립 유용유전자 함유 재조합백터 도입, 및 형질전환체 확보 항생제선별 및 PCR 방법으로 형질전환체 분석 형질전환체 배양 최적화된 자실체 유도 톱밥배지에 종균 접종 및 자실체 유도 	연구성과공유 인력양성
		자실체로부터 원기형성물 수집 및 발현 산물 분석	70	<ul style="list-style-type: none"> 원기형성물 수집, SDS-PAGE Western blot 분석 원기로 발현 및 분비에 영향을 주는 요인 분석 (배지, 광, 습도, 온도, 유전적조건) 효율적인 원기회수 방법 개발 및 확립 	논문투고 인력양성 연구성과공유 국내바이오산업기술력향상
		재조합 새송이버섯 조직별 발현 pattern 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 자실체로부터 RNA 추출 유전자별 특이적 primer 이용 RT-PCR 분석 (Northern blot) 자실체로부터 단백질 추출 및 SDS-PAGE, Western blot 분석 	논문투고 인력양성 국내바이오산업기술력향상
		Bioreactor 이용 균사체 대량생산	100	<ul style="list-style-type: none"> 재조합 균사체 발효조건 확립 및 대량배양 (5 L &, 20 L) 균사체 및 발효액으로부터 단백질 분석 (정량화, 생산성) 	인력양성 국내바이오산업기술력향상
		중균 생산 시설 및 대형발효조 이용 생산시스템 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> Mass production (중균업체 및 대형발효조) 시스템 확립 단백질 대량생산 공장 시스템 개발 대량생산 공정의 최적화 	인력양성 국내바이오산업기술력향상
		부분 정제법 개발 및 생물학적 활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> Chromatography & metal chelating 법 단백질 부분 정제, 생물학적 활성 분석 (in vitro, in vivo) 	특허출원 국내바이오산업기술력향상
		유용단백질 대량 생산 및 산업화를 위한 시장성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 제형화에 의한 기능성 소재화 다양한 형태의 시제품 개발 기능성 소재로서 의약품 원료 화장품, 사료 등 다양한 산업적 소재 개발 (필드시험) 산업적 활용을 위해 제약 및 화장품 업체 등과 협의 및 시장성 분석 산학협동을 통한 상품화 추진 	기능성소재화 시제품 및 상품개발 국내바이오산업기술력향상
		특허, 논문, 보고서 작성	100	<ul style="list-style-type: none"> 최종보고서 작성 국내, 국제논문, 특허출원 산업화를 위한 기술이전 	제품개발 기술이전

2. 제 2 세부 협동 : 새송이버섯 형질전환법 개발에 의한 기능성 강화 버섯 품종 개량

가. 1차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
1차 연도 (2011.12 -2012.12)	협동	여러 종 유래 알려진 색소 관련 유전자 검색	100	<ul style="list-style-type: none"> - 색소관련 유전자 검색 : Genebank database/ EMBL databsae /Pubmed - 커피박을 이용한 균사체 생육 촉진 및 기능성 증대 연구 	“논문 투고” “인력 양성” “특허 출원”
		한국산 토종 자원 (뽕나무, 체리나무 잎 및 열매)으로 부터 RNA 추출	100	<ul style="list-style-type: none"> - 포도, 오디, 복분자 열매로부터 total RNA 및 genomic DNA추출 - Haematococcus pluvialis 배양 및 균체로부터 total RNA추출 	“인력 양성”
		색소 유전자 specific primer 제작 및 증폭	100	<ul style="list-style-type: none"> - β-carotenoid, anthocyanin 색소 유전자 특성 분석 - 색소 유전자 공통적 염기서열로부터 primer 합성 - RT-PCR 및 PCR 기법으로 색소 유전자 확보 - IPAC 유전자확보 - β-C-4 oxygenase (crtO) 유전자 증폭 및 cloning - 포도 myb 유전자 확보 및 T-vector cloning 	“인력 양성”
		유전자 확보에 의한 염기서열 및 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - BLAST search를 통하여 유전자 분석 - 제한효소 검색, 염기서열에 의한 아미노산 서열 분석 	“인력 양성”
		유용유전자 도입을 위한 발현벡터제조	100	<ul style="list-style-type: none"> - 유용 유전자 확보 (HBsAg, GAD) - 여러 종류의 promoter를 갖는 발현벡터제조 - HBsAg cloning, 재조합, 서열분석, E. coli 발현검정 - GAD67 cloning, 재조합, 서열분석, E. coli 발현검정 	“인력 양성”

나. 2차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
2차 연도 (2012.12 -2013.12)	협동	Fungal 및 plant vector로 색소 관련 유전자 도입	100	<ul style="list-style-type: none"> - 색소 유전자 PCR 방법으로 분리, 발현 벡터에 도입 준비 - Fungal (pBARGPE1) 및 plant vector (pBI121 & pPEV)에 색소 관련 유전자 도입 - 6종 버섯 genomic DNA 추출 및 3종의 버섯 gpd promoter cloning 및 pCambia1300 도입 - GUS 발현 비교분석 - 색소유전자 발현vector 제조 	“인력양성”
		새송이 균사체로 형질전환 및 형질전환체 선별	90	<ul style="list-style-type: none"> - 식물 벡터/<i>A. tumefaciens</i> 이용 하여 형질전환 - Aluminum oxide 이용 mechanical wound을 통한 간편 형질전환법 확립 - PCR 방법으로 hygromycin 저항성 형질 전환체 선별/배양 및 열기서열 분석 	“인력양성”
		균사체 배양 및 자실체 유도	90	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 형질전환 균사체 종균 배양 - 천연물이용 균사체 성장촉진 - 당근배지이용 균사체 성장촉진 - 최적화된 자실체 유도 배지에 종균 접종 - 자실체 형성 후, 컬러 변화 분석 - metal ion 첨가에 의한 자실체 생성 - 당근추출액 첨가에 의한 자실체 성분변화 	“인력양성”
		조직별 색소 유전자 및 전사체 확인	90	<ul style="list-style-type: none"> - pCamPAC, pCammyb, pCamcrtO 도입 형질전환체 대상 * RT-PCR, Southern blot, Northern blot 분석 	“인력양성”
		자실체 형성에 영향을 주는 요인 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> - 배지, 광, 습도, 온도, 유전적 조건 분석 	“인력양성”
		Fungal 및 plant vector로 기능성관련 유용유전자 (GAD, HBsAg) 도입 및 발현 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - pCamHBsAg, pCamGAD1 - <i>A. tumefaciens</i> 이용 형질전환 - PCR, northern, southern, western blot 분석 	“인력양성”

다. 3차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부과제 명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
3차년도 (2013.12- 2014.12)	협동	후대 검정을 위한 포자분리 제 2세대 균사체 및 자실체 재유도 제 2세대 line 구축에 의한 중균 생산	80	<ul style="list-style-type: none"> - 포자분리를 통한 후대검정으로 유전적 안정성 분석 - 자실체 재유도에 의한 컬러 변화 분석 - 형질전환된 새송이 버섯 균사체 및 자실체 확보 - 후대 검증된 중균 계통 유지 - 품종 우수성 분석 	“인력양성”
		기능성 강화 새송이 신품종 field test	80	<ul style="list-style-type: none"> - 새송이 버섯 농가에서 재배 - 생육 형태 및 색소 유전자 변화 분석 - mouse모델이용 식용백신가능성 test - BALB/c 및 NOD mouse이용 표면항원단백질 항체 생성 확인 및 혈당변화 측정 	“인력양성” “논문투고”
		새송이 품종별 EPS 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 균사체배양에 의한 EPS 생산 최적화 - EPS 함량 및 기능성 분석 및 소재화 가능성 test - Cancer cell viability test 	“인력양성”
		버섯 관능 test	100	<ul style="list-style-type: none"> - 주관적 요소들 (맛, 향, 색, 조직 감)을 평가 	“인력양성”
		기능성 물질(색소) 추출 생산 및 안정성 test	80	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 색소 성분 정제공정 조건 확립 및 기능성 소재화 - 식품소재 가공 적성 평가 - 동물실험으로 안정성 검사 (태가대 안정성센터) 	“인력양성”
		색소를 이용한 건강보조식품 개발	70	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 물질 (색소) 함유 다양한 형태의 제품 개발 가능성 타진 (참여기업과 공동 개발) 	“인력양성”
		새송이 신품종 등록 및 특허권 확보	60	<ul style="list-style-type: none"> - 지적재산권 및 방어적 개념의 특허 확보 	“인력양성”

3. 평가의 착안점 및 기준

<1차년도>

순번	평가 착안점	배점 (100)	내용	비고
1	원기단백질 (유전자) 분석	20	2D 분석에 의한 3개 spot 분석 및 관련유전자 클로닝 (1종 이상 cDNA 및 gDNA)	20
2	유전자 은행 구축	20	cDNA library 구성 (1×10^6 cfu/ul) 및 genomic library (1×10^5 cfu/ul)	20
3	관련 유전자 확보 및 클로닝	20	의약품관련 6종의 유전자 (EPO, EGF, G-CSF, hGH, fibrinolytic enzyme, surfactant protein) 색소관련 2종 유전자 (carotenoid, anthocyanin) RT-PCR 및 클로닝	20
4	형질전환법 개발에 의한 효율 증진	20	균사체 배양, 형질전환, 재생조건 확립, 기존 방법보다 30% 정도 형질전환 효율 향상	20
5	분비백터 구성 여부	20	기존 promoter보다 전사율 (20%이상) 및 분비율 (50%이상) 증가	20

<2차년도>

순번	평가 착안점	배점 (100)	내용	비고
1	분비백터로 GFP 클로닝 및 형질전환체 구성 여부	25	GFP 유전자 확보, 분비백터로 도입, 서열분석, 형질전환체 확보 (PCR, southern, northern)	25
2	자실체 유도, GFP 전사체, 단백질 분석 방법 확립 여부	25	조직별 GFP 전사체 및 단백질 정량화, 발현 및 분비에 영향을 주는 인자 최적화	25
3	분비백터로 6종의 유용(의약품 관련) 유전자 도입 여부	25	EPO, EGF, G-CSF, hGH, fibrinolytic enzyme, surfactant protein, 유전자들의 3종 promoter별 재조합 백터 구성 (총 18종)	25
4	색소(유용)유전자도입 및 형질전환체 확보 및 분석	25	2종의 색소유전자 (carotenoid, anthocyanin) 및 추가로 식용백신 관련 2종의 유전자 (HBsAg, GAD) 도입 재조합백터 및 형질전환체 구성, 분석, 최적화	25

<3차년도>

순번	평가 착안점	배점 (100)	내용	비고
1	유용(의약) 유전자가 도입된 형질전환체 확보 및 분석	15	3종 promoter별 6종류 유용(의약) 유전자가 도입된 18종의 형질전환체 확보 및 분석	15
2	원기로 발현 및 분비 최적화	15	SDS-PAGE, Western, MALDI-TOF, N-말단분석 등에 의해 전체 단백질 함량의 10-20% 정도의 발현율과 원기내로 50% 이상 분비율 증진 (좋은 효율의 단백질 1종이상 선별)	10
3	대량생산 시스템 구축	15	Bioreactor 이용 균사체배양 (세포내, 외 단백질 함량 10% 이상) 버섯농장 생산시스템 확립 및 원기회수 자동화 (2만기/1 동)	15
4	기능성강화 품종 확립	15	후대검정 (제4 세대) 및 field test (버섯농장), 식용백신 개발 및 새송이 품종별 EPS 소재화 가능성 test (각 1종이상)	15
5	생물학적 활성 및 안정(전)성 test	20	세포 및 동물실험 (생리활성, 성장촉진, 항보체, 항산화 등), original과 비교 90% 이상의 활성, 안전성센터 의뢰	20
6	기능성 바이오의약소재 및 건강보조식품 개발 여부	20	기능성 바이오 의약소재 1건 이상 및 기능성 건강식품 상품화 1건 이상	15

<최종>

순번	평가 착안점	배점 (100)	내용	비고
1	형질전환법 개발에 의한 효율 증진 여부	10	기존 방법보다 30% 정도 형질전환 효율 향상 여부	8
2	원기단백질 (유전자) 분석에 의한 분비백터 구성 여부	10	cDNA library (1x 10 ⁶ cfu/ul) 및 gDNA library (1x 10 ⁵ cfu/ul) 구성, 기존 promoter보다 전사율 (20%이상) 및 분비율 (50%이상) 증가 여부.	10
3	유전자 도입에 의한 재조합 형질전환체 구성 여부	10	8개 유전자 (EPO, EGF, G-CSF, hGH, fibrinolytic enzyme, surfactant protein, carotenoid, anthocyanin)가 분비 및 발현 백터에 클로닝되어 세송이버섯에 도입된 재조합 형질전환체	10
4	색소 유전자 도입에 따른 재조합 세송이 버섯대로 발현여부	10	세송이버섯 대조군에 비해 색소함량 3-4 배 증가된 품종 개발	7
5	유용 유전자 도입에 따른 발현 및 원기 (균사체) 내 분비 및 생물학적 활성 여부	10	전체 단백질 함량의 10-20% 정도의 발현율과 원기내로 50% 이상 분비율 증진 및 기존의 단백질과 비교 90%이상의 생리활성	8
6	단백질 생산을 위한 버섯 공장 시스템 및 bioreactor 이용 균사체 대량생산 시스템 구축 여부	10	원기회수 자동화 및 균사체 대량 배양에 의한 발효액으로 분비 여부	9
7	연구성과 수행여부 (미비한 연구성과는 사후관리 시 보완예정임)	40	원천기술에 대한 특허 및 기술이전 여부 (특허 2건, 기술이전 2건) 의약 원재료 소재화 및 기능성 건강식품 상품화 여부 (상품화 1건, 소재화 1건) 신규 유전자에 대한 유전자 등록 여부 (유전자 등록 1건) 신규 품종에 의한 품종등록 여부 (품종 등록 1건, 품종보호 1건) 국내·국제 논문 발간 여부 (국내 5편, 국제논문 4편) 대학원생 배출 여부 (대학원생 4명)	32 -특허등록1건 -출원 9건. -기술이전1건 -신규유전자 없음 - GMO품종 등록어려움 -국내논문1편 -국제논문1편 (논문예정) -대학원생4명 -소재화1건 -학회발표1건

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구논문 및 학술대회 발표

가. 국내 연구논문

- (1) Choi, J. W., D. I. Shin, and H. S. Park. 2012. Enhancement of growth and bioactivity of *Pleurotus eryngii* mycelia by spent coffee ground. Journal of Agriculture & Life Science. 46(6), 157-163.



나. 국제 연구논문

- (1) Park, H. S. and J. W. Choi. 2014. Functional expression of bovine growth hormone gene in *Pleurotus eryngii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17, 176-184. (SCIE, IF = 1.004)

Biotechnology and Bioprocess Engineering 19: 33-42 (2014)
DOI 10.1007/s12257-013-0651-3

RESEARCH PAPER

Functional Expression of Bovine Growth Hormone Gene in *Pleurotus eryngii*

Hee Sung Park and Jang Won Choi

Received: 7 October 2013 / Revised: 20 November 2013 / Accepted: 21 November 2013
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2014

Abstract The expression of the bovine growth hormone (bGH) gene was examined in *Pleurotus eryngii*, which belongs to the family of oyster mushrooms. The region encoding mature bGH, which has a variety of regulatory effects on growth and metabolic processes, was amplified using designed primers containing initiation and termination codons and then subcloned into pPEV binary expression vector. The recombinant vector (pPEVbGH) was introduced in *P. eryngii* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Recombinant bGH was expressed in *P. eryngii* harboring pPEVbGH vector under control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter up to a level of approximately 26% of total cell proteins after 6 days of cultivation, after which the recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Interestingly, the growth rate of *P. eryngii* mycelia harboring pPEVbGH vector was approximately three times faster than that of control *P. eryngii*, suggesting that bGH affected the growth of *P. eryngii*. Biological activities were examined in Sprague-Dawley rats, which were administered regular feed mixed with mycelial extracts containing bGH (0.1 or 0.2 µg of bGH per g of animal feed). Mycelial extracts containing bGH significantly affected growth rates and lipid profiles; total cholesterol, triglyceride, HDL, and LDL levels were improved in rats fed mycelial extracts compared with those administered regular feed containing non-transgenic *P. eryngii*. This result indicates that *P. eryngii* harboring pPEVbGH vector could produce biologically active bGH. Further, levels of all growth-related factors increased, resulting in faster growth rates in bGH-treated groups. Accordingly, these data suggest that *P. eryngii* can be applied to the production of industrially useful proteins using a plant expression vector as an efficient mushroom host system.

Keywords: *Pleurotus eryngii*, CaMV 35S promoter, bGH, biological activity

1. Introduction

Saesongi (*Pleurotus eryngii*), known as king trumpet mushroom, French horn mushroom, and king oyster mushroom, is an edible mushroom native to the Mediterranean region of Europe, the Middle East, and North Africa, but it is also grown in parts of Asia [1]. It is a saprophyte with the following taxological classification: Fungi, Basidiomycotina, Agaricomycetes, Agaricales, Pleurotaceae, and *Pleurotus*. While most agaric fungal fruiting bodies naturally adhere to the stumps or trunks of decaying trees as a part of their decomposition process, Saesongi can grow gregariously as a mycelium or bundle in the grassland soil of subtropical regions [2]. Further, it is considered as the best of all *Pleurotus* species due to its excellent cap and stem consistency, culinary qualities, and longest shelf life compared to any other oyster mushroom [3].

P. eryngii has been reported to exhibit anti-aging and anti-tumor effects [4], angiotensin-converting enzyme inhibition activity [5], cholesterol-altering activity in diabetic rats, and blood glucose-lowering properties [6]. Previous studies have examined its mycelial growth and artificial cultivation [7], as well as obtained a novel anti-fungal peptide from its fruiting bodies [8]. *P. eryngii* has also been

Hee Sung Park
Department of Biotechnology, Daegu Catholic University, Gyeongsan,
Gyeongbuk 712-714, Korea

Jang Won Choi*
Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea
Tel: +82-53-850-6756; Fax: +82-53-850-6769
E-mail: chjwoni@daegu.ac.kr

Springer

다. 학술대회 발표

- (1) M. G. Lee, K. B. Koo and J. W. Choi. 2014. Functional expression of the human growth hormone gene in mycelia of *Pleurotus eryngii*. Annual Meeting of the Korean Society for Plant Biotechnology. "Genome to Phenome in Plants". Daegu, 2014. 10. 30. P1-47

**2014 한국식물생명공학회 추계학술발표회 · 정기총회
및 9th 한일국제공동심포지움**



“Genome to Phenome in Plants”

일시: 2014년 10월30일(목) ~ 10월31일(금)

장소: 경북대학교 글로벌플라자

주관: (사)한국식물생명공학회

주최: (사)한국식물생명공학회, 경북대학교 원예과학과 BK21사업팀,
GM작물실용화사업단, GSP-채소종자사업단, GSP-원예종자사업단

후원: (사)경북세계농업포럼, 경북대학교 농업과학기술연구소, 경북대학교, 한그루



P1-47

Functional expression of the human growth hormone gene in mycelia of *Pleurotus eryngii*Min Gu Lee¹, Kwang Bon Koo², Jang Won Choi^{2*}¹Dept. of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea;²Dept. of Bioindustry, Daegu University, Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea.

To examine the expression of human growth hormone (hGH) gene in *Pleurotus eryngii*, which belongs to the family of oyster mushrooms. Growth hormone is responsible for a variety of regulatory effects on growth and various metabolic processes including nitrogen, lipid, mineral, and carbohydrate metabolism. The hGH gene was amplified using the designed primers and subcloned into binary expression vector pCambia, which contains the laccase promoter and nopaline synthase (nos) terminator. Recombinant expression vector (pCamlacPhGH) was introduced in *P. eryngii* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Transformed mycelium was screened on MCM agar plate containing hygromycin (30 μ g/ml) and cefotaxime (200 μ g/ml) and confirmed by PCR amplification and sequencing. The mycelium harboring pCamlacPhGH was grown at 25 $^{\circ}$ C for 8 days in MCM (mushroom complete medium) containing hygromycin (30 μ g/ml) and then the expression levels of hGH protein were analyzed by SDS-PAGE and western blot. The hGH protein was produced to considerable levels in the range of 4% (1 day) to 15% (8 days) of total mycelial proteins and the hGH bands appeared larger than the position of purified hGH (21 kDa) due to mobility retardation of crude extracts. Furthermore, hGH protein was immunologically detected by western blot using polyclonal anti-hGH antibody. Interestingly, transformed mycelium of *P. eryngii* showed significant increase in mycelial growth rate (approximately 3.8 fold than the control). Finally, this fungal expression system was also thought to be effective for expression and production of functional proteins.

*Corresponding author: Tel. 053-850-6756, e-mail: chjawo@daegu.ac.kr

Functional Expression of the Human Growth Hormone Gene in Mycelia of *Pleurotus eryngii*

Min Gu Lee¹, Kwang Bon Koo² and Jang Won Choi²

¹Dept of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-702, Korea

²Dept of Bioindustry, Daegu University, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-714, Korea.

Abstract

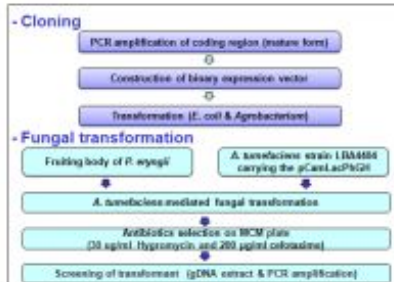
To examine the expression of human growth hormone (hGH) gene in *Pleurotus eryngii*, which belongs to the family of oyster mushrooms. Growth hormone is responsible for a variety of regulatory effects on growth and various metabolic processes including nitrogen, lipid, mineral, and carbohydrate metabolism. The hGH gene was amplified using the designed primers and subcloned into binary expression vector pCambia, which contains the lacC promoter and nopaline synthase (nos) terminator. Recombinant expression vector (pCamLacPhGH) was introduced in *P. eryngii* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Transformed mycelium was screened on MCM agar plate containing hygromycin (30 µg/ml) and cefotaxime (200 µg/ml) and confirmed by PCR amplification and sequencing. The mycelium harboring pCamLacPhGH was grown at 25°C for 8 days in MCM (mushroom complete medium) containing hygromycin (30 µg/ml) and then the expression levels of hGH protein were analyzed by SDS-PAGE and western blot. The hGH protein was produced to considerable levels in the range of 4% (1 day) to 15% (8 days) of total mycelial proteins and the hGH bands appeared larger than the position of purified hGH (21 kDa) due to mobility retardation of crude extracts. Furthermore, hGH protein was immunologically detected by western blot using polyclonal anti-hGH antibody. Interestingly, transformed mycelium of *P. eryngii* showed significant increase in mycelial growth rate (approximately 3.8 fold than the control). Finally, this fungal expression system was also thought to be effective for expression and production of functional proteins.

Introduction

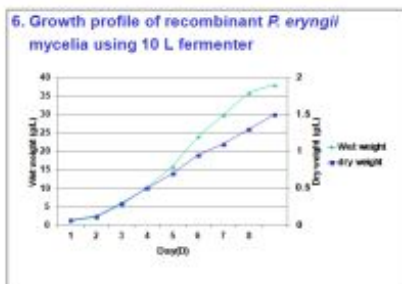
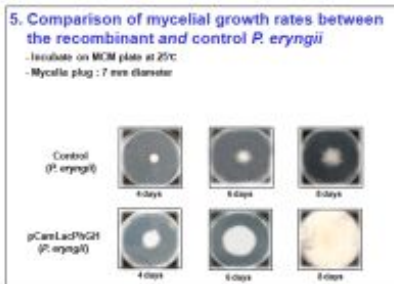
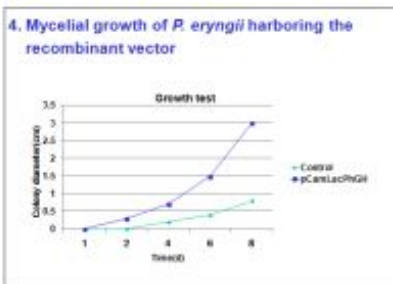
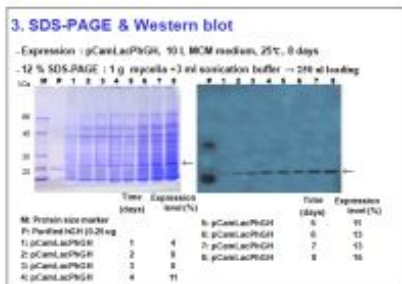
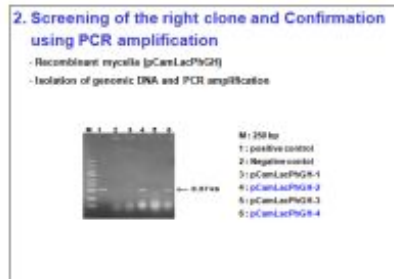
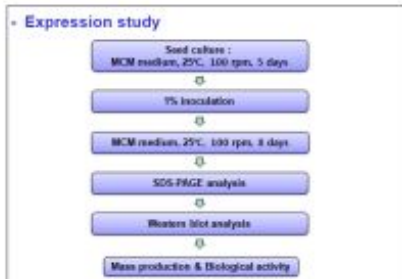
- Human Growth Hormone (hGH)**
 - Responsible for variety of regulatory effects on growth
 - Protein of MW 21 kDa consisting of single polypeptide chain of 191 amino acids
 - various metabolic processes including nitrogen, lipid, mineral, and carbohydrate metabolism
- Pleurotus eryngii***
 - Class : Agaricomycetes
 - Family : Pleurotaceae
 - Common name : King oyster mushroom
 - Edible mushroom
- Purpose**
 - The expression of the hGH gene under control of lacC promoter in mycelia of *P. eryngii*
 - Development of functional gene expression system in fungi (Expression & Secretion vector)
 - Finally development of growth-stimulation material, cosmetic ingredient, and feed additive

Materials and Methods

- Plasmid and Strain**
 - pCamLac⁺ vector (10.5 kb) : LacCase promoter, nos terminator, selection marker (Hygromycin)
 - Pleurotus eryngii*
 - A. tumefaciens* LB4404 (Act1, pTiAch5, 5n⁺ 5p⁺)
- Seed & Batch culture**
 - MCM medium : 0.2% lactocytosine, 0.2% yeast extract, 2% glucose, 0.05% MgSO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.046% KH₂PO₄, 25°C, 100 rpm
- Fermentation**
 - MCM medium : 0.2% lactocytosine, 0.2% yeast extract, 2% glucose, 0.05% MgSO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.046% KH₂PO₄
 - Temperature, 25°C; aeration rate, 0.5 vvm; agitation speed, 200 rpm; initial pH 5.8; working volume, 10 L



Results



Conclusion

- Protein expression**
 - The recombinant protein size : 21 kDa
 - Exp. level of hGH : Approx. 4 (1 day) ~ 15% (8 day) of total mycelial proteins
 - The amount of hGH was produced to 140-150 µg/g of mycelia
- Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation**
 - Agrobacterium-mediated transformation is working for fungal system
 - Powerful technique for the production of proteins
- Mycelial growth**
 - The maximum yield of mycelium : 36 g/L after 8 days of growth
 - The maximum yield of dry mycelium : 1.5 g/L after 8 days of growth
 - Increased by approximately 3.8 fold than the control
- Further study**
 - Mass production & purification
 - Measurement of biological activity
 - Application study for growth-stimulation material, cosmetic ingredient, and feed additive


References

- Oh, K.H., B.Y. Cheon, S.H. Cho, H.Q. Truong, S.H. Oh, J.U. Jeong, J.W. Choi, and J.S. Shin. 2003. Expression of the bovine growth hormone alters the root morphology in transgenic tobacco plant (2003). *Transgenic Res.* 12(3), 363-367.
- Park, H.S. and J.W. Choi. 2014. Functional expression of bovine growth hormone gene in *Pleurotus eryngii*. *Biotechnology and Bioengineering* 15, 33-42.
- Mitchels, C.B., Hooykaas, P.J.J., van der Horst, C.A.M.J.J., and Ram, A.F.J. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi (2005). *Curr. Genet.* 48(1), 1-17.
- Salek, R.K. and K.R. Anja. 2007. Significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation: effect on growth and yield of Agaricus bisporus (Lange) Sing (2007). *Journal of Agricultural Technology*, 3(2), 341-353.

2. 특허 등록 및 출원

가. 특허등록

- (1) Composition of culture medium for mushroom mycelium comprising spent coffee ground (Application date 2012.10.19; Application number 10-2012-0116338 Release date: 2014.11.10.; Release number 10-1462233)



특 허 증
CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1462233 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2012-0116338 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2012년 10월 19일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2014년 11월 10일


발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
커피박을 유효성분으로 함유하는 새송이 버섯 균사체 배양 배지 조성물


특허권자 (PATENTEE)
대구대학교 산학협력단(174871-0*****)
경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201 (대구대학교)

발명자 (INVENTOR)
등록사항만에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2014년 11월 10일

 **특허청장 김 영**
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



전자등록료는 2017년부터 매년 11월 10일까지 납부하여야 하며, 등록원부로 권리관계를 확인하실 수 있습니다.

등록사항

특 허 등록 제 10-1462233 호
(PATENT NUMBER)

발명자 (INVENTOR)





(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월20일

(11) 등록번호 10-1462233

(24) 등록일자 2014년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)
A23K 1/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0116338

(22) 출원일자 2012년10월19일

심사청구일자 2012년10월19일

(66) 공개번호 10-2014-0050236

(43) 공개일자 2014년04월29일

(56) 선행기술조사문헌

JP2004033005 A*

KR1020060030839 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

대구대학교 산학협력단

경상북도 경산시 전량읍 대구대로 201 (대구대학교)

(72) 발명자

(74) 대리인

이덕복

권재 청구할 수 : 총 2 항

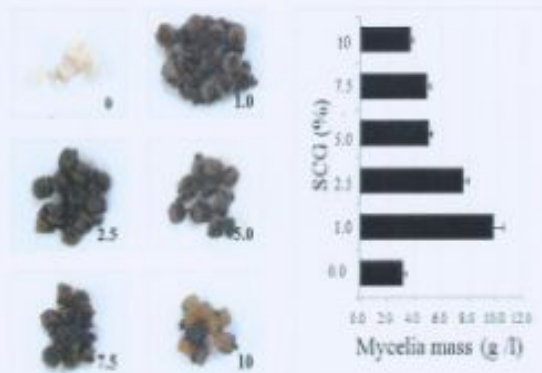
심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 커퍼박을 유효성분으로 함유하는 새송이 피셋 균사체 배양 배지 조성물

(57) 요약

본 발명은 커퍼박을 유효성분으로 함유하는 균사체 성장 촉진용 또는 향산화활성이 증대된 균사체 생산용 배지 조성물을 제공하고 상기 배지 조성물을 이용하여 생장속도가 촉진되고 향산화 활성이 증대된 피셋 균사체를 제공하는 효과가 있고 커퍼박을 이용하여 균사체 배양용 배지 조성물을 제조함으로써 산업폐기물을 자원화하는 뛰어난 효과가 있으므로 자원순환산업에 매우 유용한 발명인 것이다.

대표도 - 도2



나. 특허출원

- (1) A recombinant vector for transformation of *Pleurotus eryngii* and methods for preparation of target protein using the same : Application date 2013.10.16; Application number 10-2013-0123254

발급번호 : 5-5-2015-007157312



출원사실증명원
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	대구대학교 산학협력단 Industry Academic Cooperation Foundation, Daegu University	주민번호 Residence No	
	주소		전화번호	
발명자 Inventor	성명 Name		주민번호 Residence No	
	주소		전화번호	
출원번호 Application Number		특허-2013-0123254 PATENT-2013-0123254	출원일자 Filing Date	2013년 10월 16일 OCT 16, 2013
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상품(서비스업)류 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark		새송이버섯 형질전환용 재조합 벡터 및 이를 이용한 목적 단백질 제조방법 A Recombinant Vector for Transformation of <i>Pleurotus eryngii</i> and Methods for Preparation of Target Protein Using the Same		
용도		확인용	IPC 분류	C12N 15/80
최종처분상태			최종처분일	
<p>위 사실을 증명함. This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2015년 01월 27일</p> <p>특 허 청 COMMISSIONER</p> 				

◆ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었는데, 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)의 '특허청-민간특허증명서발급' 메뉴를 통해 발급번호 또는 출원인명의 피크드로 내용의 위·변조 여부를 확인할 수 있습니다. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.

- (2) Production methods of foreign protein using secretion vector in *Pleurotus eryngii* :
Application date 2013.10.16; Application number 10-2013-0123273

발급번호 : 5-5-2015-007162262



출원사실증명원 CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	대구대학교 산학협력단 Industry Academic Cooperation Foundation, Daegu University	주민번호 Residence No	174871-0*****
	주소		전화번호	
발명자 Inventor	성명 Name		주민번호 Residence No	
	주소		전화번호	
출원번호 Application Number	특허-2013-0123273 PATENT-2013-0123273		출원일자 Filing Date	2013년 10월 16일 OCT 16, 2013
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상표(서비스업)류 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark	새송이버섯 분비 벡터를 이용한 목적 단백질 생산 방법 Production Methods of Foreign Protein Using Secretion Vector in <i>Pleurotus eryngii</i>			
용도	확인용	IPC 분류	C12N 15/80	
최종 처분 상태		최종 처분일		
<p>위 사실을 증명함. This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2015년 01월 27일</p> <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">특 허 청</p> <p style="font-weight: bold;">COMMISSIONER</p> 				

◆ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 복제본 유통이시(www.kipo.go.kr)의 '특허-발급내역조회'와 '특허-발급내역조회'를 통해 발급번호 또는 발명(고안)의 명칭으로 내용의 정확성을 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 10월까지 가능합니다.

- (3) Secretion vector harboring laccase promoter of *Pleurotus eryngii* and methods for preparation of target protein using the same : Application date 2013.10.16; Application number 10-2013-0123293

발급번호 : 5-5-2015-007161351



출원사실증명원
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	대구대학교 산학협력단 Industry Academic Cooperation Foundation, Daegu University	주민번호 Residence No	174871-0*****
	주소		전화번호	
발명자 Inventor	성명 Name		주민번호 Residence No	
	주소		전화번호	
출원번호 Application Number		특허-2013-0123293 PATENT-2013-0123293	출원일자 Filing Date	2013년 10월 16일 OCT 16, 2013
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상품(서비스업)류 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark		새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 재조합 분비 벡터 및 이를 이용한 목적 단백질 제조방법 Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of <i>Pleurotus eryngii</i> and Methods for Preparation of Target Protein Using the Same		
용도	학인용	IPC 분류	C12N 15/80	
최종처분상태		최종처분일		
<p>위 사실을 증명함. This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korean Intellectual Property Office</p> <p>2015년 01월 27일</p> <p>특 허 청  COMMISSIONER</p>				

● 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 추가항목 확인이 필요 시 www.kipo.go.kr 또는 특허-민간협력사업발급과 확인을 위해 발급번호 또는 문서번호의 대조번호, 내역과 특·허·청·번호를 확인해 주십시오. 단, 발급번호를 통한 확인은 90일까지 가능합니다.

- (4) Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Epidermal Growth Factor Protein Using the Same : Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180050

출원번호통지서 1의 3페이지

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.12.15
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2014-0180050 (접수번호 1-1-2014-1214390-09)
출원인명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)
발명자성명 최장원
발명의명칭 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 항질전환용 분비백터를 이용한 표피성장인자 단백질 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의건서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [관자특고한거서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

- (5) Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Human Growth Hormone Protein Using the Same : Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180054

출원번호통지서 1의 3페이지

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.12.15
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2014-0180054 (접수번호 1-1-2014-1214422-72)
출원인명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)
발명자성명 최장원
발명의명칭 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 분배벡터를 이용한 인간 성장 호르몬 단백질 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허/마약-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [간지적교환허가서(PTO/38/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

- (6) Production Methods of Epidermal Growth Factor Protein using a Vector for Transforming *Pleurotus eryngii* : Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180062

출원번호통지서 1의 3페이지

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.12.15
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2014-0180062 (접수번호 1-1-2014-1214467-15)
 출원인명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)
 발명자성명 최장연
 발명의명칭 새송이버섯 형질전환용 재조합 벡터를 이용한 표피성장인자 단백질 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 선영, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허야당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

- (7) Production Methods of Human Growth Hormone Protein using a Vector for Transforming *Pleurotus eryngii* : Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180064

출원번호통지서 1의 3페이지

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.12.15
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2014-0180064 (접수번호 1-1-2014-1214489-19)
 출원인명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)
 발명자성명 최장원
 발명의명칭 새송이버섯 형질전환용 재조합 벡터를 이용한 인간 성장 호르몬 단백질 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교원허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

(8) Production Methods of Epidermal Growth Factor Protein Using Secretion Vector in *Pleurotus eryngii* : Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180071

출원번호통지서 1의 3페이지

관인생략
출원번호통지서

출원 일자 2014.12.15
특기 사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원 번호 10-2014-0180071 (접수번호 1-1-2014-1214549-61)
출원인 명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)
발명자 성명 최장원
발명의 명칭 새송이버섯 로비 벡터를 이용한 표피성장인자 단백질 생산 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+ 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경 (경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 검색 > 인연서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

- (9) Production Methods of Human Growth Hormone Protein Using Secretion Vector in *Pleurotus eryngii* : Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180078

출원번호통지서 1의 3페이지

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.12.15
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2014-0180078 (점수번호 1-1-2014-1214591-79)
 출원인명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)
 발명자성명 최장현
 발명의명칭 서송이버섯 분비 백터를 이용한 인간 성장 호르몬 단백질 생산 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경 (경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태여면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

제 2 절 연구성과 활용 계획

1. 기술이전

(1) 참여기업 :

(2) 기술이전 기업 :

(3) 이전기술 :

(가) Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Epidermal Growth Factor Protein Using the Same (Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180050)

(나) Secretion Vector Harboring Laccase Promoter of *Pleurotus eryngii* and Methods for Preparation of Human Growth Hormone Protein Using the Same (Application date 2014.12.15; Application number 10-2014-0180054)

(3) 기술이전 형태 : 통상실시권 (2 년)

(4) 기술료 :

(5) 기술이전계약서

기술이전 계약서

특허권이 있는 기술의 권리권자 대구대학교 산학협력단(이하 "갑"이라 함)과 실시권자 (주)그린팜(이하 "을"이라 함)은 "갑"이 권리를 보유하고 있는 특허의 양도와 관련하여 다음과 같이 계약을 체결한다.

다 음

제1조 (정의)

- ① 이 계약에서 "기술"이라 함은 "새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 분비벡터를 이용한 표피성장인자 단백질 제조방법(출원번호 : 10-2014-0180050)과 새송이버섯의 라카아제 프로모터를 함유하는 형질전환용 분비벡터를 이용한 인간 성장 호르몬 단백질 제조방법(출원번호 : 10-2014-0180054)"을 의미한다.
- ② 이 계약에서 "실시"라 함은 상기기술을 이용하여 제품을 생산 및 사용하는 것을 의미한다.

제2조 (기술이전 내용)

- ① "갑"은 "을"이 본 협약의 조건에 따라 대한민국 내에서 "기술"을 실시하는데 동의하며 "을"에게 "통상실시권"을 허락한다. 단, 국외실시의 경우에는 제4조에 따른다.
- ② 제①항의 "통상실시권"은 계약이 정한범위 내에서 당해 "기술"을 이용가능하며 제품생산, 원가절감(생산성향상), 품질향상 등을 할 수 있는 권리를 말한다.
- ③ "을"은 사전에 "갑"의 서면동의 없이 제3자에게 동 실시권을 여하한 형태로도 제공하거나 양도할 수 없다.
- ④ "갑"은 "을"이 "기술"을 실시하지 아니하는 부분에 대하여는 실시권을 포기한 것으로 간주할 수 있다.

제3조 (계약기간)

본 계약의 계약기간은 본 기술이전 계약서의 계약일로부터 2년이 되는 날까지로 하되, 쌍방 합의에 의하여 연장할 수 있다. 계약종료일의 다음날부터

이 계약은 해제 또는 해지된 것으로 한다.

제4조 (국외실시)

“국외실시”는 대한민국 이외의 지역에 실시권을 허여하거나 기술을 수출하는 것(동 지역에서 제품을 생산, 판매하는 행위 포함)을 말하며, “을”이 “기술”을 “국외실시”하고자 하는 경우 사전에 “갑”과 협의하여 이 계약과 별도로 “국외실시”에 관한 실시계약을 체결하여야 한다.

제5조 (기술료 및 특허유지비용의 지급)

① “을”은 본 “통상실시권”에 대한 대가로서 제②항의 기술료를 “갑”에게 납부한다. 이 조항은 제2조 제④항에 의거 “을”이 “기술”의 일부 또는 전부를 포기할 경우에도 계속 유효하다.

②

③ “을”은 경상기술료의 정산을 매년 1회하는 것을 원칙으로 하고, 매년 2월말까지 전년 1월1일부터 12월31일까지의 기간 동안 발생한 제품판매액의 3%를 “갑”에게 지급하여야 하며, 본 계약기간 만료년도에는 만료일부터 60일 이내에 지불하여야 한다.

제6조 (기술의 개량)

“을” 또는 “을”의 임원 및 피용자가 “기술의 개량, 확장, 대체 또는 추가 발명에 의한 기술(이하 “개량기술”이라 한다)을 적용하거나, 이를 근거로 새로운 산업재산권을 취득하고자 할 경우 “을”은 사전에 “갑”에게 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 취득한 산업재산권은 쌍방의 공동소유로 한다. 특약이 없는 한, “개량기술”의 실시 역시 이 계약에 의하여 실시되는 것으로 보고 이 계약은 계속 유효하다.

제7조 (신의성실의 의무와 자료협조)

이 계약이 목적하는 바를 상호 충족시키기에 필요한 제반사항에 대하여 “갑”은 신의, 성실을 다하여 “을”에게 적극 협조하여야 하고, “을”은 이 계약을 성실히 이행하여야 한다. 또한 “갑”은 필요시 “을”에게 연구개발성과의 활용 등 필요한 자료를 요구할 수 있으며 “을”은 이에 응하여야 한다.

제8조 (비밀보장)

“을”은 “기술”이 타인에게 제공되거나 누설되지 않도록 보안에 유의하여야 하며 이 의무에는 “을”의 임원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사실상 위반됨이 없도록 하는 의무도 포함한다. 또한 본 조항은 이 계약이 해제 또는 해지 되었을 경우에도 계속 유효하다.

제9조 (계약의 변경 등)

① “을”의 생산능력이 제품수요를 충족하지 못하거나, “을”이 “기술”을 기술적으로 충분히 실현하지 못하고 이를 개선할 능력이 없다고 인정될 경우 이 계약의 내용은 “갑”과 “을”의 서면합의에 의하여 변경될 수 있다.

② “을”이 이 계약체결 후 법인의 주소 등 중요사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체없이 “갑”에게 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 “갑”의 착오는 “을”의 항변으로부터 면책된다.

제10조 (계약의 해지)

① “갑”과 “을”은 다음 각 호에 해당하는 경우 30일의 기한을 두고 “상대방”에게 그 이행을 서면으로 최고함으로써 이 계약을 취소할 권리를 가진다. 단, 이에 따라 계약이 해지되었을 경우 “갑”에 기인하지 않은 사유로 계약이 해지된 경우에는 “갑”은 기 지급 받은 금액을 환불하지 아니하며, “을”에 기인한 사유로 계약이 해지된 경우에는 “을”은 기술자료를 “갑”에게 반환하고 이 계약서 상의 모든 권리를 포기하여야 한다.

1. 계약일로부터 1년 이내에 기술을 실시하지 아니하는 경우.

2. “을”이 조업을 중단하여 더 이상의 기술 실시를 할 수 없다고 인정할 때.

3. 매년 2월말까지 전년 1월1일부터 12월31일까지의 기간 동안 발생한 제품판매액의 3%를 “갑”에게 지급하지 아니하는 경우

4. 기타 이 계약서 상의 의무를 위반할 때

② 이 계약이 해지 또는 해제되었을 경우, “을”은 지체없이 기술의 실시를 중단해야 하며, 제3자로 하여금 “기술”을 실시하도록 할 수도 없다.

제11조 (손해배상)

“갑”과 “을”은 이 계약을 위반하여 상대방에게 손해를 끼쳤을 때에는 상대방에게 이를 배상하여야 한다.

제12조 (권리양도의 제한)

“갑”과 “을”은 이 계약상 특약이 있는 경우를 제외하고 상호 상대방의 동

의 없이 본 계약의 이행과정에서 취득되는 제반 권리를 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다.

제13조 (해석 및 분쟁해결)

이 계약에 명기되지 아니하거나 이 계약서의 해석상 이의가 있을 때, 또 쌍방의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우 “갑”과 “을”은 이를 상호 협의하여 원만히 해결토록 노력하여야 한다. 이러한 분쟁이나 이견이 해결되지 않은 경우에는 「사단법인 대한상사중재원」의 상사중재 규칙에 의해 해결하기로 하고, 최종적으로는 대한민국 법률의 해석에 따른다.


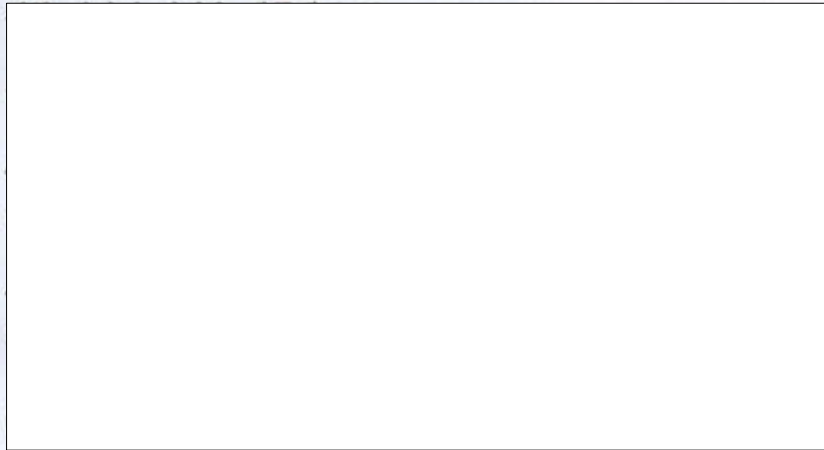
제14조 (계약의 효력)

이 계약의 효력은 쌍방이 서명 날인한 아래의 날부터 유효하다.

이 계약서는 3부를 작성하여 서명 날인하고, “갑”과 “을” 및 “기술이전책임자”가 각각 1부씩 보관한다.

2015년 01월 21일

“갑”

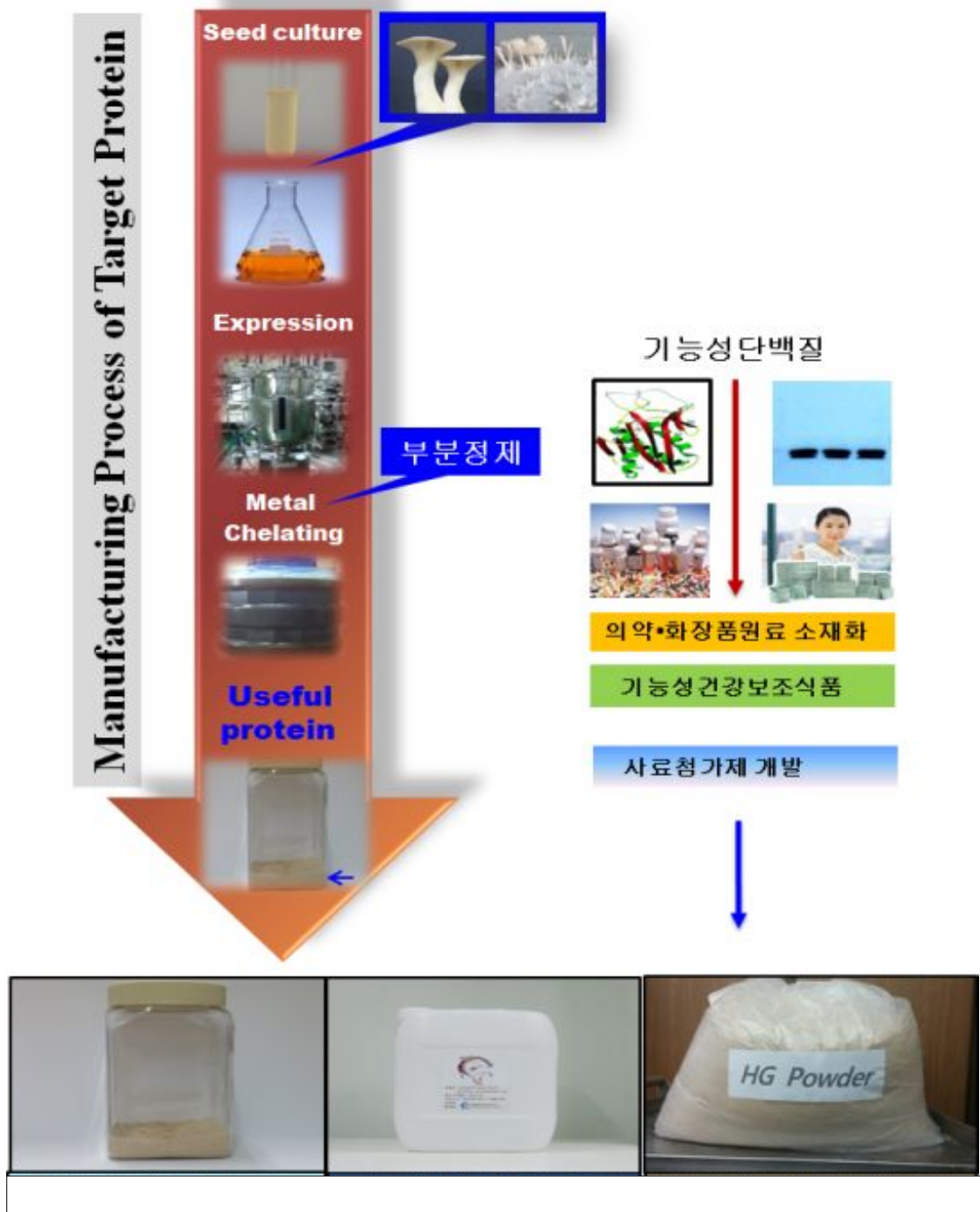
2. 기술이전에 의한 상품개발

: 시제품 및 상품 개발 예정

가. 시제품

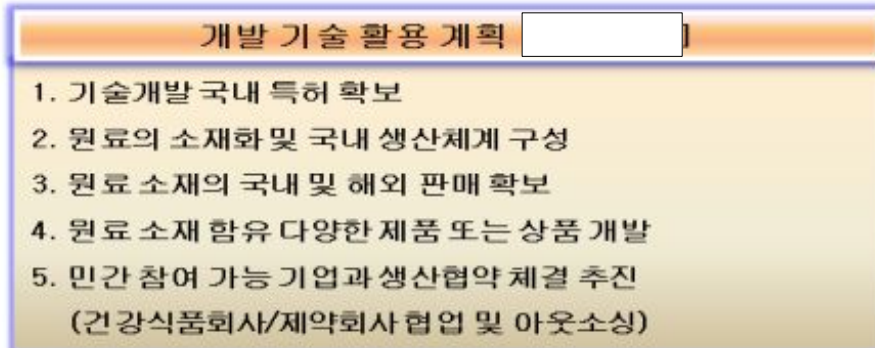
(1) 새송이버섯 균사체 (hGH) 대량생산에 균사체 확보

(2) 균사체 부분 정제에 의한 화장품 소재 (EGF, hGH), 사료첨가제 (고형분, 액상) 개발



3. 개발기술 활용계획 및 판매 전략

가. 개발기술 활용계획



나. 판매계획

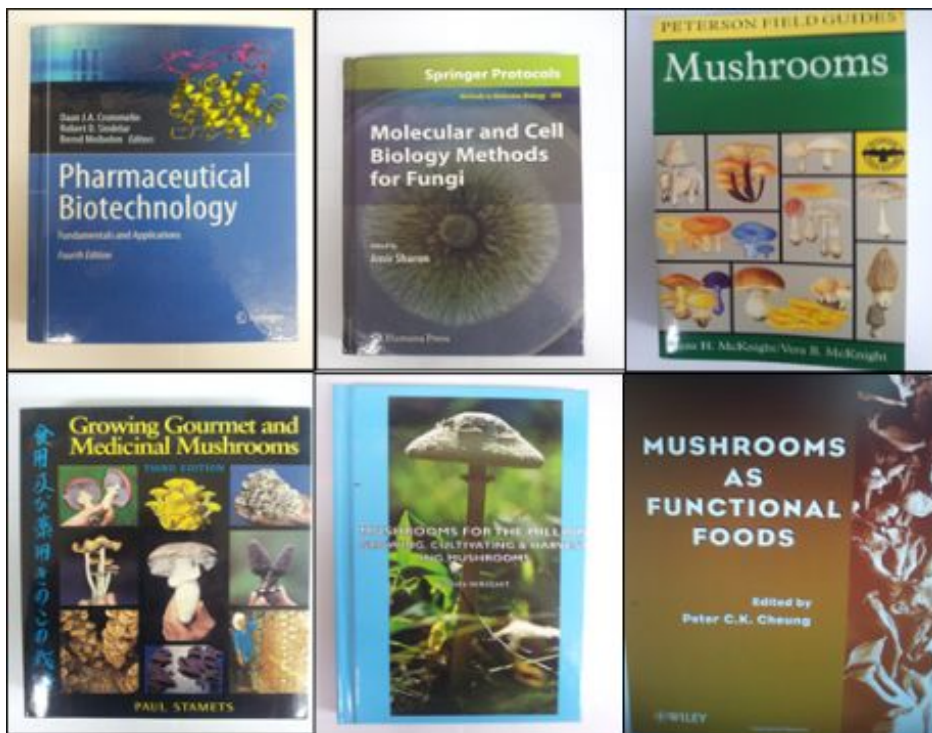


4. 타 연구 활용계획

본 연구에서 추진하는 “버섯 원기형성 관련 단백질 분비서열을 이용한 유용 단백질 생산 시스템 개발”에서는 바이오시밀러 시대에 맞추어 요구되는 유용 의학소재 단백질의 대량생산 시스템을 개발하여 버섯을 하나의 단백질 생산 플랜트화 하는 것이며, 원기내로 분비된 단백질을 간단한 회수과정을 통하여 수집하므로써 별다른 정제과정 없이 생물학적 활성을 갖는 단백질들을 의학 소재의 원료로 사용할 수 있도록 직접 제약 및 화장품회사에 공급이 가능하다는 특성을 가지고 있다. 따라서 버섯 원기로 단백질을 분비하는 신호서열에 관하여 좀 더 연구가 진행되어 완전한 분비시스템을 구축한다면, 유용단백질의 대량생산 및 생산비 절감에 의한 단백질 제품의 생산 cost 절감 및 부가가치의 상승을 꾀할 수 있을 것으로 사료되며, 바이오의약품의 경우 다른 방법의 생산 시스템에 의한 동등의약품의 효능을 검증하므로써 또 다른 특허를 창출할 수가 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Dann J. A. Crommelin, R. D. Sindler, and B. Meibohm. Pharmaceutical Biotechnology. Springer. 2013.
2. A. Sharon. Molecular and Cell Biology Methods for Fungi (Springer Protocols). Humana Press. 2010
3. K. H. McKnight and V. B. McKnight. Mushrooms (Peterson field guide series). Houghton Mifflin. 1987
4. P. Stamets. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten Speed Press. 1993
5. J. Wright. Mushrooms for the Million Growing, Cultivating & Harvesting Mushrooms. Read Country Books. 2005
6. Peter C. K. Cheung. Mushrooms as Functional Foods. Wiley. 2009



제 7 장 연구시설 장비 현황

“해당사항 없음”

제 8 장 참고문헌

- [1] Ahn, M. S., H. J. Kim, and M. S. Seo (2006). Physicochemical Characteristics of Ethanol Extracts from Each Part of the *Pleurotus eryngii*. *J. Kor. Soc. Food Cult.* 21: 297-302.
- [2] Bae, H. S., Kim, D. H, and U. K. Choi (2011). Proteomic Characteristics of Calcium Enriched King Oyster Mushroom. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 43: 12-16.
- [3] Becker, E. M., L. R. Nissen, and L. H. Skibsted (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* 219: 561-571.
- [4] Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 - 254.
- [5] Bundock, P., A. den Dulk-Ras, A. Beijersbergen, and P. J. J. Hooykass (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Mol. Biol. Organ.* 14: 3206-3214.
- [6] Burns, C., K. E. Gregory, M. Kirby, M. K. Cheung, M. Riquelme, T. J. Elliott, M. P. Challen, A. Bailey, and G. D. Foster (2005). Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genet Biol.* 42: 191-199.
- [7] Buyssee, J. and R. Merckx (1993). An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *J. Exp. Bot.* 44: 1627-1629.
- [8] Chatterjee, S., S. Chatterjee, B. P. Chatterjee, and A. K. Guha (2009). Influence of plant growth hormones on the growth of *Mucor rouxii* and chitosan production. *Microbiol. Res.* 164: 347-351.
- [9] Chen, H., Nelson, R. S. and Sherwood, J. L (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques.* 16: 664-668.
- [10] Cheng, S., P. Yang, L. Guo, J. Lin, and N. Lou (2009). Expression of multi-functional cellulase gene *mfc* in *Coprinus cinereus* under control of different basidiomycete promoters.

Bioresource Technology. 100: 4475-4480.

[11] Cho, H. S., H. J. Lee, S. J. Lee, J. H. Shin, H. U. Lee, and N. J. Sung (2008). Antioxidative Effects of *Pleurotus eryngii* and Its By-products. *J. Life Sci.* 18: 1360-1368.

[12] Choi, J. H., S. Kim, K. Sapkota, S. E. Park, and S. J. Kim (2011). Expression and production of therapeutic recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pleurotus eryngii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 611-623.

[13] Choi, J. W., D. I. Shin, and H. S. Park (2012). Enhancement of growth and bioactivity of *pleurotus eryngii* mycelia by spent coffee ground. *J. Agric. Life Sci.* 46: 157-163.

[14] Chung, S. J., S. Kim, K. Sapkota, B. S. Choi, C. Shin, and S. J. Kim (2011). Expression of recombinant human interleukin-32 in *Pleurotus eryngii*. *Ann. Microbiol.* 61: 331-338.

[15] Collins, C. M., M. N. Heneghan, S. Kilaru, A. M. Bailey, and G. D. Foster (2010). Improvement of the *Coprinopsis cinerea* molecular toolkit using new construct design and additional marker genes. *J. Microbiol Methods.* 82: 156-162.

[16] Eurwilaichitr, L., P. Manitchotpisit, C. Chutrakul, and S. Panyim (2000). The production of secreted growth hormone using *Saccharomyces cerevisiae*. *Asia Pacific J. of Mol. Biol. and Biotechnol.* 8: 123 - 129.

[17] Franca, A. S., L. S. Oliveira, and M. E. Ferreira (2009). Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. *Desalination.* 249: 267-272.

[18] Frick, F., M. Bohlooly-Y, D. Linden, B. Olsson, J. Tornell, S. Eden, and J. Oscarsson (2001). Long-term growth hormone excess induces marked alterations in lipoprotein metabolism in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281: E1230 - E1239.

[19] Friedewald, W. T., R. I. Levy, and D. S. Fredrickson (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18(6): 499-502.

[20] Gooday, G. W (1994). Hormones in mycelia fungi. *Growth, Differentiation and Sexuality The*

Mycota. 1: 401-411.

[21] Gray, G., G. Selzer, G. Buell, P. Shaw, S. Escanez, S. Hofer, P. Voegeli, and C. J. Thompson (1984). Synthesis of bovine growth hormone by *Streptomyces lividans*. *Gene*. 32(1-2): 21-30.

[22] Gregory, T. R., Nicol, J. A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I. J., Murray, B. G., Kapraun, D. F., Greilhuber, J. and Bennett, M. D (2007). Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Res.* D332 - D338.

[23] Guillen, F., C. Munoz, V. Gomez-Toribio, A. T. Martinez, and M. J. Martinez (2000). Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase of *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 170-175.

[24] Hatano, T., H. Kagawa, T. Yasuhara, and T. Okuda (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 1090- 1097.

[25] Hecimovic, I., A. Belscak-Cvitanovic, D. Horzic, and D. Komes (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem.* 129: 991 - 1000.

[26] Ho, M. W., A. Ryan, and J. Cummins (1999). Cauliflower mosaic virus promoter - a recipe for disaster. *Microb. Ecol. Health Dis.* 10: 33-59.

[27] Holster, M., D. de Waele, A. Depicker, E. Messens, M. van Montagu, and J. Schell (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163: 181-187.

[28] Hooykaas, P. J. J., F. G. M. Snijdewindt, and R. A. Schilperoort (1982). Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain1001 and its transfer to and expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid.* 8: 73-82.

[29] Hui, Y. F., E. S. Den, and T. H. Chi (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *J. Food Lipids.* 9: 35-46.

[30] Hwang , Y. J., H. K. Nam, M. J. Chang, G. W. Noh, and S. H. Kim (2003). Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer

cell lines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 217-222.

[31] Jeong, E. J (2011). Establishment of Mass Culture Process and Isolation of Phytoestrogenic Components from *Pleurotus eryngii*. *Kyungpook national Univ.*

[32] Kang, H. I., J. Y. Kim, K. D. Moon, K. I. Seoi, S. Y. Cho, S. D. Lee, and S. T. Yee (2004). Effect of crude polysaccharide of Saesongi on the activation of immune cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 1092 - 1097.

[33] Kang, K. S., I. D. Kim, R. H. Kwon, J. Y. Lee, J. S. Kang, and B. J. Ha (2008). The effects of fucoidan extracts on CCl4-induced liver injury. *Arch Pharm. Res.* 31: 622 - 627.

[34] Kang, M. S., T. S. Kang, A. S. Kang, H. R. Shon, and J. M. Sung (2000). Studies on mycelial growth and artificial cultivation of *Pleurotus eryngii*. *Kor. J. Mycol.* 28: 73-80.

[35] Kang, T. S., H. S. Jeong, M. Y. Lee, H. J. Park, T. S. Jo, S. T. Ji, and M. K. Shin (2003). Mycelial growth using the natural product and angiotensin converting enzyme inhibition activity of *Pleurotus eryngii*. *Kor. J. Mycol.* 31: 175-180.

[36] Kang, T. S., M. S. Kang, and S. Y. Lee (2001). Effect of *Pleurotus eryngii* on the blood glucose and cholesterol in diabetic rats. *Kor. J. Mycol.* 29: 86-90.

[37] Kim, D. H., H. J. Choi, W. S. Jo, and K. D. Moon (2012). Quality Characteristics of *Pleurotus eryngii* Cultivated with Different Wavelength of LED Lights. *Kor. J. Food Preserv.* 19: 354-360.

[38] Kim, D. H., H. J. Choi, W. S. Jo, and K. D. Moon (2012). Food Functional Properties of *Pleurotus eryngii* Cultivated with Different Wavelength of LED Lights. *Kor. J. Food Preserv.* 19: 645-651.

[39] Kim, M. U., O. J. Kwon, H. S. Woo, and Y. J. Cho (2007). Culture Condition for Biomass of *Pleurotus eryngii*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 1-5.

[40] Kim, S. A., and M. S. Ko (2007). Sensory and Physicochemical Characteristics of Jeungpyun with *Pleurotus eryngii* Powder. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 39: 194-199.

- [41] Kim, Y. J., I. K. Jung, and E. J. Kwak (2010). Quality Characteristics and Antioxidant Activities of Cookies Added with *Pleurotus eryngii* Powder. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 42: 183-189.
- [42] Ko, J. B., and C. U. Lee (2005). Effects of *Pleurotus eryngii* on Lipid Metabolism in Rats Fed High Fat Diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 626-631.
- [43] Korpál-Szczyrska M and A. Balcerska (2008). The effect of growth hormone treatment on serum bone alkaline phosphatase in growth hormone deficient children. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* 14(4): 211-214.
- [44] Kuo, C. Y., and C. T. Huang (2008). A reliable transformation method and heterologous expression of β -glucuronidase in *Lentinula edodes*. *J. Microbiol Methods.* 72: 111-115.
- [45] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- [46] Lee, J. Y., K. A. Lee, and E. J. Kwak (2009). Fermentation Characteristics of Bread added with *Pleurotus eryngii* Powder. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 757-765.
- [47] Li, C. H. and L. Ash (1953). The nitrogen terminal end-groups of hypophyseal growth hormone. *J. Biol. Chem.* 203: 419-424.
- [48] Lin, J., M. Zheng, J. Wang, W. Shu, and L. Guo (2008). Efficient transformation and expression of gfp gene in the edible mushroom *Pleurotus nebrodensis*. *Progress in Natural Science.* 18: 819-824.
- [49] Liu, X., B. Zhou, R. Lin, L. Jia, P. Deng, K. Fan, G. Wang, L. Wang, and J. Zhang (2010). Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus sp.* mycelium. *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 116-119.
- [50] Machado, E. M. S., R. M. Rodriguez-Jasso, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto (2012). Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochem. Eng. J.* 60: 87-90.
- [51] Machado, M. O., R. D. Hirata, D. F. Sellitti, R. Iotti, A. Iotti, A. M. Cusumano, G. P. Riordan, K. T. Coschigano, J. J. Kopchick, I. Zuhl, N. Nguyen, M. H. Hirata, and S. Q. Doi

(2005). Growth hormone promotes glomerular lipid accumulation in bGH mice. *Kidney Int. Nov.* 68(5): 2019-2028.

[52] Maehara, T., S. Tomita, K. Takabatake, and S. Kaneko (2010). Improvement of the Transformation Efficiency of *Flammulina velutipes* Fv-1 Using the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene Promoter. *Bioscience Biotechnol Biochem.* 74: 2523-2525.

[53] Mayo, K. E., T. Miller, V. DeAlmeida, P. Godfrey, J. Zheng, and S. R. Cunha (2000). Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Prog. Horm. Res.* 55: 237-266.

[54] Michielse, C. B., K. Salim, P. Ragas, A. F. Ram, B. Kudla, B. Jarry, P. J. Punt, and C. A. van den Hondel (2004). Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium-mediated* DNA transfer. *Mol. Genet. Genomics.* 271: 499-510.

[55] Minamisawa, M., S. Yoshida, and N. Takai (2004). Determination of biologically active substances in roasted coffees using a diode-array HPLC system. *Anal. Sci.* 20: 325-328.

[56] Mukhopadhyay, R., S. Chatterjee, B. P. Chatterjee, and A. K. Guha (2005). Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. *Proc. Biochem.* 40: 1241-1244.

[57] Murashige, T. and Skoog, F. A (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.

[58] Nebesny, E. and Budryn, G (2003). Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 217: 157 - 63.

[59] Niseteo, T., D. Komes, A. Belsak-Cvitanovic, D. Horzic, and M. Budec (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chem.* 134: 1870- 877.

[60] Nkondjock, A., P. Ghadirian, J. Kotsopoulos, J. Lubinski, H. Lynch, C. Kim-Sing, and D. Horsman, B. Rosen, C. Isaacs, B. Weber, W. Foulkes, P. Ainsworth, N. Tung,

- A. Eisen, E. Friedman, C. Eng, P. Sun, and S. A. Narod (2006). Coffee consumption and breast cancer risk among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int. J. Cancer*. 118: 103-107.
- [61] Noh, W., S. W. Kim, D. W. Bae, J. Y. Kim, and H. S. Ro (2010). Genetic Introduction of Foreign Genes to *Pleurotus eryngii* by Restriction Enzyme-Mediated Integration. *J. Microbiol.* 48: 253-256.
- [62] Oh, K. H., B. Y. Cheon, S. H. Cho, H. Q. Truong, S. H. Ok, J. U. Jeung, J. W. Choi, and J. S. Shin (2003). Expression of the bovine growth hormone alters the root morphology in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res.* 12: 363-367.
- [63] Okamoto, T., M. Yamada, S. Sekiya, T. Okuhara, G. Taguchi, S. Inatomi and M. Shimosaka (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of the Vegetative Dikaryotic Mycelium of the Cultivated Mushroom *Flammulina velutipes*. *Bioscience Biotechnol Biochem.* 74: 2327-2329.
- [64] Palacios, I., C. Moro, M. Lozano, M. D'Arrigo, E. Gullamon, A. García-Lafuente, and A. Villares (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chem.* 128: 674-678.
- [65] Palmiter, R. D., R. L. Brinster, and R. M. Evans (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs micro injected with metallothionein-growth hormone fusion gene. *Nature*. 300: 611-615.
- [66] Papagianni, M (2004). Fungal morphology and metabolite production. *Biotechnol. Adv.* 22: 189-259.
- [67] Pinchas, C., D. M. Peehl, G. Lamson, and R. G. Rosenfeld (1991). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73(2): 401-407.
- [68] Punt, P. J., N. van Biezen, A. Conesa, A. Albers, J. Mangnus, and C. van den Hondel (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnol.* 5: 200-206.
- [69] Reikangalt, D., M. C. Verner, U. Kues, P. J. Walser, R. Marmeisse, J. C. Debaud, and L. F.

Tachet (2007). Green fluorescent protein expression in the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbial Lett.* 268: 67-72.

[70] Ridha, H., O. Rekik, S. Hachicha, M. Ferchichi, S. Woodward, N. M. J. Cegarra, and T. Mechichi (2012). Co-composting of spent coffee ground with olive mill wastewater sludge and poultry manure and effect of *Trametes versicolor* inoculation on the compost maturity. *Chemosphere.* 88: 677-682.

[71] Rodriguez Estrada, A. E. and D. J. Royse (2007). Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hull/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. *Bioresource Technol.* 98: 1898-1906.

[72] Rodriguez, E., F. J. Ruiz-Duenas, R. Kooistra, A. Ram, A. T. Martinez, and M. J. Martinez (2008). Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. *J. Biotechnol.* 134: 9-19.

[73] Saenger, M., E. Hartge, J. Werther, T. Ogada, and Z. Siagi (2001). Combustion of coffee husks. *Renew. Energ.* 23: 103-121.

[74] Sato, T., K. Okawa, and T. Hirano (2011). Construction of novel vectors for transformation of *Lentinula edodes* using a chitin synthase gene promoter. *J. Biosci Bioeng.* 111: 117-120.

[75] Silva, M. A., S. A. Nebra, M. J. Machado, and C. G. Sanchez (1998). The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass Bioenerg.* 14: 457-467.

[76] Simoes, J., P. Madureira, F. M. Nunes, M. R. Domingues, M. Vilanova, and M. A. Coimbra (2009). Immunostimulatory properties of coffee mannans. *Mol. Nut. Food Res.* 53: 1036-1043.

[77] Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth Enz.* 299: 152-178.

[78] Sung, W. S. and D. G. Lee (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure Appl. Chem.* 82: 219-226.

- [79] Tobiume, H., S. Kanzaki, S. Hida, T. Ono, T. Moriwake, S. Yamauchi, H. Tanaka, Y. Seino (1997). Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(7): 2056-2061.
- [80] Tokimoto, T., N. Kawasaki, T. Nakamura, J. Akutagawa, and S. Tanada (2005). Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *J. Colloid Interf. Sci.* 281: 56-61.
- [81] Vennat, B., D. Gross, and H. Pourrat (1992). Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharm. Acta. Helv.* 67: 11-14.
- [82] Vignoli, J. A., D. G. Bassoli, and M. T. Benassi (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.* 124: 863-868.
- [83] Wang, H. and T. B. Ng (2004). Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides.* 25: 1-5.
- [84] Wang, J., L. Guo, K. Zhang, Q. Wu, and J. Lin (2008). Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Volvariella volvacea*. *Bioresource Technology.* 99: 8524-8527.
- [85] Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequencing of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene.* 33: 103-119.
- [86] Yıldız, S., U. C. Yıldız, E. D. Gezer, and A. Temiz (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Proc. Biochem.* 38: 301-306.
- [87] Yoon, D. Y., K. M. Park, and J. H. Lee (2010). Characteristics and Biological Properties of *Pleurotus eryngii* grown on Monosodium Glutamate-enriched Media. *Kor. Soc. Biotechnol Bioeng.* 25: 277-282.

[88] Zadrazil, F (1974). Mushroom Science IX (Part I). *Proceedings of the 9th International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi. Tokyo.* 621-652.

[89] Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science.* 244, 48-52.

주 의

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