

발간등록번호

11-1543000-002104-01

첨단생산기술개발사업
R & D
R e p o r t

분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증 최종보고서

2018. 02. 28

주관연구기관 / 주식회사엔비엠
협동연구기관 / 전북LED융합기술센터
전북대학교산학협력단
순천대학교산학협력단
한국생명공학연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증” (개발기간 : 2012. 11. 26. ~ 2017. 11. 25.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 02. 28.

주관연구기관명: (주)엔비엠

협동연구기관명: 전북대학교 산학협력단

협동연구기관명: 순천대학교 산학협력단

협동연구기관명: 한국생명공학연구원

(대표자) 권태호 (인)

(대표자) 이철로 (인)

(대표자) 김용곤 (인)

(대표자) 장규태 (인)

주관연구책임자 : 권 태 호 (주식회사 엔비엠)

협동기관책임자 : 김 선 기 (전북대학교)

협동기관책임자 : 양 문 식 (전북대학교)

협동기관책임자 : 박 기 영 (순천대학교)

협동기관책임자 : 김 현 순 (한국생명공학연구원)



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	312037-5	해 당 단 계 연 구 기 간	2012.11.26.- 2017.11.25	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	첨단생산기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부과제명	분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증			
연구책임자	권 태 호	해당단계 참 여 연구원 수	총: 149명 내부: 120명 외부: 29명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:2,500,000천원 민간:400,000천원 계:2,900,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 149명 내부: 120명 외부: 29명	총 연구개발비	정부:2,500,000천원 민간:400,000천원 계:2,900,000천원
연구기관명 및 소속부서명	주관기관 : (주)엔비엠 참여기관 : 전북LED융합기술센터 전북대학교 순천대학교 한국생명공학연구원			참여기업명 (주)엔비엠	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수 413	

국문 요약문

	코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>○ 본 과제는 지금까지 국내에 확보되어 있는 유용단백질 고생산 GM작물을 선정하여 실험실 수준에서의 생산성 검증이 아닌 산업화 규모로 대량 재배, 수확, 분리정제, 생화학적 특성 규명, QC 및 유통을 위한 포장과 저장성 확인에 이르는 전 생산 과정에 적용 할 최적의 SOP를 확립하여 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증을 통하여 구내의 분자농업 산업화 달성을 목표로 함.</p>				
연구개발성과	<p>○ 분자농업 산업화에 필요한 대용량 식물세포 배양시설 및 배양기의 구축, 대용량 단백질 분리정제 시설을 구축하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배양실 면적: 62평 - 배양기 용량: 80L 배양기 140기 - 생산규모: 11 ton/batch - 단백질 정제 능력: 100g/batch <p>○ 본 연구에서 유용단백질 생산 세포주가 구축되기 전에 본 연구 주관기관인 (주)엔비엠이 기 개발하여 확보한 Enterokinase, hGM-CSF의 생산 세포주를 이용하여 시제품을 생산하고, 이에 대한 효능을 확인한 후 제품을 출시하여 산업화를 완성하였음</p> <p>○ 본 연구개발을 통하여 FimA mAb, human Insulin, hG-CSF, TEV endopeptidase, CCP mAb, PNGase A, human Activin A 등 7종의 유용단백질 생산 식물세포주를 개발하였음</p> <p>○ 상기의 신규 단백질 중에서 FimA 항체는 전임상을 위한 유효성 평가방법을 확립하였음</p> <p>○ 상기의 신규 단백질 중에서 hG-CSF, TEV endopeptidase는 고순도의 시제품을 생산하고 이에 대한 효능을 확인한 후 제품을 출시하여 산업화를 완성하였음</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>○ 본 연구개발을 통하여 국내 시장에 출시한 제품의 판매 확대를 위하여 글로벌 판매회사인 Sigma사 등을 통한 세계시장 진입을 추진할 예정</p> <p>○ 본 연구개발을 통하여 개발된 유용단백질 생산 세포주를 활용하여 산업화가 기대됨</p> <p>○ 본 연구에서 얻어진 대부분의 기술들은 식물에서 단백질을 생산하고자 할 때 필요한 원천 기술들이므로 이 기술을 활용하여 다양한 고부가가치 유용단백질의 산업화에 활용할 예정임</p>				
중심어 (5개 이내)	분자농업,	바이오시밀러,	밀폐형 식물공장	의료용단백질	산업용 단백질

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Purpose of the project is achieving industrialization of molecular farming by setting a model with real experiment by selecting useful protein with highly productive GM plant from inland. Performing total production processes with optimal SOP from mass cultivate, harvest, separate purification, investigation of biochemistic characteristics, QC, package and storage as the size of industrial volume rather than experimental level 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Massive volume plant cell cultivation system, building of cultivator, and massive protein separation purification line for industrialization of molecular farming being accomplished. <ul style="list-style-type: none"> - Area of cultivation room: 204.6m² - Bioreactor Volume: 80L/reactor, Number of bioreactor: 140 - Productivity: 11 ton/batch - Capacity of protein purification: recombinant protein 100g/batch ○ In this research, Enterokinase and hGM-CSF producing cell lines were used before setting up the useful protein production system to produce commercial product. Industrialization being achieved after the testing the effectiveness of the product. ○ Through the project, 7 different cell lines were developed such as FimA mAb, human Insulin, hG-CSF, TEV endopeptidase, CCP mAb, PNGase A, human Activin A ○ Among the mentioned new proteins, Antibody of FimA, the effective evaluation method for preclinical study has been established. ○ Among the mentioned new proteins, hG-CSF and TEV endopeptidase, high purity commercialized item were produced and industrialization was achieved through evaluation of effective of the final products. 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Through this project, expectation of entering global market with partnership with Sigma to enlarging the volume of selling of inland product. ○ Industrialization is expected with applying the useful protein production cell line through this research project. ○ Most of the technologies quired in this project are source technologies for producing proteins from plants. Application of the technologies to various high valued useful proteins will contribute into industrialization. 					
Keywords	Molecular farming	Biosimilar	Closed type plant-factory	pharmaceutical proteins	Industrial proteins	

CONTENTS

1. Summary of the project	1
2. Condition of technology development	17
3. Content and result of research	35
4. Achievement and dedication to relative area	371
5. Application of the research	384
6. Collected scientific information	390
7. Safety degree of development	395
8. Condition of facility·device registered at national science and technology information system	396
9. Performance of safety action of laboratory during research	397
10. Representative research results	400
11. Others	401
12. References	402

<enclosed> self evaluation opinion

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	17
3. 연구수행 내용 및 결과	35
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	371
5. 연구결과의 활용계획 등	384
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	390
7. 연구개발성과의 보안등급	395
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	396
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	397
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	400
11. 기타사항	401
12. 참고문헌	402

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발 과제의 개요

코드번호

D-03

1-1. 연구개발의 필요성 및 목적

1. 연구개발의 목표

- 본 과제는 지금까지 국내에 확보되어 있는 유용단백질 고생산 GM작물을 선정하여 실현 실 수준에서의 생산성 검증이 아닌 산업화 규모로 대량 재배, 수확, 분리정제, 생화학적 특성 규명, QC 및 유통을 위한 포장과 저장성 확인에 이르는 전 생산 과정에 적용 할 최적의 SOP를 확립하여 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증을 통하여 국내의 분자농업 산업화 달성을 목표로 함.
- 상기 최종 목표달성을 위하여 다음과 같은 세부 목표를 정하고 연구추진 계획에 따라서 수행 할 예정임
 - 국내에서 개발한 유용단백질 생산 GM작물의 산업화를 위한 기반구축 및 실증
 - 분자농업 산업화를 위한 테스트 베드 확보
 - 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 산업화를 위한 SOP3종 이상 확립
 - 식물유래 단백질 산업화 완성 및 전임상(비임상) 중 단기 반복독성시험 완료(산업용 단백질 최소 1종과 의약품단백질 최소 1종 포함 총 3종 이상)

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 중요성 및 필요성

(1) 기술적 측면

단백질 의약품(바이오시밀러, 바이오 베타) 분야

○ 생물산업은 정보산업과 더불어 21세기 지식기반사회의 양대 축을 형성하며 빠르게 성장하는 대표적 산업군으로서 의약, 환경, 농업, 식품 등에서 고부가가치 제품들을 양산해 내고 있다. 생물산업의 여러 제품들 중에서 단백질제품은 총 생물산업 규모의 약 60% 정도를 차지하고 있어 생물산업 발전의 핵심 또는 견인차 역할을 하고 있으며, 향후 단백질제품이 차지하는 비율은 더욱 증가할 것으로 추산되고 있음

○ 관련 과학기술의 발전으로 인간을 포함한 각종 동식물, 미생물의 유전체 서열을 확인하면서 이와 더불어 의약품 및 산업용으로 유용한 새로운 단백질들의 발굴과 생산은

지속적으로 증가되어가고 있음. 특히 단백질 의약품 시장은 전 세계적으로 기하급수적 증가 추세에 있는데, 지난 20여 년간 interferon, insulin, EPO 등과 같은 세포조절 단백질 등을 포함하여 90여종의 생물약품이 개발, 판매되고 있으며, 현재 350개 이상의 새로운 제품이 임상 I~III 상 단계의 개발단계에 있음

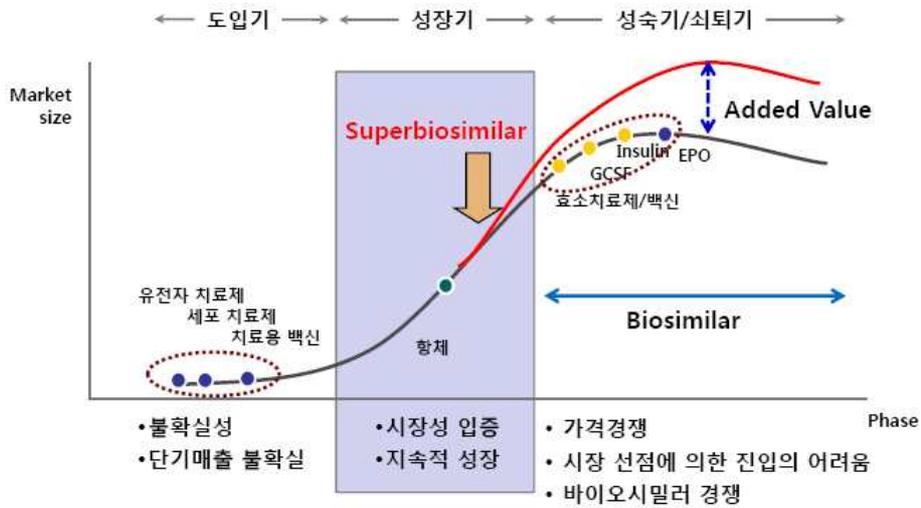
- 현재 전 세계적으로 10억불이상의 시장을 확보하고 있는 대표적 인체 단백질의약품으로서 EPO, 인슐린, G-CSF, 인체 성장호르몬, 인터페론, 인터류킨-2, 치료용 항체 등이 있음. 고부가가치 인체 단백질의약품들은 대장균, 효모, 곤충세포 및 CHO 세포 등 다양한 단백질 생산시스템을 이용하여 단백질 생산이 가능함. 최근에는 식물세포를 활용한 단백질의약품 생산이 활발하여지고 있으며, 이스라엘 Protalix사가 개발한 고서병 치료제가 화이자를 통하여 판매가 시작됨.
- 이러한 단백질 의약 제품들의 개발을 위해서는 계놈과제 등을 통한 새로운 단백질의 발굴뿐 아니라, 구조적 정보를 활용하여 신기능 단백질을 제조하는 단백질공학 기술개발 및 생체내에서 단백질의 기능을 활성화시키기 위한 단백질 가공(processing 및 modification) 또는 그와 관련된 효소의 개발 및 단백질 생산기술개발에도 많은 연구가 집중되고 있음
- 바이오시밀러(Biosimilar)란 유전자 재조합 또는 세포 배양 기술을 통해 생산되는 단백질이나 호르몬 등을 의미하는 바이오의약품의 복제 약품을 의미함. 오리지널 바이오의약품과 비교해 효능은 비슷하지만 가격이 싸기 때문에 경제성이 큰 의약품으로 인식되고 있으며, 현재 미국의 경우, 대통령인 버락 오바마(Barack Hussein Obama)의 '전 국민 대상 건강보험 공약'을 통해 바이오시밀러를 허용하기로 하고 이 분야의 특허 규정을 준비 중에 있는 등 기존 오리지널 바이오의약품에 대한 바이오시밀러의 대체 효과와 함께 제약업체와 바이오업체의 관심사로 급부상하고 있고, 우리나라도 국가 차원에서 미래 성장 동력 육성을 위한 적극적인 기술개발이 필요함.
- 단백질 의약품은 전 세계적으로 단일 히트제품 매출이 수조원에 이르는 매우 큰 시장임. 이런 제품의 특허 만료가 2012년부터 해마다 도래함에 따라 전 세계적으로 바이오시밀러 또는 바이오베타의 개발 경쟁이 가열되고 있음. 연 4조원대 이상의 시장을 형성한 바이오시밀러는 허셉틴을 비롯해 엔브렐·레미케이드(이상 관절염 치료제), 리툭산(비호지킨림프종 치료제), 아바스틴(대장암 치료제) 등이 있음.
- 바이오시밀러는 개발비용이 보통 오리지널 신약의 10분의 1, 개발 기간은 절반 수준임. 이에 비해 제품화 성공 확률은 신약에 비해 10배 이상 높아 글로벌 제약 업체들이 경쟁적으로 참여하고 있음.

< 주요 오리지널 바이오의약품 특허 만료 현황 >

제품명	성분명	제약사	주요 적응증	2008 판매 (백만\$)	특허만료 (미국)
Enbrel	etanercept	Amgen	류마티스 관절염	6,490	2012
Remicade	infliximab	J&J	류마티스 관절염	5,335	2018
Procrit/ Epogen	epoetin alfa	Amgen	빈혈	5,123	2012
Rituxan	rituximab	Genentech (Roche)	비호지킨 림프종	5,099	2015
Humira	adalimumab	Abbott	류마티스 관절염	4,521	2016
Avastin	bevacizuma	Genentech (Roche)	대장암	4,484	2017
Herceptin	trastuzumab	Genentech (Roche)	유방암	4,384	2014
Aranesp	darbepoetin alfa	Amgen	빈혈	3,344	2013
Neulasta	pegfilgrastim	Amgen	호구증 감소증	3,318	2015
Lantus	insulin glargine	Sanofi-Aventis	1형/2형/ 당뇨병	3,130	2015

자료(2008 판매량) : LaMerie Business Intelligence, Top 13 Biologics Classes 08,09.3.

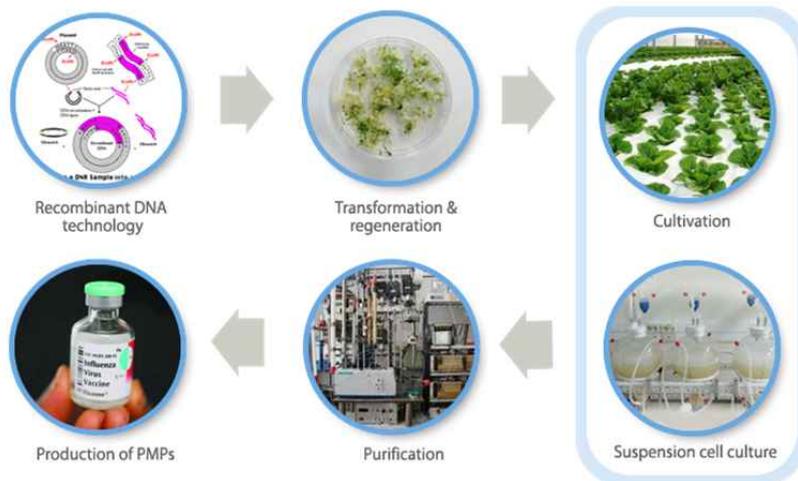
- 바이오베터는 이미 승인받은 생물학적 제품들과 유사해 보이지만, 효과, 부작용 등 하나 이상의 측면에서 더 뛰어난 면을 보이는데 활용된다. 바이오시밀러를 뛰어넘는 바이오베터의 장점은 비용부터 기본적인 구조에 이르기까지 다양함. 약물 반감기의 연장, 체내 응집율의 감소, 더 높은 효과, 순도의 증가, 부작용의 감소 등의 효과 역시 여기에 포함됨.
- 실질적인 측면에서 바이오베터가 가지고 있는 주요 혜택은 초기단계와 R&D에 드는 비용이 크지 않음. 비록 바이오시밀러가 저렴한 가격에 원본 약물과 유사한 효과를 보여준다는 점을 골자로 제시하고 있지만, 바이오베터는 일부 분자 또는 화학요소의 변형을 통해 기존 약물보다 효과를 높이고 부작용을 감소시킬 수 있음.
- 또 바이오시밀러의 경우 원본 약물의 구조적 이미테이션에 국한되지만, 바이오베터는 단백질 폴딩(folding) 메커니즘과 약물에의 영향에 대한 이해를 기반으로 향상될 수 있음.
- 현재 바이오베터에 대한 줄여진 규제 루트(abbreviated regulatory route)가 없는 상황에서 치료적, 상업적으로 성공을 보인 약물들의 행보를 따라가고 있고, 실패할 위험도는 대부분의 신약들보다 낮게 평가되고 있음.
- 상기와 같은 기술적 특성과 산업화의 최대 난관이었던 주요 단백질의약품에 대한 원천특허가 2015년을 기점으로 모두 만료되는 상황이므로 관련기술의 조기 확보는 국가의 기술경쟁력 확보차원에서 절실하게 필요함



< 바이오시밀러 관련 기술 및 산업 현황 >

□ 분자농업 분야

- 분자농업(plant molecular farming)이란 식물 생산수단으로 삼아 유전자조작을 통하여 의학적으로 유용한 고부가가치 단백질과 백신, 산업적 가치가 있는 효소 등의 재조합 단백질 및 이차대사산물을 대량생산하는 산업임(양문식, 2010).
- 과거 식물을 주로 식량 확보 차원에서 농업적으로 이용하기 위해 유전자를 조작한 작물을 제1세대 GM(genetically modified)작물이라고 한다면 정밀 화학제품 생산, 유용 단백질 생산 등의 고부가가치 산업적 응용, 주로 의학적 용도를 목적으로 개발된 작물의 제2세대 GM작물이라고 함.
- 분자농업은 식물생산 분야에서 유전자재조합 단백질 생산, 고부가가치 대사산물 획득 및 유용한 물질 등을 생산하려는 목적을 가짐.



< 분자농업 흐름도(www.nbms.co.kr) >

- 유전자 조작 기술과 식물형질전환 기술의 발달로 형질전환 식물체에서 외래 단백질 생산이 가능하게 되었으며 치료용 단백질인 human Insulin이 담배 식물체에서 발현(1983년도)되는 등 여러 식물체에서 형질전환기법이 확립되었으며 식물체를 유용단백질이나 효소를 생산하기위한 bioreactor로 이용하기 위한 연구들이 진행되고 있으며 현재 의료용으로 허가된 것은 secretory antibody vaccine 외 5종이며 현재 20여개 품목에 대하여 임상실험이 진행 중에 있으므로 2-3년 내에 식물유래 의료용 치료제의 출현이 기대됨. 특히 2011년 이스라엘 회사인 Protalix Biotherapeutics가 Gaucher병의 치료제인 gluconocerebrosidase에 대하여 미국 FDA의 판매승인을 받고 본격적인 판매에 들어갔다.
- 현재까지의 의료용 단백질 생산은 미생물 또는 동물세포 배양에 의존하여 왔으나 식물세포배양에 의한 생산기술이 확립되고 현재 hGM-CSF, CTLA4 등과 같은 일부 품목에서는 생산기술이 개발되어 현재 전임상 단계에 있으므로 향후 식물세포배양에 의한 재조합 단백질의 생산기술로서 주목받고 있음
- 일반적으로 대부분의 의료용 단백질은 post-translational modification에 의하여 활성이 좌우되는데, 미생물의 경우 이러한 modification system이 진핵세포와 다르기 때문에 생리활성을 지닌 단백질 생산이 불가능한 경우가 많으며, 이러한 경우에는 동물세포 배양에 의하여 단백질을 생산하여야 하나 동물세포 배양의 경우 동물바이러스 감염에 의하여 의료용 단백질이 감염될 우려가 있는 등의 문제가 해결되고 있지 않은 실정에서 보다 안전한 단백질 생산 시스템으로서 식물발현시스템이 주목을 받기 시작하고 있음
- 이러한 예를 통해서 식물세포에서 외래 단백질의 다량발현이 실현되면 고부가가치의 의료용 단백질, 동물 사료, 백신, edible plant vaccine, 산업용 단백질의 대량생산이 가능하며, 특히 식물세포를 이용하면 저비용으로 다양한 단백질의 생산이 가능하여 동물세포배양에 비하여는 약 1/30, 미생물 발효에 비하여 약 1/3의 비용이면 가능하다는 것이 검증됨
- 식물세포에서 가능성이 높다고 판단되는 단백질로는 다양한 병원체에 대한 백신용 단백질(경구백신), 의료용 단백질 및 산업용 단백질 등으로 판단이 됨
- 식물세포 배양을 통한 유용단백질 생산 기술은 신기술 분야에 속하며, 우리나라에서는 본 기술의 중요성을 다른 선진국과 비교하여 빨리 인식하여 세계적으로도 본 최신키술의 국내정책과 함께 식물세포배양을 이용한 단백질생산 기술에서 국제적인 경쟁력을 확보하고 있으므로 지금까지의 연구결과를 활용하여 재조합 단백질의 생산이 불가능한 기술을 확립함으로써 난발현성 단백질 생산 분야에서의 기술적 우위를 점할 수 있음
- 고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물개발관련 연구분야는 분자생물학, 유전체학, 유전학, 육종학, 단백질체학, 분리정제 및 생산공정 등의 다양한 분야의 전문지식이 요구되고 있으나 그동안 국내외적으로 관련 분야의 연구추진은 산발적으로 진행되어왔기

때문에 연구결과의 직접 산업화에의 적용이 어려운 실정임

- 위에서 언급한 다양한 가능성 등과 식물유래 단백질 및 vaccine의 생산에 대한 효용성에 대한 충분한 검증이 이루어지고 있으며, 최근에는 상업적으로 상품화 된 예가 보고되기 시작 하는 대량 생산을 위한 활발한 연구가 진행되고 있음
- 하지만 식물을 bioreactor로 이용하고자 하는 경우에 있어서 외래 단백질의 식물세포 내 발현수준이 매우 낮다는 어려움이 있으며, 따라서 이중단백질의 발현수준을 높일 수 있는 방법개발, 당단백질의 당수식의 인간화 등 몇 가지의 기술적 개발이 분자농업의 경제적 활용 측면에서 필수적임.
- 선진국에서는 다양한 벤처기업들이 활발히 연구 및 생산을 시도하고 있으며 이들 중에서 대표적인 벤처기업으로 Sembiosys(<http://www.goodmedia.com/equicom/sembisys/Index.aspx>.)와 Medicago(<http://www2.medicago.com>), Biolex사 (<http://www.biolex.com>) 및 Prodigene (<http://www.prodigene.com>) 등이 있음
- 현재 유럽에서 광범위하게 사용되고 있는 두 가지의 공인된 생물 의약품 제조 방법으로 동물세포배양 제조(Mammalian Cell Culture Manufacturing)와 미생물 발효(Microbial Fermentation)를 들 수 있음. 많은 생산량과 레이아웃 비용, 하류공정에서의 애로사항, 미생물 오염에 대한 높은 취약성, 긴 소요시간, 제한된 수용력 등, 기존의 생물 의약품 제조 공정에 동반되는 많은 문제점들로 인해 형질전환 동물 및 식물(Transgenic animals and plants) 활용과 같은 혁신적이고 비용 효율적인 생물 의약품 제조 대안의 요구가 강해지고 있음.
- 식물 분자농업 관련해 시행된 세계 전체 실험들 중 약 8%만이 유럽에서 시행됐으며, 세계 전체 식물 분자농업 특허권 중 약 19%를 유럽이 보유하고 있음. 하지만 기술 플랫폼과 억제 설비에 관한 공공부문 연구 활동은 미국 수준과 동등하며, 유럽연합 내에서 독일, 영국, 프랑스, 이탈리아, 스페인이 식물 분자농업 공공부문 연구를 선도하고 있는 것으로 파악되고 있음.
- 이 시장에 진출한 기업들을 살펴보면, 발현계와 작물 선택과 타당성 분석 시행 등을 포함한 특허 기술을 개발하는 기술 제공업체와 자체 PMP를 개발하여 상업화시키는 업체, 이 두 가지 타입으로 나눌 수 있으며, 다국적 기업인 Bayer와 BASF(독일)는 Icon Genetics(독일)과 CropDesign(벨기에)와 같은 신생업체들을 각각 인수하여 유럽 시장의 주요 업체로 자리매김을 하고 있음.
- 제조되는 단백질 의약품에 따라, 생산 공장 구축 및 장비 설치, 바이오 생산 승인을 위해서는 최소 3억 달러에서 최대 8억 5천만 달러의 자금이 필요하며, 완전한 운영을 하기까지는 4~5년의 시간이 소요됨. 하지만 식물 분자농업 기술을 활용하여 동일한 단백질 의약품을 생산 할 때에는 설비 구축을 위한 자본 비용을 최대 80%까지 감축시킬 수 있으며, 동물세포배양 제조 시스템과 미생물세포배양 시스템 비용과 비교하여 잠재적

생산비의 각각 10%까지 절약할 수 있음. 따라서, 식물 분자농업은 특히 자금부족을 겪고 있는 개발도상국들에게 혜택을 가져다 줄 수 있는 기술임.

- 선진국들은 분자농업관련 연구를 통하여 관련 유용 GMO를 다량 확보하고 있으며, 우리나라도 10여종의 GMO식물은 현재 산업화 직전 단계 까지 기술이 완성되어 있음. 그러나 GMO는 GMO관련 법령에 의하여 야외재배가 불가능하며, 이를 위해서는 환경영향평가 후 품종등록 등의 절차를 거쳐야 하나 현재 국내에는 품종등록이 된 GMO는 하나도 없는 실정임
- 국내에서는 농림부, 교육과학부, 지식경제부 등 유관 부처에서 2000년 초반부터 연구지원 사업을 수행한 결과 국내에 분자농업관련 특허가 334건이 출원 또는 등록되었으며, 이중 19건은 산업화가 가능한 수준임.
- 정부의 적극적인 투자로 인하여 매우 우수한 결과를 확보하였으나, 대부분의 경우 식물에서 생산한 단백질의 효능을 확인하는 수준에서 종료가 되어있는 상황이며, 이의 대량생산을 통한 산업화를 위하여서는 대량 재배, 분리정제 및 (임상)효능평가 등의 후속 연구가 진행되어야 함.
- GMO 식물의 경우 야외에서 재배를 하기 위하여서는 품종등록을 해야 하는데, 이를 위하여서는 환경위해성평가를 거쳐 품종등록을 신청하고 있음.
- 그러나 2011년 현재 GMO 작물에 대한 국내의 품종 등록건수는 전무한 실정이며, 분자농업용으로 개발된 작물의 경우 식량작물과는 달리 대단위 면적의 재배가 필요하지 않아 밀폐된 소규모면적(100평 내외)에서도 국내의 연간 필요량의 생산이 가능함.
- GMO관리 법령에는 안전성을 확인하기 전에는 밀폐된 공간에서만 재배 하도록 규정되어 있으므로 조속한 산업화를 위하여서는 밀폐된 식물공장에서 기존에 확보한 고부가가치 단백질을 생산 할 수 있는 우수한 분자농업 관련 GMO를 재배한다면 2년 이내에 산업화가 가능할 것으로 판단되므로 본과제의 수행이 절실하게 필요함.
- 또한 지금까지 연구실 수준에서 확인된 생산수율 등은 대량생산 할 경우 생산수율 등에서 큰 차이를 보일 수 있으므로 우리나라 분자농업 산업화를 위해서는 기 확보된 우수한 GMO 작물을 이용하여 재배에서 분리정제까지 산업적 스케일의 기술을 확보하는 것이 매우 절실하게 필요함
- 일본의 경우 일본의 경제 산업성의 지원으로 분자농업 관련 GMO 작물 전용 재배가 가능한 GMP수준의 밀폐형 식물공장을 건설하고 산업적 규모에서의 GMO작물 재배와 분리정제까지의 일관된 기술을 확보하였으며 현재 애완건 구내염 치료제를 세계 최초로 상용화 하고 있는 등 적극적인 투자가 이루어지고 있음. 분자농업의 산업화는 이제 시작단계이므로 일본과의 경쟁에서 우위를 점하기 위하여서는 국가차원에서의 기술개발이 절실하게 필요함
- 우리나라의 분자농업 관련 기술적 수준은 미국, 일본 등 과 비교하여 동등 또는 일부 우세로 판단되고 있으나 산업화 부분에서는 분자농업 관련 GMO식물을 재배할 방안이

없어 우수한 연구결과를 확보하고도 일본에 뒤처지고 있는 실정이므로 우리나라도 우수한 분자농업 관련 연구결과를 활용 할 수 있도록 분자농업 상용화 식물공장 운용기술 확립 및 산업화 기술의 확립이 시급하며 식물공장을 활용한 산업화의 기반을 구축한다면 분자농업 분야에서 세계적인 기술 우위를 확보 할 수 있음.

(2) 경제·산업적 측면

- 바이오베터는 바이오시밀러 중에서 새로운 기술을 적용하여 보다 우수하게 개량되어 최적화된 것으로, 오리지널 바이오신약으로부터 출발되는 점은 바이오시밀러와 같으나, 오리지널에 비하여 우수한 품질을 요구하지 않는 바이오시밀러와는 달리 새로운 기술을 적용하여 오리지널 바이오의약품에 비하여 개량된 품질이나 약효를 나타낼 수 있는 개량신약을 말하며, 슈퍼바이오시밀러를 포함하는 개념임.

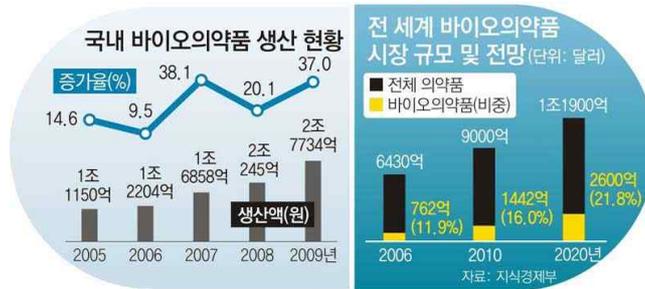


< 바이오의약품 시장 변화추이 >

- 통상적으로 제네릭의약품이 시장에 진입함으로써, 오리지널과 가격경쟁이 이루어짐과 동시에 시장 규모가 증가되는 현상이 나타남. 그러나 오리지널의 물질특허가 만료되어 최초의 제네릭의약품이 나타났을 경우 의약품의 가격이 평균 25%정도 인하되고, 다수의 제네릭의약품이 시장에 진입하면, 가격이 80%까지 인하되는 현상이 나타나게 되어, 개별적인 제네릭의약품이 차지하는 시장비율은 점점 작아지는 특징이 있음. 그러나 바이오시밀러의 경우는 ①엄격한 바이오시밀러 가이드라인, ②기술 진입장벽, ③자금 진입장벽 및 글로벌 제약사에 의하여 구축된 시장구조 등이 바이오시밀러 진입장벽으로 작용하고 있어, 제네릭 의약품보다는 시장 확대 속도가 느릴 것으로 예상됨.
- 바이오시밀러의 잠재력은 오리지널 바이오의약품의 엄청난 시장성에서 파생됨. 2006년 현재 세계 바이오의약품 시장은 707억5000만달러에 달하며 2012년이면 1088억달러에 이를 전망이다. 시장성장률은 전통 의약품의 두 배에 달하고 있음.
- 요즘 제약업계의 화두는 바이오시밀러(Biosimilars · 바이오복제약)일 정도임. 불과 1~2년 전만 해도 알아듣는 사람이 거의 없었던 이 전문용어는 영세한 한국 제약 산업을 한 단계 도약시킬 '출구' 내지는 '노다지'로 평가되고 있음. 한국 최고기업 삼성전자까지

'신수종사업'으로 바이오시밀러의 잠재력에 주목하고 5000억원 투자를 결정했음.

- 바이오시밀러는 개발비용이 보통 오리지널 신약의 10분의 1, 개발 기간은 절반 수준으로 알려져 있음. 이에 비해 제품화 성공 확률은 신약에 비해 10배 이상 높아 글로벌 제약 업체들이 앞 다퉈 뛰어들고 있음.
- 또한, 대형 바이오의약품들이 2012년 이후 대부분 특허 만료에 들어간다는 사실 또한 바이오시밀러 시장을 형성하게 만드는 주요한 배경이 되고 있음. 식약청에 따르면 2012년 류마티스관절염 치료제 '엔브렐'을 시작으로 시장규모 10억달러 이상 바이오의약품 중 향후 10년 이내 특허가 만료되는 의약품만 10종류, 시장 규모로는 320억달러에 달하고 있음. 2015년까지 바이오시밀러 시장은 250억달러에 이를 것으로 예상하고 있음.
- 바이오의약품 시장은 무섭게 성장하고 있음. 2006년 전 세계 의약품시장 규모 6430억 달러(약 723조 원) 중 바이오의약품은 762억 달러로 11.9%를 차지했으며, 그 비중은 2010년 9000억 달러 가운데 16.0%(1442억 달러)로 높아졌고 2020년에는 21.8%로 높아질 것으로 예상됨.
- 국내 바이오의약품 시장도 빠른 속도로 성장하고 있음. 2009년 기준 기존 제약업의 생산규모 증가율은 6.4%에 그쳤지만 바이오의약품은 37.0% 성장해 5배 이상의 성장속도를 보였음.



< 국내 바이오의약품 생산현황 >



* 자료 : 바이오의약품 생산사업 추진전략('07), 바이오산업수출전략심포지움

< 바이오신약과 바이오시밀러 개발 단계별 비교(예시) >

- 각국이 경쟁적으로 바이오배터에 집중하는 이유는 바이오배터가 구축된 메커니즘, 안전성, 효과를 타깃으로 하되 특허 보호로 새로운 분자 독립체의 판매에 대한 혜택을 얻을 수 있기 때문임. 또 바이오배터의 개발비용은 새로운 생물학적 제제의 개발비용과 비슷하지만 성공적으로 등록할 수 있는 확률이 상대적으로 높아 경제적 위험도가 낮고 투자회수율이 높은 것으로 전망되고 있다는 점도 매력으로 꼽고 있음.
- 상기와 같은 사업성이 높은 바이오시밀러 및 바이오배터의 제조되는 단백질 의약품에 따라, 생산 공장 구축 및 장비 설치, 바이오 생산 승인을 위해서는 최소 3억 달러에서 최대 8억 5천만 달러의 자금이 필요하나 식물 분자농업 기술을 활용하여 동일한 단백질 의약품을 생산 할 때에는 설비 구축을 위한 자본 비용을 최대 80%까지 감축시킬 수 있어서 식물 분자농업은 저예산으로도 단백질의약품을 생산 할 수 있는 획기적인 기술이므로 국가차원에서의 기술개발이 절실하게 필요함

(3) 사회 문화적 측면

- 최근 동물 질병 증가 추세로 인한 동물유래 질병 전파의 원천적 차단을 위해 기존 동물 이용 의약품 단백질의 생산체계를 식물로 대체하는 기술 혁신 필요함
- 동물유래 질병 감염 가능성이 없는 식물유래 의약품단백질 수요 급증에 따른 새로운 산업 영역에 대비한 복합적이고 다양한 기술 개발 필요
- 미생물이나 동물세포는 의약품 등의 생산과정에서 병원균 및 독성물질오염의 문제가 있는 반면, 식물을 이용한 생산시스템은 상대적으로 안전
- 미생물 및 동물에 기생하는 병원균은 사람에게도 전염되어 신종 전염병을 유발하지만 식물은 사람과 진화계통상 거리가 멀어 상대적으로 상당히 안전함
 - endotoxin을 생성하지 않아 인체 안전성이 높음

1-2. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

(1) 연구개발의 최종목표

연구과제의 최종 목표

- 본 과제는 지금까지 국내에 확보되어 있는 유용단백질 고생산 GM작물을 선정하여 실험실 수준에서의 생산성 검증이 아닌 산업화 규모로 대량 재배, 수확, 분리정제, 생화학적 특성 규명, QC 및 유통을 위한 포장과 저장성 확인에 이르는 전 생산 과정에 적용 할 최적의 SOP를 확립하여 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증을 통하여 국내의 분자농업 산업화 달성을 목표로 함.

- 상기 최종 목표달성을 위하여 다음과 같은 세부 목표를 정하고 연구추진 계획에 따라서 수행할 예정임
 - 국내에서 개발한 유용단백질 생산 GM작물의 산업화를 위한 기반구축 및 실증
 - 분자농업 산업화를 위한 테스트 베드 확보
 - 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 산업화를 위한 SOP3종 이상 확립
 - 식물유래 단백질 산업화 완성 및 전임상(비임상) 중 단기 반복독성시험 완료(산업용 단백질 최소 1종과 의약품단백질 최소 1종 포함 총 3종 이상)

(2) 연구과제의 주요 내용

- 유용 단백질 소재 생산이 가능한 GM작물(산업용 단백질 최소 1종과 의약품단백질 최소 1종 포함 3종 이상 생산 가능)에 대한 최적 재배방법 확립
- 유용단백질 대단위 고생산(mg/kg fresh weight)을 위한 발현시스템 확립
- 식물유래 단백질 추출, 분리, 정제 공정 구축: 재조합 단백질 100 mg/batch(순도 95% 이상)이상 규모의 정제시설 구축
- 식물 유래의 의약적, 산업적, 생리적(생화학적) 기능이 확인된 재조합 단백질의 대량생산 시스템 구축
- 식물유래 단백질의 효능 확인, 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발
- 식물유래 단백질 1종 이상 전임상(비임상) 중 단기반복독성시험 완료
- 고발현 시스템을 적용한 신규 1종 이상의 유용단백질 생산 GM작물 구축

(3) 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

- 제1 세부과제((주)엔비엠, 주관기관)
 - 과제명: 식물유래 유용단백질 분리 및 정제 공정 확립을 통한 산업기반 구축
 - 주요 연구개발 목표
 - 분자농업을 위한 GM 작물을 대상으로 산업화가 가능한 규모(100 mg/batch)의 공정 확립(추후 GMP 인증 신청 시 사용 가능한 성능 및 질적 수준의 장비로 구축)
 - 본 과제의 각 참여기관에서 확보한 유용단백질 고생산 GM작물 중 산업화 가능 수준의 생산성을 지닌 작물을 대상으로 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립
 - 식물유래 단백질에 대한 생화학적 특성 규명, QC 및 유통을 위한 포장과 저장성 확인을 통한 사업화 완성
 - 주요 연구내용
 - 산업화가 가능한 규모(100 mg/batch)의 분리정제 공정 확립(추후 GMP 인증 신청 시 사용 가능한 성능 및 질적 수준의 장비로 구축)
 - : 산업화 수준의 단백질 다량 추출을 위한 식물 조직별 적정 파쇄방법(단백질 분해 억제 기술 적용)

: 크린룸에 산업화 수준(100 mg/batch)의 단백질 분리정제가 가능한 분리정제 시설 및 장비 구축(산업화 규모의 농축기, 원심분리기, 액체크로마토그래피 장비(FPLC 등), 이온교환 컬럼, 사이즈 커팅을 위한 컬럼)

- 유용단백질 고생산 GM작물 중 산업화 가능 수준의 생산성을 지닌 작물을 대상으로 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립

: 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 산업화를 위한 SOP 3종 이상 확립

: 식물유래 단백질 추출, 분리, 정제 공정 구축: 재조합 단백질 100 mg/batch(순도 95% 이상)이상 규모의 정제시설 구축

: 식물유래 단백질의 효능 확인, 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발

- 식물유래 단백질 산업화 완성

: 산업용 단백질 최소 1종과 의약품단백질 최소 1종 포함 총 3종 이상

□ 제1 협동과제(LED-농생명융합기술센터)

○ 과제명: 유용단백질 생산 GM작물의 최적 재배조건 확립 및 다량생산

○ 주요 연구개발 목표

- 본 과제의 각 참여기관에서 확보한 모든 유용단백질 고생산 GM작물에 대한 최적재배조건 확립

- 각 GM작물에 대한 산업화가 가능한 규모의 다량생산 체계 확립

○ 주요 연구내용

- 본 과제에서 확립한 각종 유용단백질 고생산 GM작물을 밀폐형 식물공장 내에서 다량 재배할 수 있는 최적의 재배조건을 확립함

- 분자농업 산업화를 위한 GM작물의 최적 재배조건은 단순 생체중의 증가가 아닌 단백질 고발현 조건을 찾아야 하므로 각 세부과제 수행기관과 협력하여 단백질 다량생산 조건을 확립함

- 유용단백질 생산 GM작물은 사용하는 외래 유전자의 발현시스템에 따라서 적절한 생육시기가 다르므로 발현 시스템별 최적 성장 조건을 확립 할 것임

: 핵 형질전환 시스템이 적용 된 GM작물과 viral vector와 같이 transient expression 시스템의 의 경우는 단백질 고생산이 가능한 생육시기가 다름

: 생산하고자 하는 목적 단백질의 안정성 등 제반 생화학적 특성에 따라서도 최적 생산 시기, 재배 조건 등이 상이하므로 각 세부과제 책임자와 협력하여 재배조건을 확립 할 것임(재배 조건별 단백질 농도 등의 확인이 필요 함)

□ 제2 협동과제(전북대학교(협동주관), 카톨릭 의과대학(협동참여))

○ 과제명: 고발현 viral vector 시스템을 이용한 고부가가치 단백질 생산 GM작물 개발

○ 주요 연구개발 목표

- *P.gingivalis*와 연관된 anti-FimA 항체와 anti-CCP 항체를 고발현하는 형질전환 식물시스템 구축 및 대량생산 방법 확립.
- Anti-FimA 항체와 anti-CCP 항체를 발현하는 형질전환 식물체의 대량생산을 통해 관절염 예방 및 진단용 항체의 개발.
- *P.gingivalis*와 연관된 anti-CCP Ab와 anti-FimA Ab를 이용하여 류마티스 관절염의 치료의 새로운 전략을 수립하고 이를 임상에 적용.
- 신규의 유용단백질 고생산 식물체 확립(CCP mAb, PNGase A, G-CSF)

○ 주요 연구내용

- 선행연구 결과 확립한 GM벼 유래 항체에 대한 affinity column을 이용한 정제법 확립
: 카톨릭대학 연구팀에 제공하여 류마티스 관절염관련 *in vitro*, *in vivo* 실험에 사용
- Anti-FimA 항체 고발현 식물 시스템 확립
: Anti-FimA 항체를 고발현하는 transient expression 벡터에 클로닝
: Anti-FimA 항체를 담배의 잎에 agroinfiltration 법을 이용하여 형질전환
: 형질전환된 잎 추출물을 이용하여 Western blot analysis 수행
- Anti-FimA 항체 고발현 식물체의 대량생산 체계 확립
- *P. gingivalis*를 기존의 관절염 동물 모델 (collagen induced arthritis mice model)에 다양한 방법으로 처리하여 관절염의 악화를 확인하고 다양한 조건 중에서 최적의 PG-CIA 동물모델 정립
- 정립된 PG-CIA모델에서 *P. gingivalis*를 식물유래 anti-Fim A 항체를 통해 억제하여 관절염 발생 정도나 빈도를 억제하는 것을 확인.
- RA환자의 치주균주샘플을 확보하여 식물유래 Anti-FimA 항체를 처리한 뒤, 균의 독성, 접착성, PAD enzyme의 활성화도 약화를 유도함 -> 식물유래 Anti-FimA 항체의 *P. gingivalis*에 대한 억제효과를 *in vitro*에서 조사.
- Anti-FimA 항체가 최대의 억제효과를 발휘할 수 있는 형태를 조사(gargle vs inoculation vs supplementary vs etc)
- RA환자에게 Anti-FimA 항체를 국소 투여하여 관절염의 치료효과를 관찰하기 위한 임상연구 개시 준비 완료: 독성평가, 약동학, 약제제형, IND등 사전작업 마무리
- Anti-CCP 항체 고발현 식물 시스템 확립
: Anti-CCP 항체 유전자를 본 연구팀이 자체 개발한 고발현하는 transient expression 벡터 pMYV150 또는 pMYV170에 클로닝
: transient expression 벡터는 제2 협동과제 연구실에서 개발하여 고발현을 확인한 벡터로서 국내 TMV 유전체를 기반으로 하는 발현벡터 pMYV150과 PVX를 기반으로 하는 pMYV170임
: Anti-CCP 항체 유전자를 포함하는 발현벡터 토양균에 도입하고 형질전환된 토양균을 담배의 잎에 agroinfiltration 법을 이용하여 형질전환

- : 형질전환 된 잎 추출물을 이용하여 Western blot analysis 수행
- Anti-CCP 항체 고발현 식물체의 대량생산 체계 확립
- Human granulocyte-colony stimulation factor (hG-CSF) 고발현 식물 시스템 확립
 - : hG-CSF 유전자를 본 연구팀이 자체 개발한 고발현하는 transient expression 벡터 pMYV에 클로닝
 - : hG-CSF 유전자를 포함하는 발현벡터 토양균에 도입하고 형질전환된 토양균을 담배의 잎에 agroinfiltration 법을 이용하여 형질전환
 - : 형질전환 된 잎 추출물을 이용하여 Western blot analysis 수행
 - : ELISA 기법을 이용한 정량
 - : 식물유래 hG-CSF activity 확인
- PNGase A 고발현 식물 시스템 확립
 - : PNGase A 유전자를 본 연구팀이 자체 개발한 고발현하는 transient expression 벡터 pMYV에 클로닝을 고발현하는 transient expression 벡터에 클로닝
 - : PNGase A 유전자를 포함하는 발현벡터 토양균에 도입하고 형질전환된 토양균을 담배의 잎에 agroinfiltration 법을 이용하여 형질전환
 - : 형질전환 된 잎 추출물을 이용하여 Western blot analysis 수행
 - : ELISA 기법을 이용한 정량
 - : 활성 측정
- PNGase A를 고발현하는 식물체의 대량생산 체계 확립

□ 제3 협동과제(순천대학교)

- 과제명: 고발현 핵 형질전환 시스템을 이용한 고부가가치 단백질 생산 GM작물 개발
- 주요 연구개발 목표
 - 인슐린단백질 고생산을 위한 발현시스템 확립(mg/kg fresh weight)
 - 인슐린단백질의 고유적 생리기능이 보전된 효율적 발현시스템 확립
 - 인슐린 고효율발현 시스템을 활용하여 산업성이 높은 신규의 유용단백질 고생산 식물체 확립(PNGase A, Activin A)
- 주요 연구내용
 - 단백질 고효율 발현을 위한 프로모터 및 해독증진자 발굴
 - 담배식물체에서 최적의 세포내 단백질 분배 및 축적 부위 발굴
 - 인슐린 단백질의 proteolytic processing의 최적화
 - 식물체에서 생산된 인슐린 단백질의 안정화
 - 인슐린단백질의 고효율 fusion tag 개발
 - 인슐린단백질의 고효율 세포외 기술 탐색
 - 산업성이 높은 의료용단백질이 도입된 키메라 유전자 construct 제조 및

형질전환담배식물체 2종 추가 확립(PNGase A, Activin A)

□ 제4 협동과제((재)전주생물소재연구소)

○ 과제명: 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 고부가가치 단백질 생산 GM작물 개발

○ 주요 연구개발 목표

- TEV endopeptidase 고발현 식물체에 대한 Homo line 구축 및 생화학적 분석
- 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 G-CSF 고생산 세포주 확립 및 생화학적 분석
- 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 PNGase A 고생산 세포주 확립 및 생화학적 분석
- 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 Activin A 고생산 세포주 확립 및 생화학적 분석

○ 주요 연구내용

- TEV endopeptidase 고발현 식물체에 대한 Homo line 구축 및 생화학적 분석
 - : 본 과제에 제공한 TEV endopeptidase 고발현 식물체를 이용한 homo line 제작
 - : 식물유래 TEV endopeptidase의 생화학적 분석
- 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 G-CSF 고생산 GM벼 확립 및 생화학적 분석
 - : 이미 확보한 G-CSF 유전자의 발현벡터 제작
 - : 형질전환체에 대한 분자생물학적 분석을 통한 G-CSF 고생산 형질전환 세포주 선발, 식물체 재분화
 - : G-CSF 고생산 형질전환 세포로부터 현탁세포 유도 및 다량배양 시스템 구축
 - : G-CSF 고생산 현탁세포 다량배양을 통한 G-CSF 생산체계 구축
 - : 식물유래 G-CSF의 생화학적 분석
- 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 인간 트립신 고생산 GM벼 확립 및 생화학적 분석
 - : PNGase A 유전자의 발현벡터 제작
 - : 형질전환체에 대한 분자생물학적 분석을 통한 PNGase A 고생산 형질전환 세포주 선발, 식물체 재분화
 - : PNGase A 고생산 형질전환 세포로부터 현탁세포 유도 및 다량배양 시스템 구축
 - : PNGase A 고생산 현탁세포 다량배양을 통한 PNGase A 생산체계 구축
 - : 식물유래 PNGase A의 생화학적 분석
- 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 Activin A 고생산 GM벼 확립 및 생화학적 분석

- : Activin A 유전자의 발현벡터 제작
- : 형질전환체에 대한 분자생물학적 분석을 통한 Activin A 고생산 형질전환 세포주 선발, 식물체 재분화
- : Activin A 고생산 형질전환 세포로부터 현탁세포 유도 및 다량배양 시스템 구축
- : Activin A 고생산 현탁세포 다량배양을 통한 Activin A 생산체계 구축
- : 식물유래 Activin A의 생화학적 분석

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

2-1 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술개발 현황

가. 연구분야의 국내·외 현황과 미래전망

(1) 국외의 기술동향 및 수준

□ 단백질 의약품 분야

▷ 유럽연합(EU) 동향

○ EU는 유럽의약품국(European Medicines Agency, EMA)을 통해 바이오시밀러 승인 및 지침서를 제공하고 있음

- 인슐린, hG-CSF(granulocyte-colony stimulating factors), 에리스로포이에틴(erythropoietins, 적혈구생성촉진인자), 소마트로핀(somatropins, 인체성장 호르몬 HGH), 저분자하파린(low-molecular weight heparins) 및 인터페론알파(interferon alphas) 등 6개 분류의 바이오의약품에 대한 지침을 발표함
- 또한 2010년 단일클론항체 분류에 대한 가이드라인 초안을 발표함

○ 스위스 Sandoz社(Novatis社의 자회사)는 EU 시장에서 HGH, 필그라스티움(filgrastim) 및 인체 에리스로포이에틴 등 3가지 바이오시밀러를 출시함(Teva社도 동일함)

- Sandoz社는 리투시맵(rituximab)에 대한 제2단계 임상시험을 진행하고 있음
- 리투시맵은 B세포표면단백질(B-cell surface protein)에 대항하는 단일클론항체이며, 비호지킨림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 만성림프성백혈병(chronic lymphocytic leukemia) 및 류마티스관절염 등의 치료에 사용됨
- 리투시맵은 생명을 위협하는 잠재적 질병에 대한 치료제로 사용되는 거대 단백질로서 이를 바이오시밀러로 승인할지 여부에 대해 규제기관들의 면밀한 조사가 진행될 것으로 예상됨

○ 독일 Merck社는 2008년 12월 바이오시밀러 개발을 위해 Merck BioVenture社를 설립함

- Merck社는 2010년부터 2개의 바이오시밀러 후보군을 개발 중이며, 2012년까지 총 5개의 바이오시밀러가 개발될 것이라고 밝힌 바 있음

- 또한 한국의 한화케미컬과 합작으로 관절염 치료제인 이타너셉트(etanercept) 바이오시밀러를 개발하고 있음
- 이스라엘 Teva社는 제네릭 분야로 사업을 확장하기 위해 2010년 당시 EU에서 펠그라스티프 바이오시밀러에 대해 승인을 받은 Ratiopharm Group社를 인수함
- 또한 제약분야가 아닌 타 산업의 선두주자인 기업들 역시 바이오시밀러 분야로 진출하고 있음
 - 대표적인 예로 삼성이 있으며, 삼성은 바이오시밀러 개발을 위해 Quintiles Transnational社와 공동으로 2억 5천만 ~ 3억 9천만 달러를 투자한 것으로 알려짐
- ▷ 미국 동향
 - FDA가 승인한 바이오시밀러 제품에는 글루카곤(glucagon), 히알루로니다아제(hyaluronidase), 칼시토닌살몬재조합체(calcitonin salmon recombinant)가 있음
 - 2011년 오리지널 제약사 Amgen社와 제네릭 제약사 Watson社의 협력이 큰 관심의 대상이 됨
 - 두 제약사는 Amgen社 제품에 대한 바이오시밀러가 아닌 종양항체 바이오시밀러를 생산할 예정임
 - Pfizer社는 2010년 인간 인슐린(human insulin) 바이오시밀러 시판을 위해 인도의 Biocon社와 합작 계약을 체결함
 - Pfizer社는 해당 바이오시밀러 인슐린에 대해 2012년에 EU에서, 2015년에 미국에서 승인을 받을 것으로 예상되고 있음
 - Pfizer社는 그동안 오리지널 의약품 개발에만 치중해왔기 때문에 Pfizer社의 바이오시밀러 분야 진출은 산업 관계자들의 관심을 모음
- ▷ 캐나다 동향
 - 캐나다 Sandoz社가 인간 성장 호르몬(Omnitrope)에 대해 당국의 승인을 받음
 - 다른 선진국에 비해 규모가 작은 캐나다 제약시장은 다국적 제약업체의 우선적 관심대상은 아니며, 캐나다 기업들의 바이오시밀러 개발 활동도 활발하지 않음
 - Apotex社는 2008년 바이오시밀러인 과립대식세포집락촉진인자인 GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) 생산을 위해 Intax社 및 Kwind

Pharma社와 개발 제휴를 발표한 바 있음

- SemBioSys社와 Plantform社는 바이오시밀러 생산을 위해 식물 기반의 발현시스템(plant-based expression systems)을 개발하고 있음

□ 분자농업 분야

- 현재 유럽에서 광범위하게 사용되고 있는 두 가지의 공인된 생물 의약품 제조 방법으로 동물세포배양 제조(Mammalian Cell Culture Manufacturing)와 미생물 발효(Microbial Fermentation)를 들 수 있음. 많은 생산량과 레이아웃 비용, 하류공정에서의 애로사항, 미생물 오염에 대한 높은 취약성, 긴 소요시간, 제한된 수용력 등, 기존의 생물 의약품 제조 공정에 동반되는 많은 문제점들로 인해 형질전환 동물 및 식물(Transgenic animals and plants) 활용과 같은 혁신적이고 비용 효율적인 생물 의약품 제조 대안들의 수요가 높아지고 있음.
- 기술 분석 전문회사인 프로스트 앤 설리번에 의하면 현재까지 인체용 PMP(식물 제조 의약품 ; Plant Manufacturing Pharmaceutical) 시장 상업화를 위한 마케팅 승인을 받지 못해, 유럽에서는 생물 의약품 생산에 형질전환 식물을 사용하는 식물 분자농업(Plant Molecular Farming , Biopharming이라고도 불림)이 아직은 초기 단계에 머물러 있다고 보고하고 있음. 또한 식물 분자농업에 북미보다 상대적으로 뒤늦게 진입하여, 이와 관련된 대다수의 유럽 업체들의 식물 분자농업 R&D 역시 초기 단계에 머물러 있음.

FROST & SULLIVAN

HOME | INDUSTRIES & MARKETS | OUR SOLUTIONS | EVENTS | CAREERS | ABOUT

RETURN TO: Home > Press Centre

PRINTABLE VERSION EMAIL

프로스트 앤 설리번, 유럽내 식물 분자농업을 활용한 생물 의약품 시장 전망

Date Published: 29 Feb 2012

프로스트 앤 설리번, 유럽내 식물 분자농업(Plant Molecular Farming)을 활용한 생물 의약품 생산 기회와 과제들이 공존

2012년 2월 29일, 대한민국 - 현재 유럽에서 광범위하게 사용되고 있는 두 가지의 공인된 생물 의약품 제조 방법으로 동물세포배양 제조(Mammalian Cell Culture Manufacturing)와 미생물 발효(Microbial Fermentation)를 들 수 있다. 많은 생산량과 레이아웃 비용, 하류공정에서의 애로사항, 미생물 오염에 대한 높은 취약성, 긴 소요시간, 제한된 수용력 등, 기존의 생물 의약품 제조 공정에 동반되는 많은 문제점들로 인해 형질전환 동물 및 식물(Transgenic animals and plants) 활용과 같은 혁신적이고 비용 효율적인 생물 의약품 제조 대안책들의 수요가 높아지고 있다.

< 유럽의 분자농업시장전망에 대한 프로스트 앤 설리번 보고 >

- 식물 분자농업 관련해 시행된 세계 전체 실험들 중 약 8%만이 유럽에서 시행됐으며, 세계 전체 식물 분자농업 특허권 중 약 19%를 유럽이 보유하고 있음. 하지만 기술 플랫폼과 억제 설비에 관한 공공부문 연구 활동은 미국 수준과 동등하며, 유럽연합

내에서 독일, 영국, 프랑스, 이탈리아, 스페인이 식물 분자농업 공공부문 연구를 선도하고 있는 것으로 파악됨.

- 분자농업 시장에 진출한 기업들을 살펴보면, 발현계와 작물 선택과 타당성 분석 시행 등을 포함한 특허 기술을 개발하는 기술 제공업체와 자체 PMP를 개발하여 상업화시키는 업체, 이 두 가지 타입으로 나눌 수 있음. 다국적 기업인 Bayer와 BASF(독일)는 Icon Genetics(독일)과 CropDesign(벨기에)와 같은 신생업체들을 각각 인수하며, 유럽 시장의 주요 업체로 자리매김하고 있음.
- 전 세계적으로 대부분 분자농업 산업화 초기 단계로 기술의 격차가 크지 않으며, 조기 사례창출을 통한 세계 시장 선점이 가능
- 전 세계적으로 약 33개의 기업에서 분자농업 연구를 하고 있으며, 대부분 임상 진입(1/2상) 단계로 일부 선진 국가에 집중되어 있음
- PMP가 과학적 개념, 비용 혜택, 생산 유연성 상승 측면에서 유럽의 지속적인 생명공학에 큰 호응을 얻고 있음. 하지만 많은 환경적, 기술적, 경제적 규제들이 PMP에 대한 완전한 승인과 큰 제약사들로부터 더 많은 자금을 끌어내는데 제한을 주고 있는 실정임.
- 미국, EU, 캐나다 등 선진국에서 상업적으로 이용하기 위한 재조합단백질을 작물에서 생산하는 분자농업 연구가 활발하게 진행
- 미국은 작물시험재배, 특허, 임상시험, 논문발표 등의 측면에서 보다 진전된 상업화 연구개발에서 두각을 나타냄
 - EU 국가들은 산업화 초기 연구에 집중되어 있으나 정부 연구개발 투자에서는 EU와 미국이 유사한 정도의 초기 산업화 연구개발 단계에서 진행 중
- 최근 당근에서 생산된 고셔씨병 치료제가 승인을 받는 등 치료용 의약단백질의 정부 승인 증가 추세로 상업화에 성공단계에 이룸
 - 현재 상용화에 성공한 제품으로는 시그마社에서 판매하고 있는 avidin, trypsin, lysozyme 등의 연구용 시약이 주를 이루고 있음
 - 이스라엘의 바이오시밀러를 주요 Protalix는 고셔병치료제인 Taliglucerase alfa를 개발하여 라이선스 독점권을 1억1,500만달러에 화이저에 양도

개발 단계별 기업 분포

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

식물분자농업 기업 분포



< 분자농업 기업 분석 및 산업화 수준 >

< 주요 분자농업 관련 회사현황 >

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

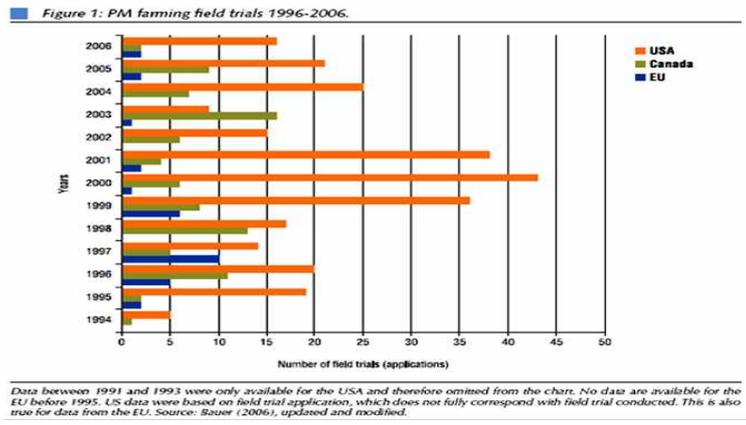
<식물유래 의료용 단백질의 산업화 현황>

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

<식물유래 산업용 단백질의 산업화 현황>

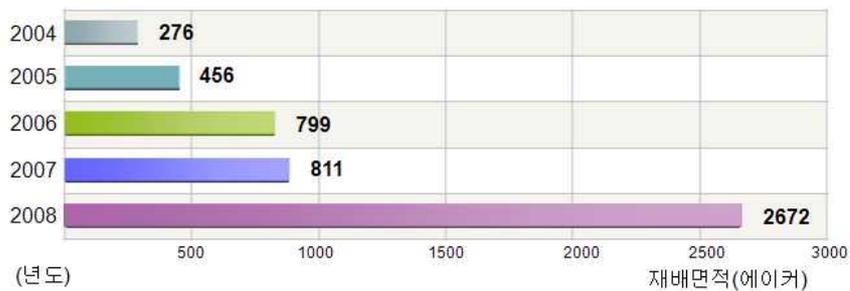
Product	Trade Name	Pharma Crop	Source of Genes	Commercial Purpose	Company Producing	Company Selling ² (product number)
Aprotinin	AproliZean	Corn	Cow	Research and manufacturing	ProdiGene	Not available
Aprotinin	Apronexin	Tobacco	Cow	Research and manufacturing	Large Scale Biology	Sigma Chemical Company (A6103)
Avidin	Recombinant avidin	Corn	Chicken	Research and diagnostic reagent	ProdiGene	Sigma Chemical Company (A8706)
B-glucuronidase (GUS)	Not available	Corn	Bacteria	Research and diagnostic reagent	ProdiGene	Not available
Trypsin	TrypZean	Corn	Cow	Research and manufacturing	ProdiGene	Sigma Chemical Company (T3568 and T3449)
Lactoferrin	Not available	Rice	Human	Research	Ventria Bioscience	Sigma Chemical Company (L4040)
Lysozyme	Not available	Rice	Human	Research	Ventria Bioscience	Sigma Chemical Company (L1667)

○ 200년 이후 재배시험 중인 분자농업 제품수가 미국을 중심으로 급격하게 증가하고 있으며, 미국이 압도적으로 많음



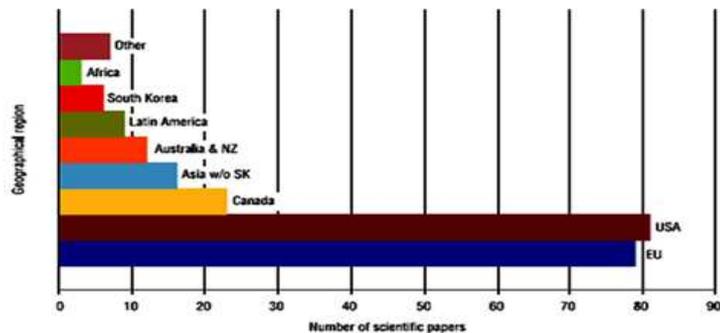
< 재배시험 중인 각국의 분자농업 제품 수 추이(1996~2006년) 출처: EU 공동연구센터(JRC : Joint Research Center) >

- 미국의 의료용단백질 생산용 GM작물의 포장시험 재배면적도 2008년도에 급격하게 증가하고 있어 분자농업의 본격적인 산업화가 예상됨



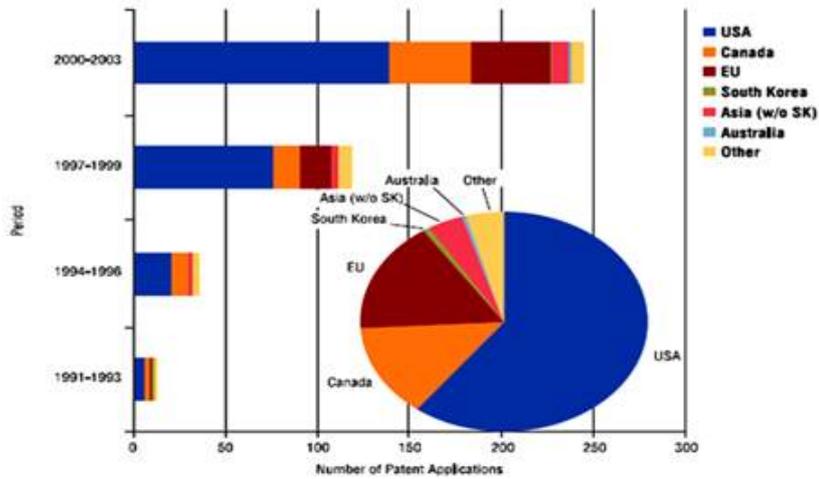
<미국의 의료용단백질 작물의 포장시험 재배 면적 추이, '04~'08년도>

- 분자농업 관련 연구논문발표와 특허획득은 대부분은 미국과 EU국가들이 주도하고 있음
 - 한국은 미국과 EU의 1/10의 수준, 미국은 상업화를 위한 기업체의 연구개발 성과 활발, EU국가들은 정부 연구개발 지원이 활발함



<분자농업 관련 각국의 연구논문 수>

- 2000년 이후 미국의 특허획득수가 급격하게 증가. 한국은 매우 저조한 수준



<분자농업 관련 각국의 특허 수 (원형은 2003년 자료임) >

- 분자농업 관련 정부의 연구개발 사업은 EU국가에서 활발하게 진행, 개별 국가 및 EU 집행위원회에서도 연구개발 지원
- 1994년도 시작된 제4차 Framework 프로그램에서부터 진행되었으며 6차('02~06)에서는 Pharma- Planta 프로젝트로 진행되었음. European Pharma-Plantaresearch consortium 1,200만 유로(약 200억원)
- 7차('07~'13) FP에서도 분자농업에 투자 확대, 녹색의약품(Green Pharmaceuticals) 생산을 목표로 진행
 - Food and Agriculture(FA) 세션에서 수행되는 분자농업의 연구목적은 새로운 고부가가치 작물을 개발하여 유럽의 농업에 새로운 기회를 제공하기 위함
 - 프라운호퍼 연구소 주관의 COMOFARM 프로젝트('09~'12)에서 기업 등이 참여하는 중소규모의 연구에 440만 유로 지원
- 분자농업 방식으로 생산하려는 녹색의약품으로는 인간 질병 치료제 대부분을 비롯하여 조류독감백신 등 가축용, 가금류용 백신이 현재 연구 중
- 2015년까지 10억달러 이상의 시장 수요가 있는 녹색의약품이 40 개 정도일 것으로 예상
 - 예: 알츠하이머치료제, 항암제, 탄저병, 관절염, 만성폐쇄폐질환, 낭성섬유증

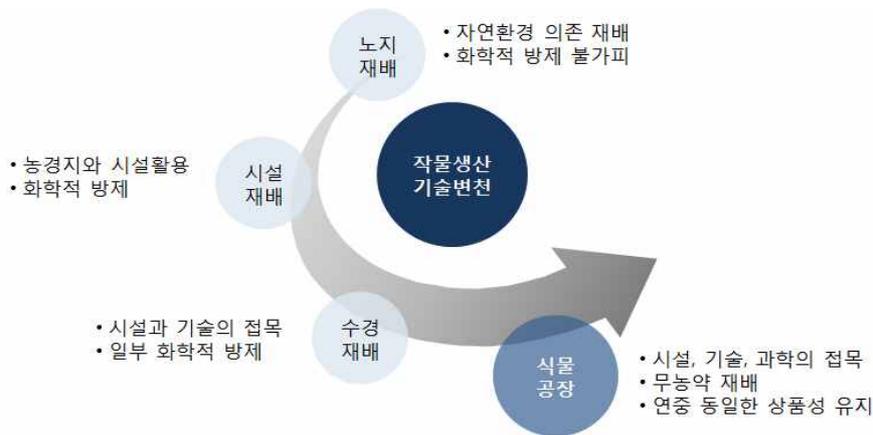
<EU Framework의 분자농업 프로젝트>

Project No.	Project Title
4th Framework Programme	
FAIR-CT96-5068	Molecular farming of therapeutic antibodies in plants
FAIR-CT96-3110	Production of diagnostic and therapeutic antibodies in plants by molecular farming
FAIR-CT96-3046	Production of recombinant immune complexes in transgenic plants for systemic and mucosal vaccines
FAIR-CT95-1039	Processing Technology for Recovery of Recombinant Antibody Produced in Crop Plants
FAIR-CT95-0720	The Plant as a Factory for the Production of Oral Vaccines and Diagnostics
5th Framework Programme	
QLK3-CT-1999-00692	The Plastid Factory
QLK2-CT-2000-00739	Immunotherapy of enteric infections by rotaviruses and coronaviruses using plantibodies
QLK4-CT-2002-51547	Metabolic engineering of plant cells for the production of pharmaceuticals
6th Framework Programme	
N.I.	Pharma-Planta

□ LED기반 식물공장의 특징

식물공장이란? 통제된 시설 내에서 생물의 생육환경(빛, 공기, 열, 양분)을 인공적으로 제어하여 식물생산을 자연환경에 영향을 받지 않고 공산품처럼 계획생산이 가능한 시스템적인 농업형태

- 식물공장은 환경제어 시스템, 로봇 자동화 공정, LED 조명광원, Bio 등 IT·NT·BT 등 최첨단 기술이 융·복합된 미래형 농업임
 - 과거 노지에서 자연에 전적으로 의존하여 식물을 재배하는 시스템에서 최적의 인공조건 하에서 계획생산이 가능한 첨단식물재배 시스템이 가능하게 됨



< 식물생산 기술의 변천 >

- 최첨단기술의 융·복합과정을 통하여 수평 개념의 재배농업에서 생산성 및 토지이용률이 높은 수직농장시스템으로 재배농법이 변화하고 있음



수평형 식물공장



다단식 식물공장

< 식물공장의 운영 모습 >

- 식물공장은 제어 가능한 공정을 통해 최적의 생산 환경을 조성하기 때문에 농산물의 품질이 우수하며, 농산물 소비패턴이나 소비자 기호에 능동적으로 대처함으로써 농업의 소비자 지향성을 제고할 수 있음

< 식물공장의 주요 특징과 내용 >

특 징	내 용
계획생산, 주년생산	생산의 계획성, 시기나 장소에 좌우되지 않음
재배환경의 최적 제어	생육의 제어, 단기간 대량생산, 수확물의 균일성과 재현성, 수량 및 품질의 향상
작업의 자동화, 생력화	환경관리의 자동화, 재배관리과정(파종, 이식, 수확, 포장)의 자동화 및 생력화
수확물의 부가가치 제고	재배 불가능한 식물의 생산 공급, 무농약 및 청정재배, 영양가 향상, 기능성 향상, 고기능성 바이오매스

출처: 식물공장의 동향과 전망, 한국농촌경제연구원, 2009

- 완전밀폐형 식물공장 건설 및 운영에는 재배기술(환경제어, 양액제어, 급배수), 생산기술(기계화, 생력화), 운영기술(공장관리, 시설설비 기능진단, 폐기물처리, 생산판매) 등 다양한 요소기술들을 필요로 함
- LED기반 식물공장을 활용한 분자농업의 산업화 사례
- 일본 경제산업성은 ‘산출연 산업변혁 연구 이니셔티브’를 수립하여 완전 밀폐형 식물공장 시스템을 활용, 분자농업 산업화 프로젝트로 개 인터페론-α 딸기를 개발함
- 세계 최초 밀폐형 식물공장을 활용한 GM 식물유래 동물의약품 인허가 단계 도입, 30평 규모의 재배실에서 1년 재배를 통해 100만 마리의 개 치주염 치료 가능



<AIST 식물공장의 평면도>



<일본의 딸기를 이용한 개 인터페론-α 생산 과정>

(2)국내의 기술동향 및 수준(산업화 기술을 중심으로)

□ 단백질 의약품 분야

- 바이오의약품 개발 여건은 선진국에 비하여 매우 취약한데, 국내 총 연구개발비가 다국적 제약회사 중의 하나인 Pfizer의 연구비에도 못 미치고 있음. 그러나 과거 대규모 연구비 투입으로 극소수의 Blockbuster를 기대하는 기존의 신약개발과는 다르게, 단백질 의약품은 비교적 투자 대비 매출이 안정적이라는 장점을 가지고 있음.
- 바이오의약품 시장은 무섭게 성장하고 있음. 2006년 전 세계 의약품시장 규모 6430억 달러(약 723조 원) 중 바이오의약품은 762억 달러로 11.9%를 차지했음. 그 비중은 지난해 9000억 달러 가운데 16.0%(1442억 달러)로 높아졌다. 2020년에는 21.8%로 높아질 것으로 보임.
- 바이오의약품의 성장속도는 국내에서도 무척 빠름. 2009년 기준 기존 제약업의 생산규모 증가율은 6.4%에 그쳤지만 바이오의약품은 37.0% 성장해 5배 이상의 성장속도를 보이고

있음.

- 지식경제부는 “현재는 기술이나 경험 등에서 미국 유럽 등에 밀리고 있지만 바이오시밀러를 통해 개발 경험을 쌓고 판매 역량 등을 늘리다 보면 자연스럽게 바이오신약 개발로 옮겨갈 것”이라는 판단으로 적극적인 지원정책을 수립하고 있음.
- 삼성전자는 지난해 7월 반도체·휴대전화 이후의 새로운 먹거리로 바이오시밀러 사업을 선정하고 9종 이상의 항체 바이오시밀러를 대량 생산한다는 청사진을 밝힘. 2012년 항체 바이오시밀러 출시를 목표로 삼은 한화석유화학도 충북 오송생명과학단지내 공장을 짓기 시작했음. 2018년까지 2055억원을 투자할 계획임.
- 항체 치료제 전문업체인 이수앱지스는 2007년 심혈관질환 바이오 의약품 ‘클로티넵’을 개발, 출시한 데 이어 현재까지 브라질 등 32개국과 3~5년간 6759만 달러 규모의 수출 계약을 했음. 지난해 5월에는 아르헨티나 업체와 고셔병을 치료하는 바이오 의약품을 117억원 규모로 수출키로 했음. 항체 치료제 기술을 인정받아 삼성전자의 항체 바이오시밀러 개발에 협력하고 있음.
- 신생업체로 엔브렐 바이오시밀러를 개발 중인 바이오트라이온은 말레이시아 제약사와 함께 그 나라 현지에 바이오 의약품 생산설비를 건설하기로 했음. 말레이시아는 비교적 선진화된 의약품 허가·등록 절차를 갖고 있어 이곳에서 허가받은 바이오 의약품은 동남아는 물론 이슬람 국가로 수출이 용이할 것으로 판단 함.
- 한올제약의 경우 프랑스 노틸러스 바이오텍이 보유한 개량형 단백질 기술과 관련 특허권을 인수함으로써 바이오베터 업체로 부각하고 있음. 노틸러스 바이오텍으로부터 확보한 ‘개량형 인터페론 알파’는 미국에서 임상시험 중으로, C형 간염 치료에 탁월한 효과를 내는 것으로 평가받고 있음.
- 셀트리온은 올해부터 출시를 목표로 허셉틴(유방암치료제) 바이오시밀러와 레미케이드(류머티즘 관절염 치료제) 바이오시밀러, 얼비투스(직결장암) 바이오시밀러 등 7개 바이오시밀러 제품을 개발 중에 있음.
- LG생명과학은 2012~2015년 사이 특허가 만료되는 대형 바이오의약품 중 관절염치료제(엔브렐, 휴미라) 및 빈혈치료제(EPO) 개발에 관심을 두고 있음. 특히, 엔브렐 바이오시밀러는 이미 오송생명과학단지 내 새로 조성 중인 오송캠퍼스에 생산설비를 갖추고 있으며, 자체 상업화 및 국내외 파트너링을 포함한 다양한 바이오시밀러 사업을 추진할 계획임.

- 동아제약은 바이오 의약품 수출회사로 면모를 쇄신하고 있음. 동아제약은 불임치료제 고나도핀을 바이오시밀러로 개발했고 호중구 감소증 치료제와 왜소증 치료제를 바이오신약으로 현재 개발 중에 있음
- 녹십자는 현재 호중구 감소증 치료제, 적혈구 감소증 치료제, 항암 항체치료제 등 바이오베터를 개발 중이며 2013년부터 순차적으로 출시할 계획임.
 - 가장 빠른 진척을 보이고 있는 것은 항암보조제로 사용하는 호중구 감소증 치료제 'GCPGC'로 현재 임상 2, 3상을 동시에 진행 중이며 2013년 출시가 가능할 것으로 전망됨. 녹십자 허셉틴 바이오베터 'MGAH22' 역시 올해 하반기부터 미국에서 글로벌 임상을 실시해 2016년 하반기 국내 처음으로 출시를 계획 중임.
- 한미약품은 랩스커버리 기술을 적용한 당뇨·비만치료제, 호중구 감소증 치료제, 빈혈 치료제 등 바이오신약과 경구용, 표적항암제 등에 대한 임상시험을 미국과 유럽 등 국내외에서 진행 중에 있음. 하지만 바이오의약품의 특허기간을 놓고 개발업체들이 혼선을 겪고 있어 출시 이후 특허분쟁 가능성도 잠복하고 있는 상황임.



< 우리나라 대표적인 바이오시밀러 개발회사 >

- 우리나라 정부는 단백질의약품 개발에 적극적인 지원을 하고 있음: 우리나라 정부는 2009년 총 12조3,000억원의 R&D 예산의 7.7%인 9,500억원을 BT 분야에 지원 하였으며 이 중에서 바이오의약품에 관련된 것만 ▲산업원천기술개발사업 9개 과제 115억원(항체치료제 50억원, 유전자치료제 20억원, 줄기세포치료제 45억원)지원 ▲블러버스터 바이오의약품 개발을 위한 '바이오스타 프로젝트'로 16개 기업에 128억원 투자 ▲신성장동력을 위한 R&D사업인 '스마트 프로젝트, 바이오 시밀러 개발에 300억원 지원 등 수백억원이 넘음

- 현재 생산 2억달러 수준인 바이오시밀러(신약이 아닌 복제약)산업을 오는 2020년 생산 200억달러, 수출 100억달러로 세계 시장 1위에 오른다는 정부 대책이 마련되어 실행 중에 있음. 정부는 현재 초기산업을 주도하거나 주도할 예정인 셀트리온, LG생명과학, 삼성전자, 한올제약, 한화케미칼 등 5개사를 10년 내 바이오시밀러 분야의 세계 5대 기업으로 성장하도록 지원키로 했음.
- 지식경제부는 '바이오시밀러 글로벌 수출 산업화 전략'을 수립하였음. 정부는 ▲ 글로벌 수준의 임상·생산 인프라 확충 ▲ 생산 전문 인력 등 현장지향형 인력양성 확대 ▲ 마케팅·인허가·금융·정보 등 전주기 수출 지원시스템 구축 ▲ 원료·장비 국산화 및 공통 기반 기술개발 ▲ 법·제도 지원 기반 강화 등 5대 전략과제를 추진키로 했음.
 - 세부과제에 따르면 인프라확충과 관련, 전임상·임상 대행 서비스기관(CRO)을 활용해 바이오협회와 5개사가 참여하는 바이오시밀러 임상 시범사업을 추진해 임상시스템과 기술개발력을 높이기로 했음
 - 충북 오송과 대구 신서의 바이오, 제약중심 거점에 있는 신약개발지원센터, 실험동물센터 등의 공공 CRO 인프라에 대해서는 고도화 작업이 추진됨
 - 국내 개발 바이오의약품의 선진국 수출을 위한 조치로는 미국 식품의약국(FDA)의 의약품제조공정기준(cGMP) 기준을 충족하는 바이오의약품 전문 생산시설을 구축할 계획임.

바이오시밀러 세부실천계획 (Action Plan)

실천 과제	일정(까지)	담당부처·기관
가. 글로벌 수준의 임상·생산 인프라 확충		
- 대형실험동물 인프라 구축	'11 ~ '14	농림부
- 국내 CRO 활용 바이오시밀러 임상 시범사업	'10 ~ '14	지경부
- 침묵단지 공공 CRO 인프라 고도화	'10 ~ '14	지경부·복지부·교과부
- KIT, 화시연 민간 경영 방식 도입	'10 ~ '14	지경부
- 공공 CMO 활용도 제고 및 설비 증설	'10 ~ '14	지경부·복지부
- 지역별 바이오특화센터 생산시설·장비 고도화	'11 ~ '14	지경부
나. 전문인력 10만명 양성		
- 바이오전문인력양성 사업 확대·개편	'11 ~ '15	지경부·노동부
- 풀라텍 바이오대학 교과과정 개편 및 시설장비 보강	'11 ~ '15	노동부·지경부
- 대학 교육 프로그램 개편 유도	'11 ~ '15	교과부·지경부
- 바이오인력고용 DB 통한 취업알선	'11 ~ '15	지경부(바이오협회)
다. 글로벌 수출 역량 강화		
- 해외 유통규제 개발 정보에 대한 정보제공 사업 추진	'11 ~ '13	통해청·식약청·바이오협회
- 기업들의 현지 규제기관 교섭 지원	'11 ~	통해청·식약청
- KOTRA 의약품해외마케팅 센터 기능 확대	'11 ~	지경부
- 보건산업진흥원 수출 지원센터 기능 확대	'11 ~	복지부
- 바이오시밀러 수출협의회 설치 운영	'12월 ~	지경부
- 무역보험 무역금융지원 확대	'11 ~	지경부
- 바이오메디칼랜드, 신은펀드 활용 해외 우수업체 인수	'11 ~ '15	지경부
라. R&D 지원 전략		
- 원료·장비 국산화	'11 ~ '15	지경부
- 공통기반 기술 개발 및 시스템 구축	'11 ~ '15	지경부·복지부
- 바이오베터·신약 개발	'11 ~ '19	지경부·교과부·복지부
마. 법·제도 지원 기반 강화		
- 인허가 제도 개선을 통한 신속한 제품화 지원	'12 ~	식약청
- 바이오시밀러 기업 육성 인종	'11 ~	지경부
- 각국 허가기관과 중조 상호인종 제도 마련	'11 ~ '15	복지부·지경부·식약청·외교부

< 지식경제부 바이오시밀러 글로벌 수출 산업화 전략 (아시아경제 <http://stoo.asiae.co.kr/news/stview.htm?idxno=2010111810513552550>) >

□ 분자농업 분야

- 가장 환경 친화적이며 보다 안전한 바이오 의약품을 식물에서 찾고자 하는 여러 연구를 포함하는 분야를 현재에 분자 농업이라 지칭하고 있음. 이러한 분자 농업은 작물이 갖는 고유의 식량생산기능 농업을 산업화소재 생산 기능으로 개념을 전환할 수 있는 미래 성장 동력 기술로 평가되고 있음.
- 바이오 의약품의 생산은 생명공학 기술을 활용하여 주로 미생물 및 동물세포에서 만들어 치료제로 사용되어왔다. 그러나 지난 사스독감 백신 파동에서 알 수 있듯이 갑작스런 다수의 환자에게 접종이 필요할 때의 새로운 대안 시스템이 국가적으로 필요하게 됨
- 또한 미국 의료보험 체계에서 알 수 있듯이 국가적 의료비 부담 감소와 국민들의 의료보험 혜택을 위해서는 바이오시밀러(biosimilar) 의약품과 새로운 생산 시스템 개발이 대안으로 떠오르고 있음. 이러한 움직임 속에서 식물을 활용하거나 동물을 활용하여 바이오 의약품을 생산하고자하는 시도는 새로운 대안으로 떠오르고 있음.
- 분자농업의 연구영역은 크게 4가지의 주제(식물체 생산 항체, 식물체 생산 경구백신, 의약품단백질 생산, 산업용 효소 등 생산)가 주로 연구되고 있으며, 세계적으로는 현재 18개의 식물에서 만들어진 PMP(plant-made pharmaceuticals) 의약품(항체, 백신 및 치료용 단백질 등)이 시장에 진입하기 위해서 임상실험을 진행 중이며 또한 진단용 항체와 사이토카인을 활용한 화장품 소재 등의 11개 제품이 이미 시판이 되어 소비자의 곁에 다가와 있음.
- 국내의 연구 환경은 세계적인 추세로 보면 이제 초기 단계에 있으나, 식물생명공학을 주요한 기술로 시장에 접근한 예(갑상선자극 호르몬 수용체, 한탄과 푸말라 바이러스 항원)를 포함하여, 농촌진흥청에서 추진하고 있는 혈전용해제(t-PA)를 생산하는 담배, 알팔파, 벼와 기내에서도 대량생산 가능하도록 모상근을 이용하는 기술이 기초연구를 끝내고 생체 내 효능검정을 위한 단계에 와 있음. 또한 여러 식물 경구백신의 예는 동물실험에서 우수한 결과를 나타내고 있음.
- 국내의 분자농업 연구개발 현황은 상당히 초기 과정이지만 활발하게 진행되는 편임
 - 개별연구자 중심으로 개별과제 형태로 연구 진행 중, 주로 식물생산용 유전자 발현 시스템을 중심으로 상당히 상위 분야 위주로 진행
 - 식물생산의 유용단백질 정제 등을 비롯하여 세포프로그래밍 등의 기반 기술 분야는 매우 취약한 실정

- 최근 국내의 경우에도 의료용 단백질을 생성하여 분리 정제하거나 경구용으로 처방할 수 있도록 유용단백질이 생산 가능한 시스템을 확립하기 위한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있음
- 국내에서는 농림부, 교육과학부, 지식경제부 등 유관 부처에서 2000년 초반부터 연구지원 사업을 수행한 결과 국내에 분자농업관련 특허가 334건이 출원 또는 등록되었으며, 이중 19건은 산업화가 가능한 수준임
- 연구사례
 - 전북대학교 (주)엔비엠 연구팀이 양문식 교수 등과 함께 돼지 바이러스 설사병(Porcine Epidemic Diarrhea Virus), 돼지 흉막 폐렴균인 Actinobacillus pleuropneumoniae, cholera toxin B subunit, 돼지열 바이러스 등 다양한 항원단백질에 대한 식물 경구 백신 개발을 진행 중임
 - 농촌진흥청의 농업생명공학연구원 김종범 박사팀은 알팔파에 돼지열병바이러스에 대한 항체 단백질을 알팔파에서 생산
 - 단국대학교 황철호 교수팀이 돼지대장균 2종과 살모넬라균 1종의 치료 및 예방용 당근 백신을 개발
 - 그 외 한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터 김현순 박사 (B형간염 바이러스의 항원 단백질의 경구백신을 개발 중), (주)젠닥스의 정화지 박사팀은 (농성어류에 감염하는 노다바이러스의 식물 경구백신 개발 중) 등 다수의 연구 진행
 - 전주생물소재연구소 신윤지 박사 연구팀, 원광대학교 고기성 교수 및 경상대학교 이균오 교수 연구실에서는 식물 특이적 당패턴의 제거기술을 개발하고 있음
 - 포항공대 황인환 교수 연구실에서는 단백질 고발현 시스템과 고속적 시스템을 개발하면서 조류독감 백신을 연구 중에 있음
 - (주)엔비엠은 고가의 산업용 효소인 Enterokinase를 벼 세포배양 기술을 이용하여 대량생산에 성공하여 시판을 시작하여 국내 최초의 분자농업 산업화를 이루었음. 벼 세포배양을 이용하여 생산한 Enterokinase는 기존 제품과 비교하여 생산단가를 1/10로 절감할 수 있어 국제적인 경쟁력을 확보하고 있음
- 정책 및 제도 현황
 - 유전자변형농산물이 인체 및 환경에 미칠 수 있는 잠재적 위해성에 대한 우려로 국제적으로는 2000년 1월 캐나다 몬트리올에서 유전자변형생물체의 국가 간 이동에 있어서 환경 및 인체 안전성 확보를 목적으로 한 국제규범인 바이오안전성 의정서(Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity)가 채택되고 이에 따라서 지식경제부가 주관이 되어 2001년 3월

“유전자변형생물체의 국가간 이동등에 관한 법률”이 제정 공포되었으며,

바이오안전성 의정서는 2008년 4월 143개국 이 비준을 완료하였고

바이오안전성의정서에 근거한 지식경제부의 「유전자변형생물체의 국가간 이동등에 관한 법률」은 국내비준이 2007년 10월 3일 143번째로 비준서를 기탁하여 LMO 국내법은 2008년 1월 1일부터 그 효력이 발생하였음

- 농림수산물식품부는 생명공학작물의 생산 및 수입단계에서의 안전성 확보를 위하여 2002년 1월 9일 농림부고시 제2002-2호로 “유전자변형농산물의 환경위해성평가 심사지침”을 고시하고 농촌진흥청을 LMO 환경 안전성 심사 기관으로 지정하는 등 LMO 안전성 검정체계 구축을 본격적으로 추진하고 있음
- LMO법이 발효된 2008년 1월 1일부터는 「유전자변형생물체의 국가간 이동등에 관한 통합고시」에 근거하여 농업용, 임업용, 축산용에 대한 위해성 심사를 추진 중에 있음
- GM작물을 상업화하려면 환경과 인체 유해성 평가를 거친 후 농진청과 식품의약품안전청의 심사·승인을 받아 국립종자원에 품종등록을 하여야 하는 절차가 있으며, 2013년 2월 현재 국내에서는 GM작물이 상업화를 위해 승인된 예는 한건도 없음
- 또한, 분자농업 관련 산업화 경험이 전무하여 식품의약품안전청에서도 분자농업 산업화를 위한 임상허가 기준 등의 준비가 부족한 상태이고, 유전자원 보존을 위한 방법으로 식물의 경우 종자보관을 통하여 안정적으로 장시간 유전자원 보존이 가능한 식물의 장점이 있음에도 불구하고 MCB(master cell bank) 및 WCB(working cell bank)의 유지관리를 미생물 등의 사례에 준하여 전임상 및 임상기준을 제시하고 있는 현황임

약시공론 KOREA PHARMACEUTICAL ASSOCIATION NEWS

뉴스 | 미디어센터 | 칼럼·연재 | 약공 In People | 약공플러스 | 약시공론소개

약공TV 약사공론 지면PDF 약사공론 이벤트

식물유래 당단백질의약품 안전성 평가법 발간

평가원, “식물유래 의약품평가 시필요한정보 마련”

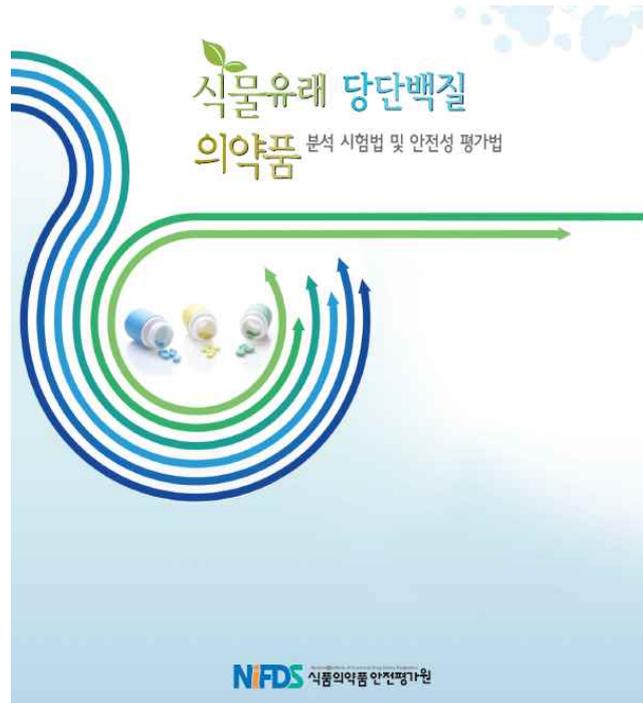
2011-01-21 09:29:04 [☑ 정해진 기자](#) [☞ 프린트](#) [- 글자작게](#) [+ 글자크게](#)

식물유래당단백질의약품의 당사슬 분석과 안전성 평가법을 담은 책자가 발간된다.

식약청 식품의약품안전평가원(원장 김승희)은 20일 바이오시밀러의 일종인 ‘식물유래 당단백질의약품’의 당사슬 분석 및 안전성 평가시험법’을 책자로 마련해 배포한다고 밝혔다.

< 식품의약품안전청의 분자농업 관련 가이드라인 >

- 그러나 국외의 분자농업의 산업화 사례 등의 영향으로 우리나라 식품의약품안전청에서도 2011년 ‘식물유래 당단백질의약품 분석시험법 및 안전성 평가법’을 확립하여 고시하는 등 분자농업 산업화를 위한 제반 규정 등을 제정하고 있음.



< 식품의약품안전청에서도 발간(2011년) ‘식물유래 당단백질의약품 분석시험법 및 안전성 평가법’

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

3-1 연구의 목표

- 본 과제는 지금까지 국내에 확보되어 있는 유용단백질 고생산 GM작물을 선정하여 실험실 수준에서의 생산성 검증이 아닌 **산업화 규모**로 대량 재배, 수확, 분리정제, 생화학적 특성 규명, QC 및 유통을 위한 포장과 저장성 확인에 이르는 전 생산 과정에 적용 할 최적의 SOP를 확립하여 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증을 통하여 국내의 분자농업 산업화 달성을 목표로 함.

3-2 연구결과

3-2-1. 분자농업 실증을 위한 시설장비 구축

- 연구수행기관 : (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- (1) 산업화 규모의 식물세포배양 및 분리정제 시설 구축

- ① 대용량 식물 세포배양기의 구축
- ② 산업화 수준의 대용량 단백질 분리정제 시설 장비의 구축

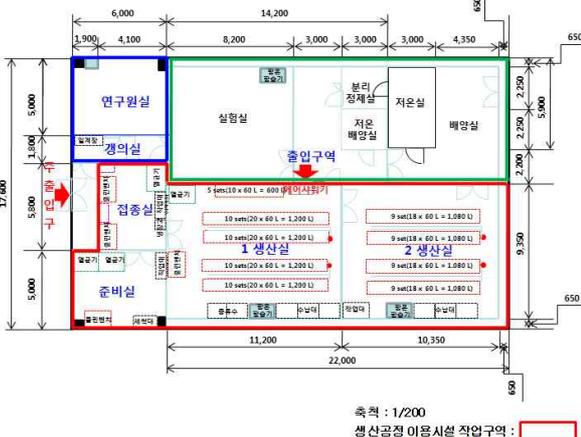
나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 본 과제는 “분자농업의 산업기반 모델구축 및 실증”사업으로서 분자농업 기술이 산업화가 가능한지의 여부를 확인하고자 기획된 과제임
- 본 연구를 통하여 개발된 유용단백질 고생산 식물세포주를 이용하여 산업화를 하기 위하여서는 유용단백질의 고생산 식물세포주 개발도 중요하나, 산업화를 위하여 개발된 유용세포주의 대량배양과 대용량 단백질 분리정제에 필요한 시설장비의 구축이 선행되어야 본 연구에서 개발된 결과물의 산업화 가능성을 확인 할 수 있음
- 상기와 같은 필요성으로 본 연구의 주관기관이자 산업화를 담당 하고 있는 (주)엔비엠이 분자농업 실증에 필요한 대용량 식물세포 배양시설 및 배양기의 구축, 대용량 단백질 분리정제 시설을 구축하고 본 연구에서 유용단백질 생산 세포주가 구축되기 전에 본 연구 주관기관인 (주)엔비엠이 기 개발하여 확보한 유용단백질 생산 세포주를 이용하여 시제품 생산에 적용하고, 이후 본 연구에서 다양한 유용단백질에 대한 고생산 식물세포주가 개발되었을 경우 산업화 가능성의 실증에 적용하고자 산업화 규모의 시설 장비를 구축하고 실증하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 결과

(1) 산업화 규모의 식물세포배양 및 분리정제 시설 구축

(가) 대용량 식물 세포배양 설비 및 배양기의 구축

구축 전 상황 (과제 수행 전)	구축 후 상황(과제 수행 중)
	
	
	 <p style="text-align: right;"> 축척 : 1/200 생산공정 이용시설 적영구역 : 일반구역 : </p>
<ul style="list-style-type: none"> ○ 배양실 면적: 3평 ○ 배양기 용량: 10L 배양기 30기 ○ 생산규모: 150 L/batch ○ 특징: 회분배양 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배양실 면적: 62평 ○ 배양기 용량: 80L 배양기 140기 ○ 생산규모: 11 ton/batch ○ 특징: 연속배양 시스템 - 최초 접종 후 1-2 주 간격으로 생산

(나) 산업화 수준의 대용량 단백질 분리정제 시설 장비의 구축

구 분	구축 전 상황 (과제 수행 전)	구축 후 상황(과제 수행 중)
저온시설 (저온챔버)		
컬럼		
농축장비		
분리정제 장비		
특징	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저온시설: 1,200L 챔버 ○ 컬럼: 5mL, 20 mL 컬럼 6종 ○ 처리용량: 100 mg/batch 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저온시설: 2실(10평, 3평) ○ 컬럼 <ul style="list-style-type: none"> - 최대 30L 컬럼 보유 - 산업용 스케일 컬럼 15기 보유 ○ 처리용량: 100 g/batch

3-2-2. 유용단백질 생산 GM 작물의 최적 재배조건 확립 및 다량생산

1. LED 기반 최적 발아 및 생육조건 확립

○ (연구수행기관: LED-농생명융합기술센터)

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- 유용단백질 고생산 GM작물 재배법 확립, 대량재배
 - 유용 단백질 고생산 생육시기, 재배 방법의 확립
 - GM작물의 광, 양액 조건 고생산 조건 확립
 - GMO 작물의 재배가 가능한 크린룸의 폐쇄형 식물공장을 설치하고, 다양한 작물의 최적재배기술을 확보

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

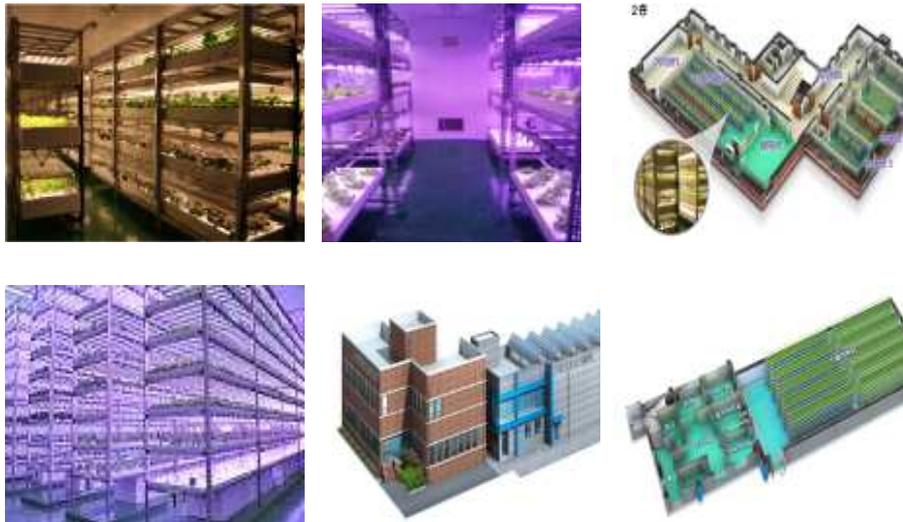
- 유용단백질 생산 GM 작물의 최적 재배조건 확립 및 다량생산을 위하여 LED 광조성, 배지재료 및 양액조건에 따른 작물의 발아율 및 생육을 비교하고 최적조건의 확립이 필요함

다. 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

- (1) 유용단백질 고생산 GM작물 재배법을 확립하기 위하여 본 과제의 참여기관인 (주)엔비엠에서 담배(*Nicotiana benthamiana*)를 분양받아 연구진행.
- (2) 담배는 생육 최저 온도가 15℃ 이상이므로, 20℃ 이상의 온도를 유지하여 육묘 진행.
- (3) 크린룸 수준의 폐쇄형 생산 시스템 확보 및 본 센터의 식물공장에서 연구 진행
 - (가) LED-농생명융합기술센터에서는 GM작물의 재배가 가능한 크린룸의 폐쇄형 식물공장을 설치하고, 다양한 작물의 최적재배기술을 확보하고 있음 (그림 322-1-1).
 - (나) 2013년 5월 준공된 미래산업형 LED 식물공장은 재배면적 200평 이상 8라인 X 8단으로 30,000주 이상의 작물이 정식 가능함 (국내 최대 규모).
 - (다) 현재 본 센터의 미래산업형 LED 식물공장은 1차 생산 작물로 청경채, 비타민채 등이 재배되고 있음.
 - ① 양액 공급 시스템은 NFT방식으로 각 라인별 운영이 가능하게 설계됨.
 - ② LED 조명 시스템은 통합 제어 수냉 시스템을 적용하여 에너지 효율 상승을 기대함.
 - ③ 냉·난방 시 식물공장 내부의 온도와 설정온도, 외기온도를 비교하여 열교환기를

가동함으로써 식물공장 내부의 온도 유지에 필요한 최소한의 에너지를 사용하도록 함.

- ④ 유용단백질 산업화 수준이 가능한 수준(100mg/batch)의 단백질을 생산 할 수 있는 크린룸 확보 및 제공 가능.



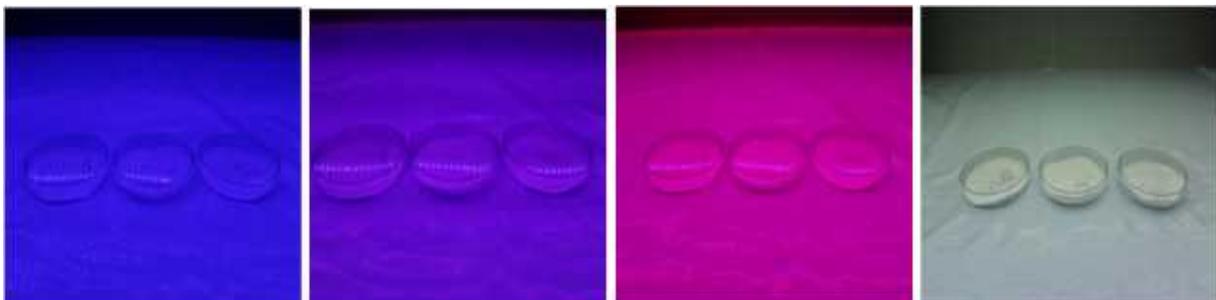
<그림 322-1-1. LED-농생명융합기술센터 LED기반 식물공장 >

라. 연구결과 및 고찰

(1) 담배의 발아율 비교 (germination test)

(가) LED 광조성에 따른 발아율 비교 (그림 322-1-2)

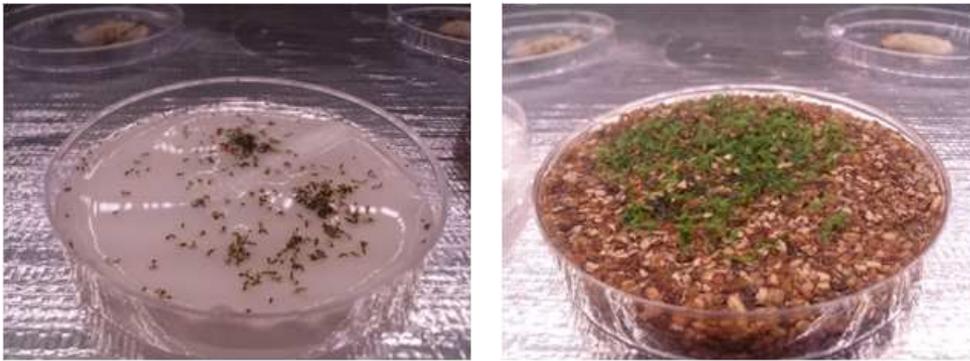
- ① LED의 광조성은 각각 Blue:Red=8:2, B:R=5:5, B:R=2:8과 형광등 처리구로 설정하였으며, 광량은 평균 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 동일함.
- ② 처리구별 약 100립/petri dish 3반복.
- ③ 처리구별 발아 특성 파악 결과 대부분 90% 이상 높은 발아율을 보임. 처리구간 통계적 유의차는 없음.
- ④ 광조성에 따른 발아율 차이는 없는 것으로 사료 됨.



< 그림 322-1-2 LED 광조성에 따른 발아율 비교 (B:R=8:2, B:R=5:5, B:R=2:8, 형광등 순)>

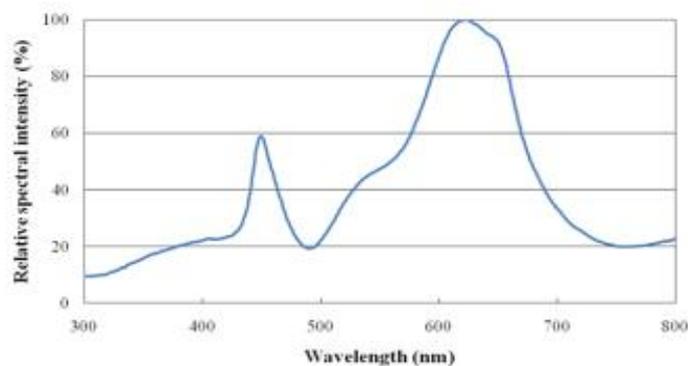
(나) 종자 발아용 배지 재료별 발아율 비교 (그림 322-1-3)

- ① 미립종자로 초기 발아와 관리가 중요하므로, 발아가 양호한 filter paper와 vermiculite를 배지 재료로 선정.
- ② filter paper는 종자의 발아율을 측정하는 paper로 높은 신뢰도의 재현성 있는 결과를 제공하는 것으로 알려짐. 종자의 성장에 영향을 줄 수 있는 어떠한 물질도 포함하지 않음. 세밀한 종자의 뿌리나 인공광 아래에서 관찰시 특히 종자의 관찰이 잘됨.
- ③ vermiculite는 모래의 1/15정도로 가볍고 통기성과 보수성이 우수하며 무균상태이므로 파종용 등의 상토로 많이 쓰임.
- ④ 처리구별 약 100립/petri dish 3반복 (재료별)



<그림 322-1-3. 배지 재료 filter paper(좌)와 vermiculite(우)의 발아.>

- ⑤ LED농생명 융합기술연구센터 시험 재배동에 설치된 Fluorescent light type의 LED로 광량은 평균 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 동일함 (그림 322-1-4).
- ⑥ 재료별 발아율 파악 결과 모두 90% 이상 높은 발아율을 보였으나, filter paper를 이용할 경우 수분조절 능력이 상대적으로 떨어져 발아된 종자가 썩는 경우가 발생함.
- ⑦ vermiculite로 발아 관리하는 것이 filter paper 보다 유리할 것으로 판단됨.
- ⑧ 실제 생산을 위한 발아는 plug tray을 이용하여 vermiculite를 채우고 대량으로 발아시키는 것이 유리할 것으로 판단됨.



< 그림 322-1-4. Fluorescent light type의 LED.>

(다) 배지 종류 별 담배 육묘 생육 비교 (그림 322-1-5)

- ① 배지 종류 별 발아 test를 통해 vermiculite에서 발아된 묘를 본엽 4매 전개 후 우레탄 스펀지와 vermiculite(plug tray)에 가식함.
- ② 시험재배동에 설치된 Fluorescent light type LED로 광량은 평균 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 동일함.
- ③ 배지 종류 별 담배 묘의 생존율 파악 결과 우레탄 배지에서 90% 이상 높은 생존율을 보였으며, vermiculite를 이용할 경우 수분관리에 어려움이 있어 생존율이 떨어지는 것으로 관찰됨.
- ④ 초기 발아는 vermiculite에서 진행하여 정식까지 육묘는 우레탄 배지에서 키우는 것이 유리할 것으로 판단됨.



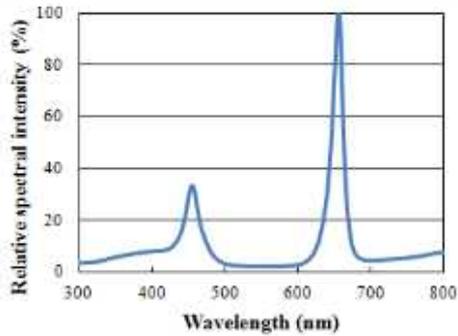
<그림 322-1-5. 배지 재료 우레탄 배지(좌)와 vermiculite(우)의 육묘.>

(라) 담배의 광조건과 양액 조건에 따른 생육 비교

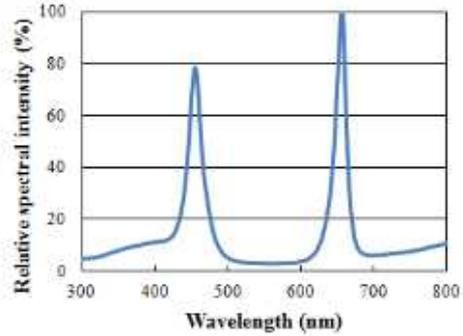
- ① 담배의 광조건과 양액 조건
 - ㉠ 환경조건은 온도 $25\pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $60\pm 5\%$ 로 유지되었음.
 - ㉡ 양액은 pH 변화가 적은 비료조성으로서 작물의 안정적인 생육을 위한 센터 개발 C양액 처리구와 양액 조건에 따른 생육 비교를 위해 관행의 일본원시 양액 처방.
 - ㉢ 두 양액 조건의 EC, pH, 수온은 $2.0\pm 0.2 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$, 6.0 ± 0.5 , $20\pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지됨.
 - ㉣ LED 광조건은 청색 450nm, 적색 660nm 혼합광을 이용함. 처리구별 광조건은 다음과 같음
 - ㉤ 따라서 5개 광처리와 2개 양액처리가 설정됨.
 - ㉥ 처리구별 담배의 생육 특성과 광합성률 등을 통해 추후 참여기관이 결과 활용 예정. 또한 이외 형질전환 담배를 본 센터는 수령 받아 결과 적용 예정.

< 표 322-1-1. 담배의 생육 비교를 위한 광 처리구 >

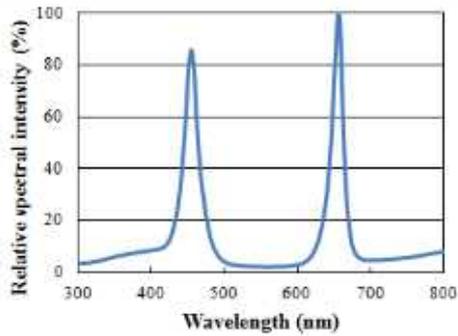
Treatment	BR Ratio (Blue:Red)	Intensity ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
A	25:75	150
B	50:50	150
C	50:50	200
D	25:75	200
E	fluorescent light	200



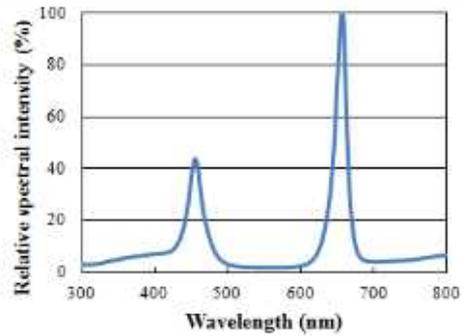
A : B:R=25:75 ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)



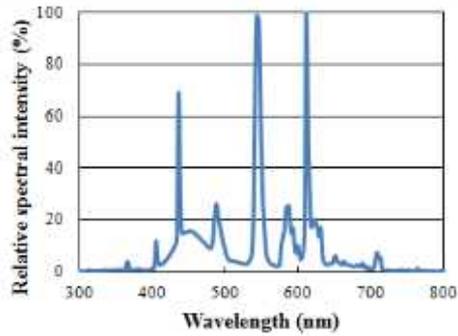
B : B:R=50:50 ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)



C : B:R=50:50 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)



D : B:R=25:75 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)



E : fluorescent light ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

< 그림 322-1-6. LED 광원별 파장 특성 >

② 담배의 광조건과 양액 조건에 따른 생육 비교 결과

- ㉠ 생육조사 결과 D 처리구 C 양액 조건에서 엽수, 엽면적, 생체중이 높게 나타남.
- ㉡ LED 처리구에 비해 형광등 처리구에서 엽수가 적으나, 상대적으로 잎의 크기가 큼.
- ㉢ 모든 처리구에서 C 양액이 일본원시 양액보다 엽면적, 생체중이 높게 나타남. 따라서 담배의 생육에 C 양액이 유리할 것으로 판단됨 (표 322-1-2, 그림 322-1-7, 322-1-8, 322-1-9).
- ㉣ 또한 LED농생명융합기술연구센터 시험재배동에 설치된 Fluorescent light type의 LED (광량:평균 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)하에서 동일 조건의 담배를 재배한 결과 부족한 광량으로 웃자람



A : B:R=25:75 ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)



B : B:R=50:50 ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)



C : B:R=50:50 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)



D : B:R=25:75 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

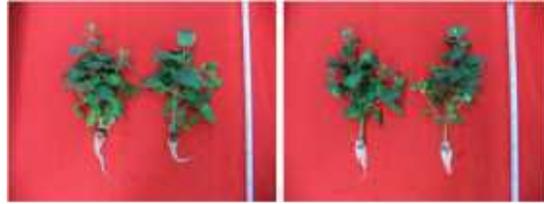


E : fluorescent light ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

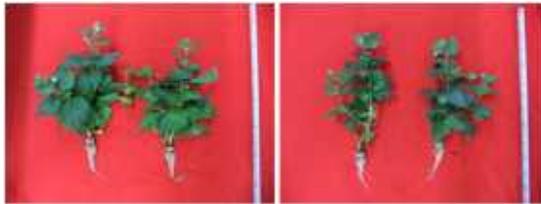
< 그림 322-1-7. 담배의 광조건과 양액 조건에 따른 재배 사진 >



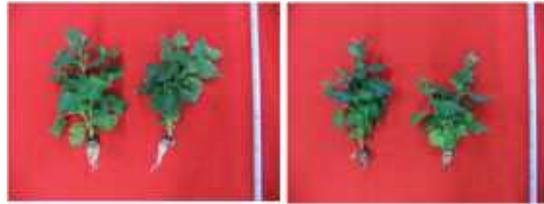
A : B:R=25:75 ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
left:C 양액, right:J 양액



B : B:R=50:50 ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
left:C 양액, right:J 양액



C : B:R=50:50 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
left:C 양액, right:J 양액



D : B:R=25:75 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
left:C 양액, right:J 양액



E : fluorescent light ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
left:C 양액, right:J 양액

< 그림 322-1-8. 담배의 광조건과 양액 조건에 따른 생육 >

< 표 322-1-2. 담배의 광조건과 양액 조건에 따른 생육 >

Treatment	No. of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf area (cm^2)	Fresh weight (g/plant)	ODD ^z	photosynthetic rate ($\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	
A	C	45ab ^y	9.4c	8.3b	957.4b	44.1abc	45.2b	5.1ab
	J	24e	11.5abc	<u>13.9a</u>	902b	29.6c	22.6d	4.5abc
B	C	36.3bcd	12.2ab	11ab	1213.6ab	47.8ab	37.4bc	3.6bcd
	J	28.3ed	11.1bc	10.3ab	717.6b	31.7bc	<u>60.7a</u>	3.3cd
C	C	39.3abc	11.8abc	9.6ab	1107.3ab	44.7ab	39.1b	3.6bcd
	J	30edc	11bc	9.3ab	752.1b	28.5c	47.9b	3.3cd
D	C	<u>49a</u>	11.6abc	10.1ab	<u>1514.7a</u>	<u>57.3a</u>	46.7b	4.9ab
	J	39.3abc	10.6bc	9.1ab	912.5b	37.1bc	45.1b	<u>5.3a</u>
E	C	27ed	<u>13.6a</u>	12.1ab	949.8b	38.4bc	24.3d	2.9cd
	J	24.3e	13.1ab	11.6ab	840b	35.7bc	26.5cd	2d

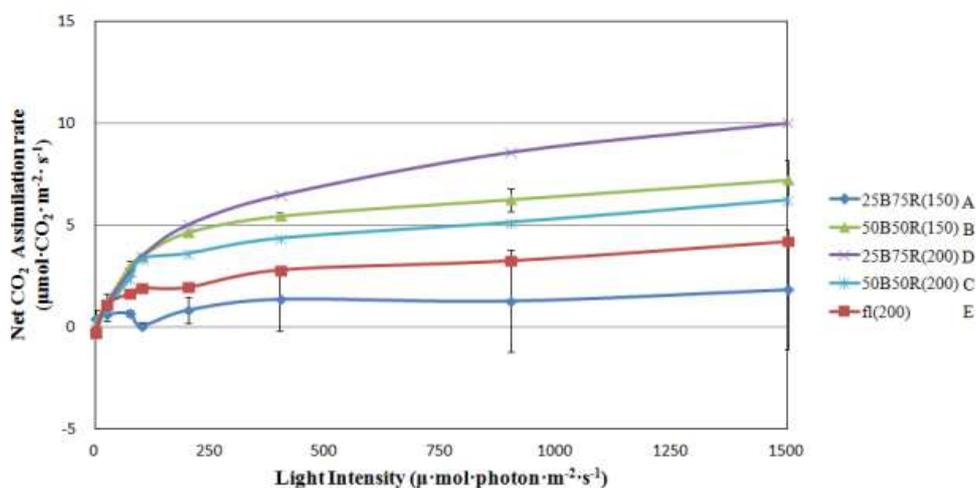
^zOptical density difference measured by a chlorophyll meter.

^ymeans with the same letter are not significantly different.



< 그림 322-1-9. 담배의 Fluorescent light type의 LED하에서의 재배 사진 >

- 처리구별 광합성률과 과포화점이 D 처리구에서 높게 나타난 것으로 보아 광이용효율이 높은 것으로 사료됨 (그림 322-1-10).
- LED에서 생육한 모든 처리구에서 광포화점이 형광등 보다 높게 나타났으나, A 처리구는 형광등보다 낮게 나타남.
- 광반응 곡선에서 광량과 광합성율이 비례하는 구간의 기울기는 광량자당 탄소 고정율, 광합성기구의 광이용효율을 나타냄. 에너지효율 등을 고려할 때 200~400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광량이 필요한 것으로 판단됨.
- 광도가 높을수록 광합성율은 증가하지만 담배의 광합성이 완만해지는 최소 약 230 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광원이 가장 효율적일 것으로 판단됨.
- 따라서, 향후 식물공장 대량으로 담배 재배시 C 양액과 B:R=25:75의 비율로 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광도가 유리할 것으로 판단됨.
- 더욱 명확한 결과를 위해서는 유용 단백질 생산에 유리한 담배 재배를 위한 광, 양액 등의 연구가 더 필요함.



< 그림 322-1-10. 담배의 광조건과 양액 조건에 따른 광합성율 >

2. LED 기반 밀폐형 LMO 식물공장 실증재배 및 성장 특성 분석

○ (연구수행기관: LED-농생명융합기술센터)

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- 유용단백질 고생산 GM작물 재배법 확립, 대량재배
 - 유용단백질 고생산 생육시기, 재배 방법의 확립
 - GM작물의 광, 양액 조건 고생산 조건 확립
 - GMO작물의 재배가 가능한 크린룸의 폐쇄형 식물공장을 설치하고, 다양한 작물의 최적재배기술을 확보

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- GM작물 대량 생산법 확립을 위하여 광주기별 담배의 성장특성을 분석하고 이를 기반으로 GM작물 대량 생산을 위한 밀폐형 LMO 식물공장 실증재배를 목적으로 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

(1) 광주기별 담배의 성장특성 분석

(가) 품종은 NBM에서 분양 받은 담배(*Nicotiana benthamiana*)종자를 사용하였고 생육조건은 institutional repository of the University of Amsterdam

<http://hdl.handle.net/11245/1.378174> “The use of Agro infiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves“을 참고하여 진행하였음

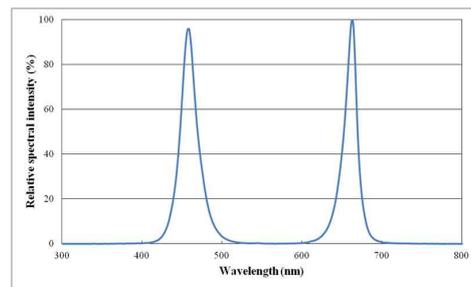
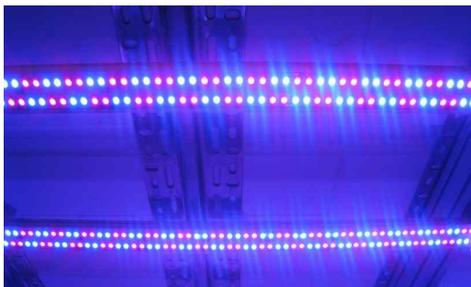
- ① 광원 : Red(660nm)+Blue(450nm) 혼합 LED <R:B=5:5> $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
- ② 광주기(명기/암기) : 12/12 h, 10/14 h
- ③ 환경조건 : 온도 20°C, 습도 60%
- ④ 배양액 : 전복대 양액, $2.0 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$, pH 6.5
- ⑤ 1차년도 선행 연구결과 기존 수경재배 양액보다 전복대 양액 조성이 전반적인 생육이 다른 양액조성에 비해 양호하여 전복대 양액 조성으로 실험을 진행함

< 표 322-2-1. 담배의 생육 비교를 위한 광 처리조건 >

Treatment	BR Ratio (Blue:Red)	photoperiod	Intensity ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
A	50:50	12/12	150
B	50:50	10/14	150

< 표 322-2-2. 담배 수경재배 배양액 조성표 >

Nutrient elements		Contents (g/T)
Macro element		
A	KNO ₃	380
	5[Ca(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O]NH ₄ NO ₃	720
	Fe-EDTA	15
	KNO ₃	380
	MgSO ₄ · H ₂ O	360
	KH ₂ PO ₄	240
Micro element		
B	H ₃ BO ₃	2.86
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.13
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.09
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25



< 그림 322-2-1. 담배의 생육 비교를 위한 광처리구의 분광 특성 >



< 그림 322-2-2. 광주기별 처리구와 담배 정식 사진 >

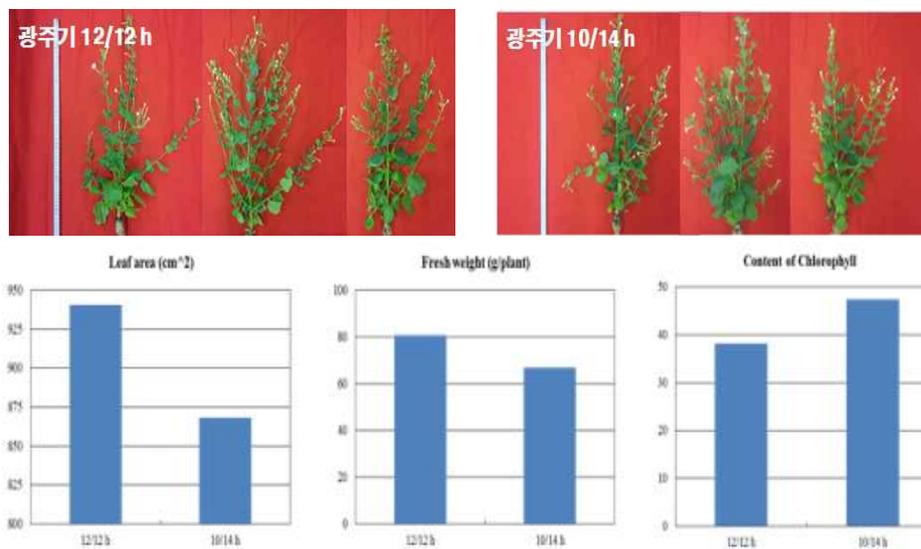
라. 연구결과 및 고찰

(1) 담배의 광주기 조건에 따른 생육 비교 결과

(가) 처리구 조건(12/12)에서 엽수, 엽면적, 생체중이 높게 나타나 유용단백질 생산을 위한 *N. benthamiana*의 재배는 12/12 광주기 로 생산하는 것이 효율적이라 판단됨 (그림 322-2-3)

(나) 1차년도 양액별 생육 비교 실험결과 에서도 확인했듯이 다른 양액조성보다 전북대양액이 일본원시 양액보다 엽면적, 생체중이 높게 나타남. 따라서 담배의 생육에 C 양액이 유리 할 것으로 판단됨

(다) 추대가 되지 않도록 광량과 온도 등에 대한 추가적인 실험이 필요함



< 그림 322-2-3. 광주기별 처리구에 따른 담배생육(정식 60일 후) >

(2) 형질전환대상 작물 실증재배 기술 개발

(가) 연구개발 수행내용

① GM작물 대량생산을 위한 실증재배(파종 및 발아)

㉠ vermiculite를 배지 재료로 선정하여 가로×세로 (20×30cm) 플라스틱 용기에 약 10,000립 파종

㉡ 파종 후 약 3일 뒤 지상부가 출현하고 5일 후에 잎의 넓이가 넓어지기 시작함

㉢ 1차년도 결과 vermiculite배지를 사용하는 것이 우레탄 배지로 이식할 때 보다 작업이 편리함

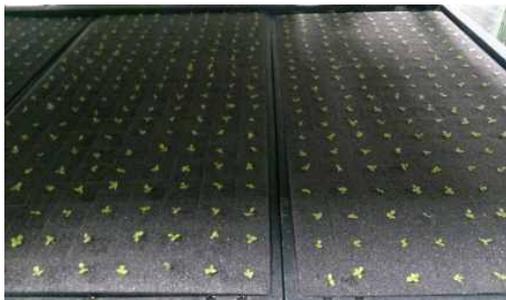
㉣ 파종 후 담배 묘가 자랐을 때 물에 담그면 vermiculite가 쉽게 떨어져서 작업이 편리하고 유리함



< 그림 322-2-4. 파종 직후 와 파종 9일 후(좌)와 파종 14일 후(우) *Nicotiana benthamiana* >

② 수경재배를 위한 우레탄 배지 이식

- ㉠ 파종 20일 후 지상부 엽과 지하부 뿌리가 약 3cm 이상 자랐을 때 우레탄배지로 이식
- ㉡ 이식 과정에서 담배 유묘와 vermiculite를 물이 담긴 작은 용기에 담가 vermiculite를 제거함
- ㉢ 우레탄에 뿌리가 상하지 않도록 이식
- ㉣ 이식된 배지는 육묘기에 이동하여 관리(201구×12 = 2,520주)
- 광원 : Red(660nm)+Blue(450nm) 혼합 LED <R:B=5:5> $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 관리함
- 광주기(명기/암기) : 12/12 h 로 설정하였음
- 환경조건 온도 20℃, 습도 60% 로 공조 설비를 통해 유지하였음
- 배양액은 전복대 양액으로 하였으며 전기전도도(EC) $1.0 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$, pH 6.5로 관리하였음



< 그림 322-2-5. 이식 후 담배 묘 우레탄 배지 이식 과정과 이식 후 육묘기를 활용한 관리>

③ 수경재배 베드 정식

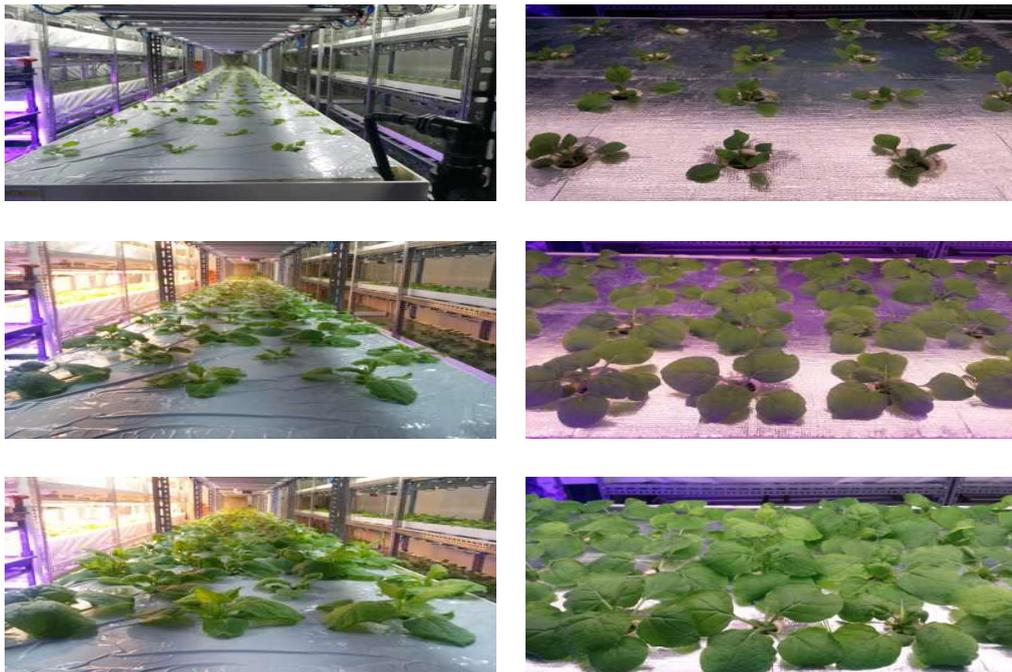
- ㉠ 이식 약 20일 경과 후 뿌리가 배지 밖으로 나왔을 때 정식
- ㉡ 수경재배 담액경 방식으로 진행하였으며 배양액은 전복대양액을 사용하였으며 전기전도도(EC) $2.0 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$, pH 6.5로 관리하였음
- ㉢ 전복대 익산캠퍼스 LED-농생명 융합기술연구센터 2층 실험생산동 1,600주 정식
- ㉣ 5일 간격으로 생육상태 확인 및 생육조사를 실시하여 대량 생산시 생육 주기 및 생산량 등을 예측함
 - 정식 후 5일 후부터 엽면적이 넓어지기 시작함
 - 정식 10일 후 에는 엽면적이 급격히 증가하고 엽수 또한 늘어남

- 전반적으로 양호 한 생육을 보이며 대량생산의 가능성이 높아 보임
- 생산에 대한 전반적인 사이클을 거쳐 계획생산과 생산량의 예측이 가능해짐
- 파종→발아묘(15일), 발아묘→우레탄 이식 전 (20일), 이식 후→정식 (15일), 정식 후(10일) 총 60일 가량 생육 사이클이 필요할 것으로 사료됨(생육조건과 작물 상태에 따라 5일 가량 가감될 수 있음)
- 안정적이고 균일한 생육을 위한 발아묘 지하부가 약 2cm정도 자랄 때 까지 생육을 시켰음(뿌리가 약하거나 작을 경우 우레탄으로 이식했을 때 생존율이 낮음)
- 또한 우레탄 배지에 바로 파종 했을 경우에는 종자가 미립종자라 작업에 어려움이 많으며 수분관리가 힘들어 발아율이 현저히 떨어짐 (1차년도 확인 결과)
- 추후 형질전환 담배 재배를 통하여 실제 단백질 생산량 등을 측정할 예정

< 표 322-2-3. 담배의 정식 일자 별 생육 >

Growth days	No.of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g/plant)	ODD ^z
5	6.3	5.2	1.6	102	15.3	37.2
10	7.5	10.2	8.7	508.3	25.7	38.3
15	9.2	11.5	9.8	557.2	31.2	36.5

^zOptical density difference measured by a chlorophyll meter.



< 그림 322-2-6. 정식 직 후(상), 정식 9일 후(중), 정식 13일 후(하) >



<정식 후 5일>

<정식 후 10일>

<정식 후 15일>

< 그림 322-2-7. 정식 일자 별 *Nicotiana benthamiana* 생육 >

④ 형질전환 재료 협동기관 제공

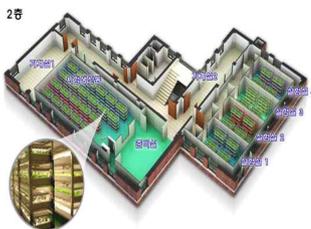
- ㉞ 전북대학교 및 NBM에 담배 묘 400여주 제공
- ㉞ 실험재료와 재배용으로 제공
- 주기적인 파종과 생산으로 실험재료 제공



< 그림 322-2-8. 전북대와 NBM에 제공 된 담배 묘와 담배 식물체 >

⑤ LMO 연구시설 등록

- ㉞ 형질전환 식물체 생산과 연구를 위한 LMO 연구시설 인가
- ㉞ 담액경과 분무경 등 다양한 재배방식이 가능한 격리 재배시설 전북대학교 익산캠퍼스 LED-농생명 융합기술연구센터 2층 실험 생산동(394.76m²)
- 클린룸 수준의 재배시설과 온·습도, 이산화탄소 농도 조절, 광주기, 광량, 광질(광파장)조절까지 가능한 LMO 생산 최적화 시설임
- 향후 LMO를 통한 유용단백질 생산 등의 활용가치가 높을 것으로 기대됨



< 그림 322-2-9. LED-농생명 융합기술연구센터 LMO 연구시설 >



< 그림 322-2-12.형질전환 담배종자의 대량재배 현황 >

3. LED 기반 밀폐형 LMO 식물공장을 이용한 대량재배 조건 확립

○ (연구수행기관: LED-농생명융합기술센터)

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- 유용단백질 고생산 GM작물 재배법 확립, 대량재배
 - 유용단백질 고생산 생육시기, 재배 방법의 확립
 - GM작물의 광, 양액 조건 고생산 조건 확립
 - GMO 작물의 재배가 가능한 크린룸의 폐쇄형 식물공장을 설치하고, 다양한 작물의 최적재배기술을 확보

나. 세부연구의 수행목적(필요성)

- GMO 작물의 상업화 이후 농업생산 증대 및 농가소득 향상 등의 긍정적 효과가 나타나면서 전 세계 GMO 작물의 재배는 꾸준히 증가 추세임.
- GMO 작물의 재배가 증가하고 교역이 활발해짐에 따라 인체에 대한 잠재적 위해와 환경위해에 관한 우려도 커지고 있음.
- 용도에 따라 GMO 작물의 재배가 이루어져야하며, 더 철저한 모니터링이 필요함.

- 우리나라에서는 GMO, LMO, 유전자변형 작물 등의 개념이 혼용되어 사용되고 있음.
- LMO(Living Modified Organisms) : LMO법에 따르면 ‘생명공학기술을 이용하여 얻어진 새로운 유전물질의 조합을 포함하고 있는 모든 살아있는 생물체’를 의미.
- 유전자변형(GM)작물 : 유전자변형생물체를 포함하거나 유전자변형생물체에서 유래한 원료를 사용한 식품과 시료를 각각 유전자변형(GM)이라 함.
- 유전자변형제품의 개발, 생산 등에 관한 사항은 ‘유전자변형생물체간의 국가 간 이동 등에 관한 법률(LMO법)’에서 관리됨.
- 유전자변형 생물체(LMO)의 개발, 생산 등의 안전성 확보를 위한 기본 대상은 밀폐 조건에서 시험·연구용으로 이용되어야 함.

다. 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

(1) LMO 연구시설 인프라 구축 및 운영

(가) 시험·연구용 LMO 작물 생산 안전관리를 위한 모니터링, 운영 및 실험용 격리 포장에 대한 사전·사후 주기적인 점검 실시.

(2) LMO 연구시설 작물 성장 환경 제어

(가) 작물의 성장 환경은 크게 지상부 환경과 지하부 환경으로 구분됨. 지상부 환경에는 온도, 상대습도, CO₂, LED 광 등이 해당하며, 양액의 EC, pH, 관수, 수온 등은 지하부 환경에 해당함. 이러한 주요 환경의 효율적인 제어가 가능한 완전폐쇄형 시스템으로 LMO 작물 생산 최적화 시설.

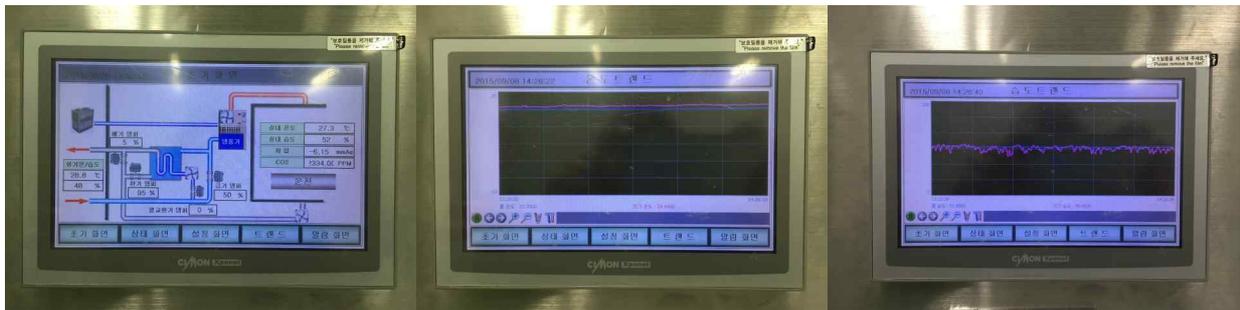
(나) 작물의 지상부 환경을 취합하여 모니터링하고, 제어하기 위한 다양한 제어시스템들을 IT기술을 이용하여 융합된 하나의 시스템을 이용하여 밀폐된 환경에서 LMO 작물의 성장 환경을 모니터링하고 제어함.

(다) 본 LMO 연구시설에 설치된 환경제어기는 온도와 상대습도를 내부 듀얼 PID컨트롤 프로그램에 의하여 유닛쿨러의 히터, 냉방기 및 가습기를 제어하며 사용자가 설정해놓은 시간대별 프로그램에 따라 온도와 상대습도를 제어함. 또한, 사용자가 설정한 명기와 암기의 시간에 따라 제어 할 수 있음.

(라) 추후, 환경제어기가 제공하는 Ethernet 통신 포트를 통하여 현재 제어되는 온도 및 상대습도 정보 등과 사용자 설정 프로그램 등을 통합 환경 제어 모니터링 시스템과 연동하여 원격 제어 및 모니터링이 가능함.



< 그림 322-3-1. LMO 연구시설 >



< 그림 322-3-2. 완전폐쇄형 LMO 연구시설 LED 식물공장의 환경제어기 운전화면 >

(마) LMO 연구시설 양액 제조 시스템

- ① 양액 조성 시스템은 LMO 작물에 맞는 양액을 조성하기 위한 A제 및 B제의 원액을 담고 있는 원액통으로부터 실제 LMO 작물에 공급할 양에 맞게 원액과 원수를 적정 EC 및 pH를 알맞게 조성하여 양액의 혼합 탱크에 저수하는 시스템을 말함.
- ② 양액 조성 시스템은 환경제어기와는 독립적으로 작동되고, 사용자의 명령에 의하여 원액 탱크의 A제와 B제를 원수와 혼합하게 되며, 자체 제어기에 의해 EC, pH 센서의 정보에 대하여 혼합 유량 설정시스템의 밸브 개폐시기를 조절하여 양액혼합탱크가 가득찰 때까지 운용되게 되며, 이 후, 원수 없이 지속적인 순환을 하면서, 양액혼합탱크의 EC와 pH를 사용자 설정치에 맞춤. 사용자의 순환탱크 급수명령에 대하여 순환탱크의 유량계(수위센서)를 주시하며 급수함.
- ③ 양액의 온도제어는 냉각기를 순환탱크에 설치하고, 자체 온도제어기에 의하여 설정 온도를 유지함.



< 그림 322-3-3. 완전폐쇄형 LMO 연구시설 LED 식물공장의 양액 조성 시스템 >

- ④ 양액 EC와 pH를 모니터링하고자 휴대용 EC 및 pH 측정기(WM-32EP, TOADKK)를 이용함.



< 그림 322-3-4 EC 및 pH 측정기 >

(3) LMO 연구시설 양액 분석

(가) 양액 EC와 pH 값 외에도 정식 후 27일 동안 양액을 샘플링 하여 무기물분석 (음이온, 양이온)을 실시함

(나) 양액은 50ml tube에 샘플링 하여 전남대학교 여수 캠퍼스 공동 실험실습관에 의뢰하여 양액내음이온(Chloride(Cl⁻),Nitrite(NO₂⁻),Bromide(Br⁻),Nitrate(NO₃⁻),Phosphate(PO₄³⁻) Sulfate(SO₄²⁻)과 양이온(Sodium Na⁺, Ammonium NH₄⁺, potassium K⁺, Magnesium Mg²⁺,Calcium Ca²⁺)을 분석하였음.

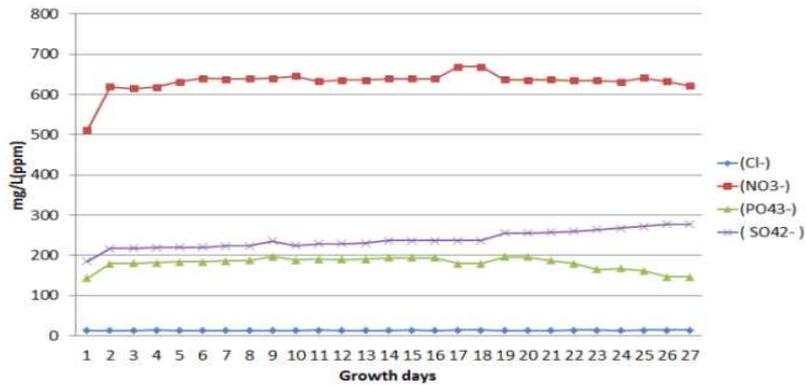
(다) 음이온 분석 조건은 아래와 같이 진행하였음

- ① Model : DX-600 IC system Dionex Co., USA
- ② Column :IonPac AS14 Analytical, 4×250mm 3
 - Guard : IonPac AG14 Guard, 4×50mm
 - ELUENT : 3.5mM Sodium carbonate, 1mM Sodium bicarbonate
 - Flow rate : 1.2 mL/min
 - Inj.Volume : 20μl
 - Detection : ED50 Conductivity

라. 연구결과 및 고찰

(1) 양액의 음이온 분석결과

- (가) 양액 음이온 분석 결과 이온들이 비교적 일정하게 유지 되는 것을 확인 할 수 있었음
- (나) 양액 이온분석 결과와 형질전환 작물의 지상부 생육이 양호 한 것으로 보아 양액의 조성과 양액관리측면에서 문제점은 없는 것으로 사료됨



< 그림 322-3-5. 생육기간별 양액 음이온 변화 >

분석결과서
 CCRF
 Chosun National University Center for Network Facility
 http://ccrf.chosun.ac.kr

주 소 551-740 전남 여수시 대학로 50 (중학동) TEL(061) 659-6880 FAX(061) 659-6899
 접수 번호 2015-0259 접수 일자 2015년 8월 5일
 분석의뢰자 남민우 선생님 기 관 명 전라남도 LED-농생명기술연구센터
 E-mail nminu@krci.ac.kr 전 화 번호 010-3609-3159
 이 용 기 기 이온크로마토그래피 시 료 명 양액

분석결과

1. The anion contents of samples
(Unit : ppm)

Composition	ANION(음이온)						
	Fluoride (F ⁻)	Chloride (Cl ⁻)	Nitrate (NO3 ⁻)	Bromide (Br ⁻)	Nitrite (NO2 ⁻)	Phosphate (PO4 ⁻³)	Sulfate (SO4 ⁻²)
1		13.1891	611.898	1.42.5594	184.6941		
2		13.275	619.5007	1.79.9943	216.6197		
3		13.3898	614.7163	1.60.9213	218.0602		
4		13.5699	618.6776	1.61.8204	218.2245		
5		13.4135	631.7719	1.62.4586	220.3909		
6		13.3929	640.9429	1.62.8963	220.624		
7		13.4935	636.4475	1.65.9758	222.11		
8		13.4501	639.5609	1.67.2572	223.2328		
9		13.6599	640.7265	1.67.4445	226.1995		
10		13.4796	646.1554	1.68.3713	225.2325		

11	13.5758	639.1367	1.60.0297	228.4463
12	13.6473	636.4482	1.68.7521	228.1218
13	13.4554	635.7318	1.61.9333	230.4184
14	13.4257	638.6742	1.62.3599	236.9294
15	13.8565	639.3977	1.64.3858	237.8462
16	13.5075	639.2819	1.63.4972	236.8625
17	13.7985	649.3271	1.78.9416	296.4035
18	17.6754	845.7808	154.4748	636.7135
19	13.449	636.7949	1.66.6313	255.1554
20	13.5	636.2879	1.66.8286	255.3968
21	13.536	636.7861	1.67.0614	257.6585
22	13.6929	635.0475	1.79.1242	268.566
23	13.6141	635.1065	1.64.9197	264.8061
24	13.5566	631.4659	1.67.2381	267.6371
25	13.6856	642.1196	1.61.5561	272.1627
26	13.8629	632.4278	1.46.1989	277.7444
27	13.891	652.1379	1.46.4197	277.7379

N. D. = Not detected

- ◆ 농도 : 시험 및 분석용
- ◆ 비고 : 1. 이 분석결과는 의뢰자가 제공한 시료에 대한 분석결과입니다.
 2. 본 분석결과를 용도 이외의 안전, 광고, 소송 등 법적 요건으로 사용할 수 없습니다.
- ◆ 분석연구원 : 이세라(iseera@nabz.com)

전남대학교 공동실험실습관장

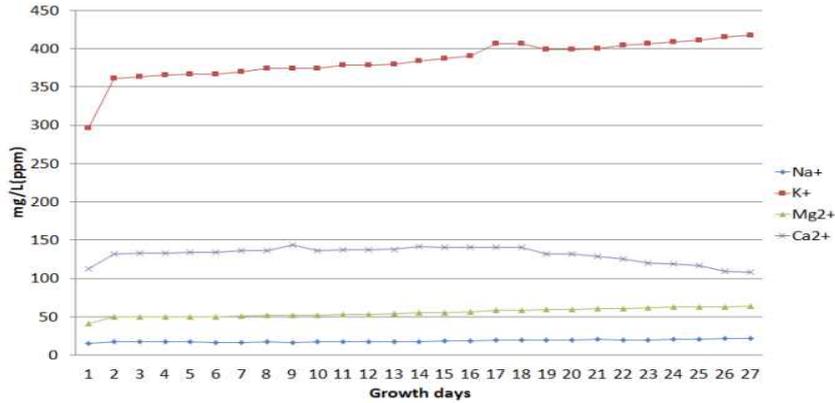
< 그림 322-3-6. 양액 음이온 분석 결과서 >

(2) 양이온 분석 결과

(가) 양이온 분석조건

- ① Model : DX-600 IC system Dionex Co., USA
- ② Column : Ion Pac CS12 Analytical, 4×250mm
 - Guard : IonPac CG12 Guard, 4×50mm
 - ELUENT : 20mM H2SO4
 - Flow rate : 1.0 mL/min

- Inj.Volume : 20 uL
- Detection : ED50 Conductivity



< 그림 322-3-7. 생육기간별 양액 양이온 변화 >

분석결과서
 전남대학교 공동실험실습관장
 Chonnam National University
 Center for Research Facilities
 TEL(061) 859-8689 FAX(061) 859-8686
 http://crrf.chonnam.ac.kr

유 550-749 전남 여주시 태학로 8D (본덕동) TEL(031) 859-8689 FAX(031) 859-8686
 접수 번호 2015-0298호 접수 일자 2015년 9월 5일
 분석의뢰자 남만우 선생님 기 관 명 서울대학교 LED농업기술개발사업(농업)센터
 E-mail nju2002@knu.ac.kr 전화 번호 010-3889-3159
 이 용 기 기 이온크로마토그래피 시 료 명 양액

분석결과

I. The cation contents of samples (Unit : mg/L)

Sample	Composition	CATIONS(양이온)				
		Sodium Na ⁺	Ammonium NH ₄ ⁺	potassium K ⁺	Magnesium Mg ²⁺	Calcium Ca ²⁺
1		14,7261	1,5497	236,3796	41,6321	112,5316
2		17,1549	5,5628	361,7637	49,5328	124,4993
3		16,9737	5,1475	369,0543	49,7451	133,0751
4		17,0831	4,6447	365,1977	49,92	133,5607
5		17,3698	3,385	366,2982	50,2188	134,2003
6		16,2524	3,5647	366,1616	50,2231	134,4455
7		16,7084	2,0269	370,4125	50,957	135,8857
8		17,2586	N. D.	374,2451	51,6298	136,7606
9		16,7921	N. D.	373,9029	52,3049	143,9092
10		17,1717	N. D.	373,9137	51,8864	136,7887
11		17,6011	N. D.	378,796	53,2914	137,7521
12		17,682	N. D.	377,9934	53,1973	137,8978
13		17,5068	N. D.	379,1321	53,7219	137,9315

14	17,729	N. D.	384,4667	54,7633	141,5079
15	18,3917	N. D.	387,3948	55,5816	140,1261
16	18,3365	N. D.	390,4636	56,3753	140,846
17	18,1887	N. D.	407,1384	58,7442	202,8459
18	22,5688	0,2196	501,3404	72,4022	363,7483
19	19,3305	N. D.	398,3638	59,1758	132,1807
20	18,5231	N. D.	399,5738	59,6776	131,6711
21	20,2414	N. D.	400,3214	60,127	128,5907
22	20,0565	N. D.	404,7604	60,7939	125,3981
23	19,9978	N. D.	407,033	61,5786	119,7377
24	21,0861	N. D.	408,5806	62,2588	118,8462
25	20,8695	N. D.	411,1873	62,741	115,3988
26	21,7041	N. D.	415,6362	63,2714	109,8299

◆ 품목 : 시험 및 분석용
 ◆ 비고
 1. 이 분석결과는 의뢰자가 제공한 시료에 의한 분석결과입니다.
 2. 본 분석결과를 품도 이외의 신청, 광고, 소송 등 법적 요건으로 사용할 수 없습니다.
 ◆ 분석연구원 : 이재래(ir.poo@nate.com)

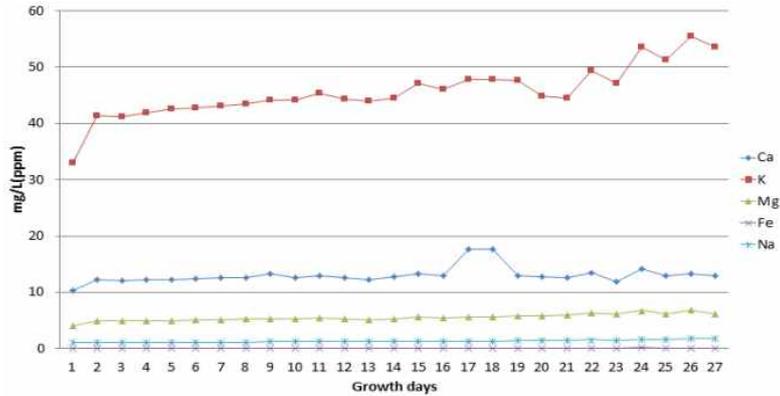
2015. 9. 18
 전남대학교 공동실험실습관장

< 그림 322-3-8. 양액 양이온 분석 결과서 >

- (나) 양액 양이온 분석 결과 음이온 분석결과와 유사하게 이온들이 비교적 일정하게 유지 되는 것을 확인 할 수 있었음
 - (다) 양액 이온분석 결과와 형질전환 작물의 지상부 생육이 양호 한 것으로 보아 양액의 조성과 양액관리측면에서 문제점은 없는 것으로 사료됨
 - (라) 양액 내 무기물 함량의 변화를 관찰하기 위해 ICP_OES(이온플라즈마 질량분석기)를 통하여 분석을 실시함
- (3) 무기물 분석 결과
 (가)무기물 분석 조건은 아래와 같이 진행하였음
 ① Instrument : ICP-OES/PerkinElmer/USA

② Plasma Unit : RF Power 1.4(Kw)

(나) 양액 내 K 함량이 소폭으로 늘어 난 것으로 분석되었으나 생육기간이 진행되면서 양액 속의 물을 먼저 흡수하는 식물체의 특성으로 인한 것으로 사료됨



< 그림 322-3-9. 생육기간별 양액 무기물 변화 >

분석결과서
 전남대학교 공동실험실운영부
 CCRF
 전남대학교 공동실험실운영부
 http://ccrf.chonnam.ac.kr

주: 550-149 전남 여수시 내막면 50(문암동) TEL(061) 859-6880 FAX(061) 859-6889
 접수 번호 2015-0412호 접수 일자 2015년 9월 7일
 분석의뢰자 남민우 선생님 기관 명 전남대학교
 E-mail mjn2002@jcu.ac.kr 전화 번호 010-3689-3159
 이용 기기 ICP-OES 시료 명 양액

14	12.93	44.58	5.33	0.12	1.24
15	13.23	47.04	5.59	0.12	1.34
16	12.88	46.12	5.52	0.12	1.30
17	17.59	47.85	5.55	0.12	1.34
18	34.50	52.91	5.97	0.15	1.72
19	12.97	47.50	5.78	0.12	1.40
20	12.72	44.93	5.80	0.12	1.40
21	12.55	44.43	5.89	0.12	1.40
22	13.39	49.33	6.24	0.12	1.52
23	11.97	47.10	5.14	0.12	1.48
24	14.15	53.64	6.75	0.13	1.65
25	13.01	51.28	6.14	0.12	1.50
26	13.29	55.52	6.89	0.12	1.75
27	12.89	53.49	6.15	0.11	1.73

분석결과
 Quantitative Analysis of Ca, K, Mg, Fe, Na in samples

1) Instrument and Analysis conditions
 (1) Instrument ICP-OES(Parkinson/USA)
 (2) Plasma Unit RF Power 1.4(Kw)
 Gas Flow Rate (L/min) 15
 (3) Wavelength Ca 387.930 Fe 248.180
 K 766.490 Mg 285.213
 Na 889.552

- ◆ 용도 : 시험 및 분석용
- ◆ 비고
 1. 이 분석결과는 의미가가 제공한 시료에 대한 분석결과입니다.
 2. 본 분석결과를 용도 이외의 안전, 환경, 소송 등 법적 요건으로 사용할 수 없습니다.
- ◆ 분석연구원 : 김효원(maryy@ccrf.chonnam.ac.kr)

2. The minerals content of Ca, K, Mg, Fe, Na in samples (Unit: mg/100g)

Sample	Element	Ca	K	Mg	Fe	Na
1		10.94	32.06	4.00	0.09	1.05
2		12.24	41.40	4.92	0.12	1.10
3		12.10	41.19	4.92	0.12	1.11
4		12.20	41.82	4.96	0.12	1.12
5		12.30	42.59	5.00	0.12	1.12
6		12.44	42.72	5.02	0.12	1.14
7		12.53	43.07	5.11	0.12	1.14
8		12.53	43.49	5.19	0.12	1.15
9		13.35	44.07	5.24	0.12	1.18
10		12.64	44.15	5.21	0.12	1.19
11		13.01	45.42	5.41	0.12	1.25
12		12.51	44.33	5.21	0.12	1.22
13		12.20	43.94	5.17	0.12	1.21

2015. 9. 12
 전남대학교 공동실험실운영부

< 그림 322-3-10. 양액 무기물 분석 결과서 >

- (4) LMO 연구시설 인공광원 LED 조명 개발
- (가) 본 LMO 연구시설에 설치된 인공광원으로 LED 조명은 다단식 재배시스템의 프레임에 부착하여 재배면에 광분포가 고르도록 배치함.
- (나) LMO 작물의 생육 단계에 적합하도록 명기/암기 제어가 되며 제어시스템 구축을 통해 재배단별 파장별 개별 제어 및 dimming 제어 컨트롤러 설치됨.
- (다) 식물은 400~700 nm의 가시광선 영역과 유사한 380~760 nm 영역에서 광합성이 이루어짐.

(라) 본 LMO 연구시설에 설치된 LED는 식물에 가장 적합한 파장의 청색(450 nm)과 적색(660 nm)을 사용.

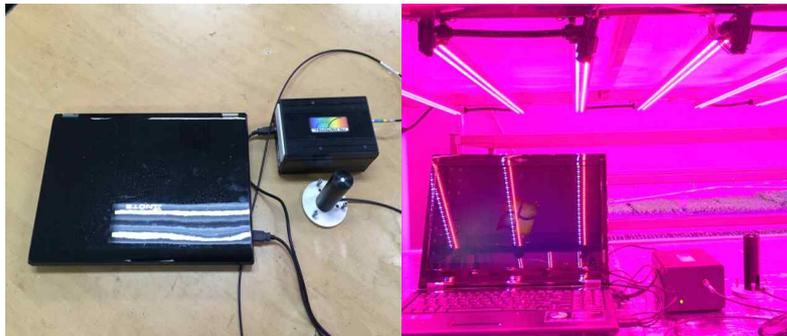
① 또한 Blue에서 나오는 빛으로 구현된 White module 이 혼합된 LED로 광비율 조절이 가능함. 작업시 눈부심 방지를 위한 백색의 LED package의 조명 제작.

② LED 조명 광량 확보 : $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (@20cm) 이상

- 본 LMO 연구시설에 설치된 에너지 절감형 수냉식 LED의 PPF는 Quantum 센서 (LI-1500, LI-COR)를 이용하여, 분광 특성은 분광분석계(PS-300, Apogee Inc.)를 이용하여 측정 가능함.



< 그림 322-3-11. LMO 연구시설 LED 조명의 광량 측정에 이용한 Quantum 센서 >



< 그림 322-3-12. 분광분석계와 LED 식물공장 LED 조명의 분광 측정 >

㉓ LED 조명의 방열 온도를 최소화하기 위해 수냉 방식의 방열 구조를 통해 LED 모듈이 일정한 온도를 유지 할 수 있도록 제작하여 식물이 재배되는 환경에 최적의 환경 조건을 마련함.

㉔ 수냉 방식 : 일정 온도 이상으로 온도가 상승되었을 경우 냉각기를 통한 물이 LED 모듈에 연결된 호스를 통하여 LED 모듈의 온도를 일정 온도로 유지 시켜주도록 하는 방열 방식.

㉕ 향후 LMO 작물 생산을 통한 유용단백질 안전생산 등의 활용 가치가 높을 것으로 기대됨.



< 그림 322-3-13. 완전폐쇄형 LMO 연구시설 LED 식물공장 LED 조명의 광도 조절 컨트롤러 >



< 그림 322-3-14. LED 식물공장 LED 조명의 수냉 냉각기와 자동 온도조절기 >

(5) 형질전환 작물 담배 실증 재배 및 대량 생산

(가) 연구개발 수행내용

- ① 본 연구의 실증 재배에 사용된 공시품종은 유용단백질 고생산 GM작물 담배(*Nicotiana benthamiana*)로 (주엔비엠에서 제공받아 대량 생산 진행.
- ② 파종 후 2주 동안 온도 20℃ 유지되는 폐쇄형 묘 생산 시스템(closed-type transplant production system, CTPS)에서 육묘됨.
- ③ 1, 2차년도 확립된 다음과 같은 환경 광조건의 LMO 연구시설인 LED 식물공장에서 대량 생산 진행.
- ④ 광비율은 1, 2차년도 연구결과로부터 12/12 h, Blue : Red = 5:5, 3:7 조건에서 효율적이었던 것으로 판단되었음.
- ㉠ 환경조건 : 기온 22±2 / 18±2 ℃, 습도 60±5%
- ㉡ 광조건 : 12/12 h, Blue(450nm) + Red(660nm) 혼합 LED 150 μmol·m⁻²·s⁻¹ (@20cm)
- ㉢ 배양액조건 : 전복대 개발 양액, EC 2.0 ms·cm⁻¹, pH 6.5

< 표 322-3-1. GM작물 담배 수경재배 배양액 조성 >

Nutrient elements		Contents (g/T)
Macro element		
A	KNO ₃	380
	5[Ca(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O]NH ₄ NO ₃	720
	Fe-EDTA	15
Micro element		
B	H ₃ BO ₃	2.86
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.13
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.09
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25

(나) 형질전환 작물 담배 실증 재배

- ① LMO 담배는 미립종자로 초기 발아 관리가 중요함. 따라서 1, 2차년도에 연구결과로부터 vermiculite를 배지 재료로 이용함.



< 그림 322-3-15. 형질전환 담배종자 파종 >

- ② 담배의 종자는 대부분 호광성 종자로서 발아시에는 광을 요하는 특성이 있으며 광의 정도는 품종에 따라 차이가 있음.
- ③ ㈜엔비엠에서 제공 받은 GM작물 담배 종자(*N. benthamiana*) 를 vermiculite에 약 10,000립 파종함. 파종 약 3일 경과 후 발아 시작됨.
- ④ 일반 노지 재배에서 담배는 파종에서 이식전까지(육묘) 60일 소요됨. 그러나 폐쇄형 묘 생산 시스템에서 육묘 시 약 40일로 단축 가능함.

- ⑤ 재배된 식물체는 주관기관 NBM과 협동기관 전북대학교에 제공 되어 실험 재료로 활용함
- ⑥ 파종 약 3주 후 담배의 지하부 뿌리가 약 3cm 이상 자랐을 때 우레탄 배지로 이식 후 관리함.
 - 환경조건 : 기온 $22\pm 2 / 18\pm 2$ °C, 습도 $60\pm 5\%$
 - 광조건 : 12/12 h, Blue(450nm) + Red(660nm) 혼합 LED $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (@20cm) (B:R=5:5)
 - 배양액조건 : 전북대 개발 양액, EC $1.0 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$, pH 6.5
 - 육묘기 공기 온도가 35°C 이상이 되면 묘의 고온피해 및 염류장해의 위험성이 크므로 적정 온도가 유지 될 수 있도록 공기 순환 중요함.



< 그림 322-3-16. 형질전환 담배 정식(위) 정식 22일 후(아래) >

- 담배는 생육기간이 짧으며 잎이 크고 연약한 특성 때문에 재배 환경에 매우 민감하여 재배 품종의 유전적 소질, 비료 관리 등 재배환경에 영향을 받음.
- 노지 재배 환경 중 토양은 일정부분 인위적 조절이 가능하나 기상은 인공적인 제어가 어렵고 잎담배의 품질에 미치는 영향이 크기 때문에 LMO 연구시설인 LED-농생명 융합기술연구센터의 LED 식물공장에서 재배 시 매우 효율적임.
- 또한, 노지 재배 시 병해(바이러스, 세균)의 발생과 방제에서 자유로움.
- 타 작물에 비하여 재배 환경에 지배되는 경향은 영양 기관인 잎이 수확의 대상이 되고 생체중이 종자의 2,000 만 배까지 성장하므로 생장이 급속하게 되는 점 등이 원인으로 봄.
- 이식 약 3주 후 LMO 연구시설인 LED 식물공장의 수경 재배 베드에 정식함.
- 환경조건 : 기온 $22\pm 2 / 18\pm 2$ °C, 습도 $60\pm 5\%$
- 광조건 : 12/12 h, Blue(450nm) + Red(660nm) 혼합 LED $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (@20cm) (B:R=5:5)
- 배양액조건 : 전북대 개발 양액, EC $2.0 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$, pH 6.5

○ LMO 연구시설인 LED 식물공장(394.76 m²) 수경 재배 베드에 1,600주 정식함.



< 그림 322-3-17. LED 광특성에 따른 2종의 GM작물 담배 실증 재배 및 대량 생산 >

(다) 형질전환 작물 담배 실증 대량 생산에 미치는 LED 효과분석

- ① 담배 잎의 크기는 중엽이 가장 크고 잎의 두께는 위로 올라갈수록 두꺼워져 상업이 가장 두꺼우며 품질은 중위엽을 중심으로 상하로 벌어질수록 떨어짐.
- ② 엽채류의 생장에 미치는 광반응은 파장 660 nm 부근의 적색광에 의해 길이, 신장 및 광형태형성 등, 450 nm 부근의 청색광에 의해 식물을 튼튼하게 하거나 클로로필 합성 등의 작용을 함.
- ③ 이와 같은 반응으로 담배잎에 LED 조사로 잎의 길이, 두께 등의 반응을 보임.
- ④ 1, 2차년도 연구결과로부터 B:R=5:5, 3:7이 효율적이었으며, 성장 특성에서 유의차는 없었음.
- ⑤ LED 조사로 균일한 생육을 보이며 대량 계획 생산과 생산량 예측이 가능함. 또한, 형질전환 작물 담배 실증 대량 생산을 통하여 실제 단백질 발현 등을 비교하기 위해 협동기관에게 제공

< 표 322-3-2. 정식 후 30일 2종의 GM작물 담배(*N. benthamiana*, 9-1)의 생육 >

	No. of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf area (cm ²)	Fresh weight (g/plant)	ODD ^z
<i>N. benthamiana</i>	26.0±3.0	13.6±0.8	13.0±0.8	1330.9±147.5	58.0±3.9	34.3±0.7
<i>N. Tabacum</i> 9-1	17.0±1.5	22.0±2.4	13.5±1.3	1965.8±414.6	71.6±15.8	38.4±0.7

^zOptical density difference measured by a chlorophyll meter.



< 그림 322-3-18. 정식 후 30일 2종의 GM작물 담배(*N. benthamiana*(좌),
N. Tabacum 9-1(우)의 생육>

- 일반 노지 재배의 수확 시기에 앞은 보통 한 줄기에 20장 정도가 붙는데, 그 붙은 위치에 따라 밑에서부터 하엽, 중엽, 상엽 등으로 불리며, 이 구분대로 수확이 이루어짐.
- LMO 연구시설인 LED 식물공장에서 담배의 생육에 따라 유용단백질 생산을 위한 효율적인 잎 수확 시기에 대한 정보는 부족한 실정임.
- 추후, LED 식물공장에서 GM작물 담배 실증 재배 및 대량 생산 시 노화되지 않은 숙성된 잎만을 수확할 수 있는 데이터 확보가 필요함.



< 그림 322-3-19. 정식 후 30일 2종의 GM작물 담배(*N. benthamiana*(좌),
N. Tabacum 9-1(우)의 잎의 생육>

- 형질전환 작물 담배 생육에 미치는 LED 효과
 - 형질전환 작물 담배 생육에 미치는 LED 효과를 관찰하기 위하여 형광반응, 광합성을 측정함.
 - 완전폐쇄형 LMO 연구시설 LED 식물공장에서 LED하에서 성장한 담배 잎을 엽록소

형광 반응 측정기를 사용하여 담배 잎의 수분 스트레스와 형광반응과의 관계를 측정함.



< 그림 322-3-20. 정식 후 30일 2종의 GM작물 담배(*N. benthamiana*(좌),
N. Tabacum 9-1(우)의 형광반응 측정>

- 완전폐쇄형 LMO 연구시설 LED 식물공장에서 LED하에서 성장한 담배 잎을 광합성 측정기(Li-6400 XT Portable photosynthesis System) 사용하여 담배의 광합성 반응을 정량적으로 측정함.
- LED 파장에 따른 작물의 형광반응(Fluorescence)을 측정 및 분석하는 장비로 LED 조명에서 작물의 반응 특성 분석 시 필요한 장비임. 특히 작물의 광반응 분석 및 광합성능력 측정에 활용할 수 있어서 GM작물 담배의 특성 분석 시에도 활용할 수 있음.
- 광합성 측정장비를 통하여 생육기간별 LED 광조건 별 광합성 효율과 광포화점, 광이용율 등의 데이터를 추적



< 그림 322-3-21. 정식 후 30일 2종의 GM작물 담배(*N. benthamiana*(좌),
N. Tabacum 9-1(우)의 광합성 측정>

(6) LMO 연구시설인 LED 식물공장에서 생산한 형질전환 재료 협동기관 제공

- ① ㈜엔비엠으로부터 제공 받은 LMO 담배 종자(*N. benthamiana*, 9-1,14-3)를 수령.
- ② 주기적으로 LED-농생명융합기술연구센터 LED 식물공장에서 대량 생산한 담배 묘와 수확한 잎을 실험재료 등으로 협동기관에 제공함.

< 표 322-3-3. 주관 및 협동기관 실험용 식물체 제공 내역 >

연번	샘플제공기관	샘플제공량(주)	이용목적	샘플제공일자
1	NBM	20	실험용	2015. 01. 13
2	포항공대	20	유전자분석	2015. 02. 12
3	NBM	30	실험용	2015. 03. 18
4	전북대학교	50	실험용	2015. 04. 15
5	NBM	30	실험용	2015. 04. 22
6	전북대학교	40	실험용	2015. 05. 11
7	NBM	30	실험용	2015. 06. 17
8	NBM	20	실험용	2015. 07. 16
9	전북대학교	50	실험용	2015. 08. 10

4. GM작물 재배를 위한 컨테이너형 재배실 및 LED 조명개발

○ (연구수행기관: LED-농생명융합기술센터)

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

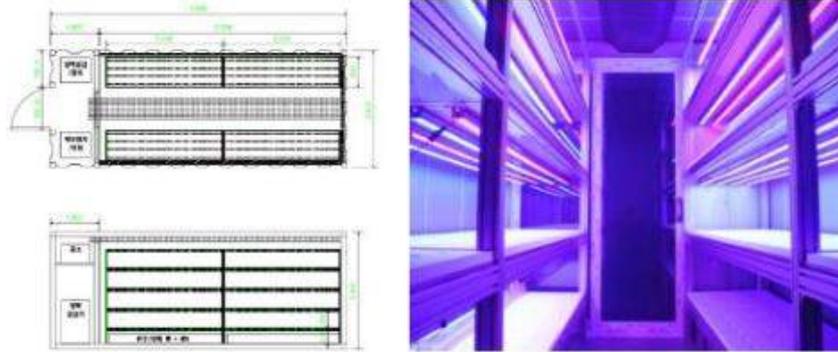
- 유용단백질 고생산 GM작물 재배법 확립, 대량재배
 - 이동형 컨테이너 LED식물공장 담배재배
 - 다양한 타입의 LED를 활용하여 GM작물 생산 시 효율적인 조명선발

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 폐쇄형 식물공장은 막대한 구축비용이 소요되며 초기 투자비용에 대한 부담이 많아 실험실규모의 LED식물공장에 대한 적용 및 구축에 대한 어려움이 있음.
- 이러한 어려움을 줄이기 위해 식물공장과 유사한 형태의 컨테이너 형 식물공장에서 담배 실험재배가 필요함

다. 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

(1) 컨테이너 형 식물공장 의 제원



< 그림 322-4-1. 20피트 컨테이너 LED 식물공장 >

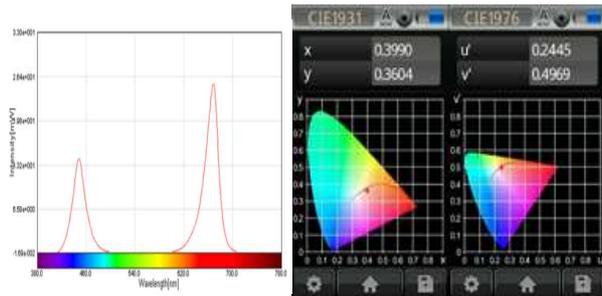
- 조명 제어, 양액제어 (생육 주기에 따른 양액 조절), 공조기 이용 온도 제어
- LED 조명에 의한 내부 온도 유지 (10℃ 이하 온열기 동작)
- 격리 재배가 필요한 경우 등 소형 LED 식물공장으로 이용 가능
- 기타 : 인공 토양 재배 및 다양한 생산 방식적용 가능
- 특정 작물에 따라 적합 운영 가능 시스템 구축
- 격리된 컨테이너 LED 식물공장 이용 GM작물(담배) 재배
- LMO 연구시설로 인가 후 LMO 작물 생산 안전관리 및 격리 포장 가능
- 양액 : 전복대양액 (EC:2.2±0.2ms/cm, 수온 20℃, 온도:21±2℃, 습도:60%)
 - 광조건 (광주기 16(L)/8(D)h)
 - Red(660nm):blue(450nm)=5:5
 - 광량:150μmol·m⁻²·s⁻¹at 20cm
 - 식물공장에서와 비슷한 양호한 생육을 보였음
 - 실험실 규모의 소규모 생산 시설로도 활용 가능성 확인

(2) 실험 방법



< 그림 322-4-2. LED 컨테이너 식물공장 담배생육 >

- ① 재배환경 : LED 컨테이너 식물공장
- ② 양액 : 전북대 양액 (EC:2.2±0.2ms/cm, 수온 20℃, 온도:21±2℃, 습도:60%)
- ③ 광조건 (광주기 16(L)/8(D)h)
- ④ Red(660nm):blue(450nm)=5:5
- ⑤ 광량 : 150μmol·m⁻²·s⁻¹ at 20cm



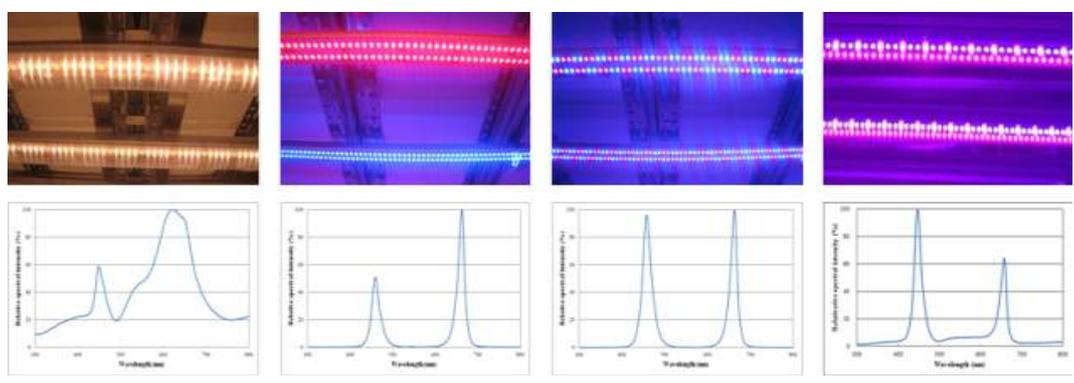
< 그림 322-4-3. 분광조도계로 측정한 LED스펙트럼 데이터 >

라. 연구결과 및 고찰

(1) 기능성 작물 생산용 bar type LED 조명 개발

(가) GM작물 재배 적용 시 병해저항성 물질 합성, 비타민 함량 증가 등 기대

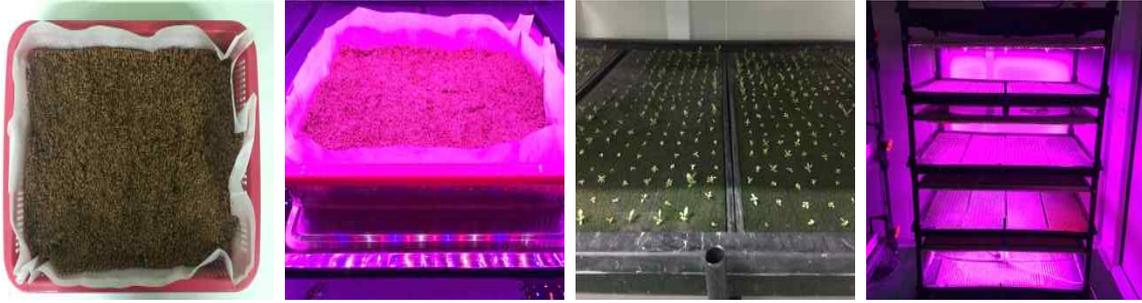
- ① 농생명 응용 LED 조명 시스템 개발
- ② 기존 단면만 조사 할 수 있는 Top Down 방식에서 Heat sink는 양면 조사 가능으로 신규 제작
- ③ 토마토, 파프리카 등과 같은 키 큰 작물에 적용가능
- ④ GM작물(담배) 재배 적용가능 하며, 품종에 따라 담배 잎에 근접 조사하여 광 효율 향상 기대
- ⑤ 재배베드에 설치된 LED 조명 시스템은 명기/암기 및 재배 단계별 파장별 개별 제어 및 Dimming 가능



< 그림 322-4-4. 담배재배에 사용된 LED조명 >

(나) 형질전환 작물 담배 (*Nicotiana benthamiana*) 실증 재배

- ① 담배는 미립종자로 초기 육묘 관리 중요함
- ② 3차년도까지 확립된 육묘 관리 기술로 주기적 종자 파종 및 육묘 진행함
- ③ LMO 연구시설인 LED 식물공장에서도 담배 생산
- ④ 환경조건 : $22\pm 2/18\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5\%$, 전복대 배양액 $2.0\pm 0.2 \text{ ms/cm}$, pH 6.5 ± 0.5
- ⑤ 광조건 : 16/8h, $120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blue:Red=5:5



< 그림 322-4-5. GM작물 담배(*N. benthamiana*)의 파종 및 육묘 >



< 그림 322-4-6. 정식 후 30일째 GM작물 담배(*N. benthamiana*)의 생육 >



< 그림 322-4-7. 정식 후 45일째 GM작물 담배(*N. benthamiana*)의 생육 >

- 식물재배에 적합한 식물재배용 LED 개발과 LED 기반 밀폐형 식물공장 기술을 확보하고 이를 활용하여 다양한 주요 식물의 최적재배기술을 확립하고 있음
- 현재 산업적으로 사용하는 LMO 시설은 허가되지 않은 상태에서 사용되고 있는 현황이며 LMO를 이용한 합법적인 산업화 필요
- 산업용 LMO 식물을 재배하여야 하는 관계로 LMO 환경영향평가를 회피하여 조기 산업화를 이루기 위하여서는 밀폐형 식물공장에서의 재배가 필수적임
- 식물공장 산업화와 수익성 모델에 적합한 작물인 형질전환 식물체 재배는 재배기술이 표준화 되어야 하므로 각 조건(양액, 광주기, 온, 습도)에 의한 생산량 및 유전자 발현량에 대한 데이터 베이스가 구축되어야 하며 이를 위한 조건 별 유전자 발현 분석을 실시예정

5. LED 기반 밀폐형 LMO 식물공장을 이용한 대량재배

- (연구수행기관: LED-농생명융합기술센터, 순천대)

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- 유용단백질 고생산 GM작물 재배법 확립, 대량재배
 - 광조건별 LMO작물 (*Nicotiana tabacum*) (P-10, P-11) 시험재배
 - 대량재배가능 조건 구명
 - 식물공장 GM작물 생산 기술교육 실시

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

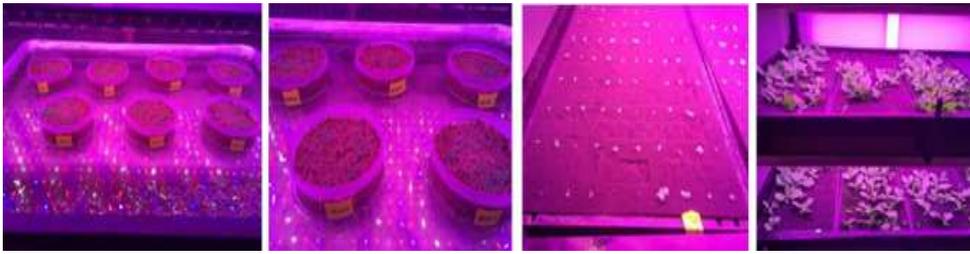
- 유전자 변형 GM작물은 식물공장에서 대량 생산하기 위해서는 유전자 변형된 식물체의 생육특성 파악이 매우 중요함
- 이러한 생육특성을 파악하고 대량생산 조건을 확립하기 위해 형질전환 된 담배 (*Nicotiana tabacum*)를 순천대학교에서 분양 받아 아래와 같은 조건에서 생육진행

다. 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

- (가) 형질전환 작물 담배 실증 재배
 - (1) vermiculate에 파종 후 10일 후 이식
 - (2) 환경조건 : $22 \pm 2 / 18 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$, 전복대양액 $2.0 \pm 0.2 \text{ ms/cm}$, pH 6.5 ± 0.5
 - (3) 광조건 : 16/8h, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blue:Red=5:5
 - (4) 육묘 후 이식 LED식물공장에서 재배



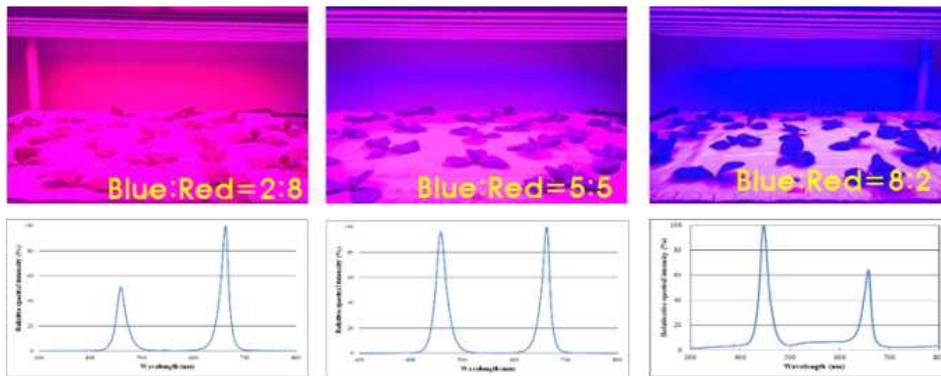
< 그림 322-5-1. 순천대학교에서 분양 받은 LMO종자 Pngase T-10, T-11 >



< 그림 322-5-2. 파종직후, 파종10일후, 이식 10일 후, 이식 20일 후(왼쪽 순) >

(5) 형질전환 작물 담배 재배조건

- 환경조건 : $22 \pm 2 / 18 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$, 전복대양액 $2.0 \pm 0.2 \text{ ms/cm}$, pH 6.5 ± 0.5
- 광조건 : 16/8h, $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Blue:Red=2:8 , Blue:Red=5:5, Blue:Red=8:2



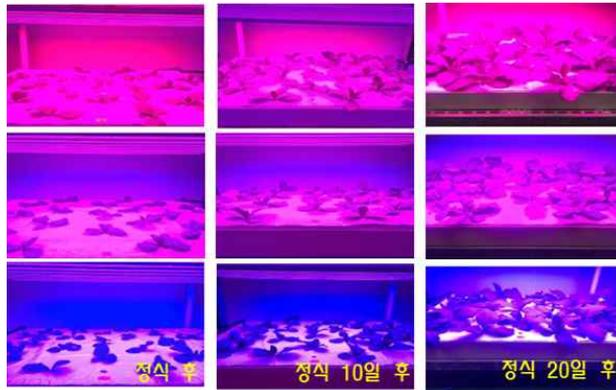
< 그림 322-5-3. 광비율별 LED처리구 >

라. 연구결과 및 고찰

(1) 광비율별 담배생육 결과

(가) 형질전환 담배 생육 (정식 20일후)

- ① LED Blue:Red=2:8 비율에서 엽면적이 가장 높았음
- ② GM작물은 대체적으로 일반 작물에 비해 초기 발아율 저하가 관찰됨
- ③ 대량생산 시 정식묘 확보를 위한 초기 생육 촉진하는 기술과 관리가 필요

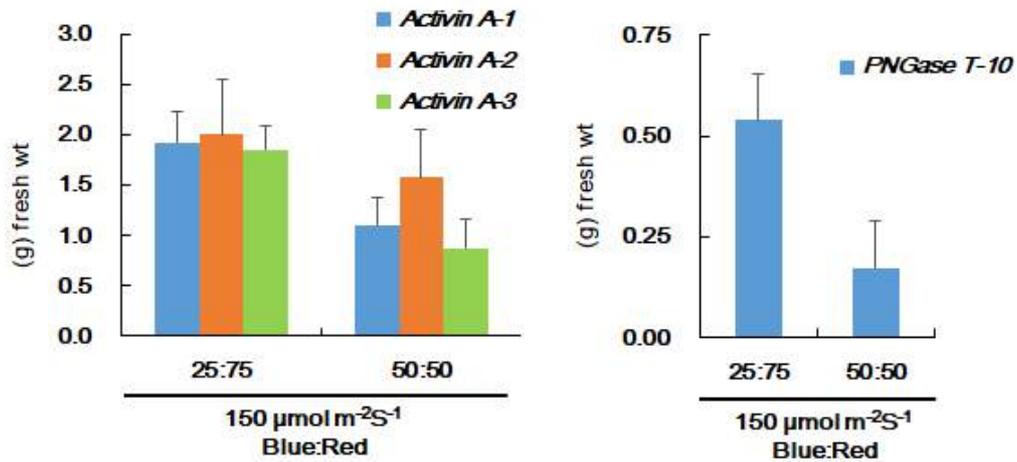


< 그림 322-5-4. 정식 후 일수 별 담배생육 >

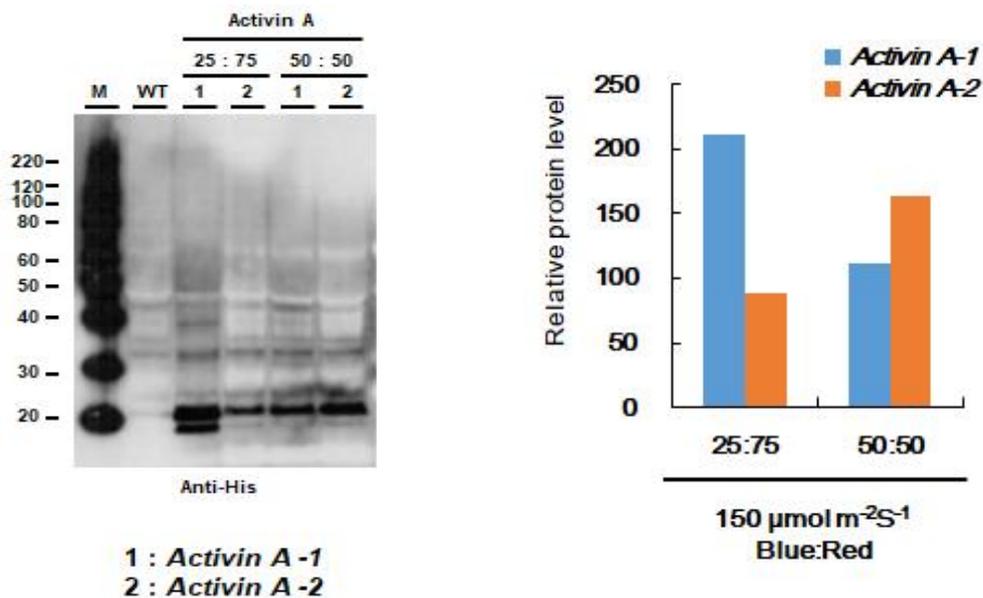
(2) LED 파장에 따른 형질전환 담배 (*Nicotiana tabacum*)의 생육과 단백질 함량 비교

- 3종의 식물체 고발현 단백질(insulin, PNGase T, Activin A)의 사업화 가능성을 효율성과 재배 조건적 측면에서 분석
- LED센터에 Activin A 3개 라인, PNGase 1개 라인의 형질전환 식물체 T1 세대 종자를 보낸 후 식물체를 Blue:Red 빛조건을 각각 25:75, 50:50을 주어 받아된 식물체 sample을 받음
 - Blue:Red 빛조건 25:75, 50:50에서 생육한 식물체 개체의 생체 중량을 비교하였다.
 - Western 분석을 통한 단백질의 발현율을 비교하였다.
- 고발현 단백질(PNGase T, Activin A)의 빛에 의한 재배 조건적 측면에서 생육과 단백질 발현 분석
 - LED 센터로부터 Blue:Red 빛조건을 각각 25:75, 50:50으로 처리한 후 받아되어 생장한 식물체를 제공받아 생체 중량을 비교한 결과 *Activin A* 형질전환 식물체와 *PNGase T* 형질전환 식물체 모두에서 Blue:Red = 25:75에서 생육이 좋았다 (그림322-5-5).
 - *Activin A-1* 형질전환 담배 식물체는 빛 조건 Blue:Red=25:75가 Blue:Red=50:50에 비해 생체 중량이 1.7배 증가하였고, 라인 *Activin A-3* 형질전환 담배 식물체는 3.9배 증가하였다.
 - *PNGase T-10* 형질전환 식물체의 경우 *Activin A* 형질전환 식물체 보다 생체 중량이 적었지만 빛 조건에 Blue:Red=25:75에서 3.2배나 증가하였다.
 - 또한 Blue:Red 빛조건에서 단백질의 western을 통하여 발현율을 비교 분석한 결과 *Activin A* 형질전환 식물체에서 *Activin A* 단백질이 빛 조건 Blue:Red=25:75가 Blue:Red=50:50에 비해 발현율이 2.3배 증가하였다 (그림322-5-5, 그림322-5-6).
 - 따라서 재조합 단백질의 고발현을 유도하기 위해서 형질전환 식물체의 생육조건이 중요하며, 특히 파이토크롬의 생리활성에 영향을 미치는 적색광이 높은 비율로 조사되는 환경이 더 효과적임을 알 수 있었다.

- 그러나 Activin A-2의 경우에는 청색광:적색광의 비율이 50:50일 때 생물량도 많았으며, 단백질 발현량도 많음을 알 수 있었다.
- 따라서 이는 도입된 유전자의 도입 부위 등 다양한 요소들이 생물량 생성과 재조합 단백질의 발현 등에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었으나 보다 면밀한 분석이 추가적으로 진행되어야 할 것으로 판단된다.



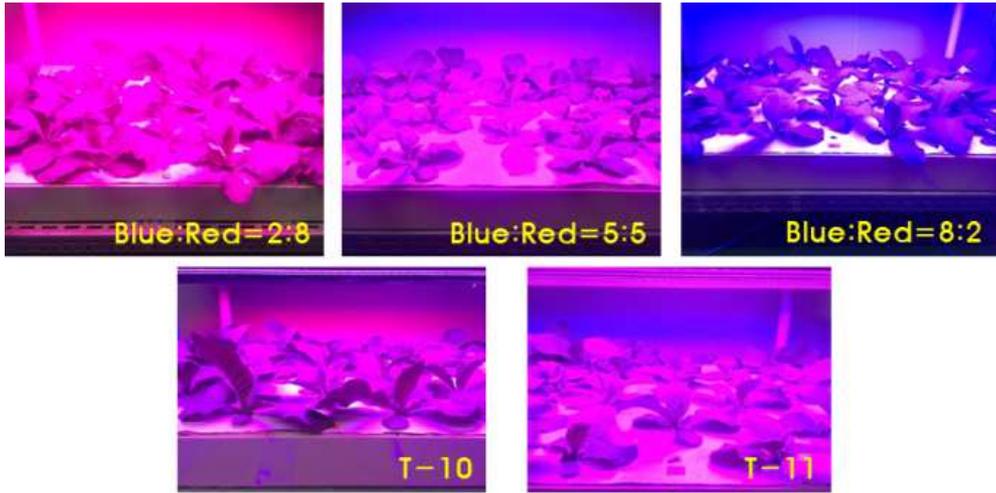
< 그림 322-5-5. Blue:Red 빛 조건에 따른 생체중량 비교 >



< 그림 322-5-6. Blue:Red 빛 조건에 따른 Activin A 단백질 발현율의 western 분석 및 단백질 발현율 비교 >

(3) 식물공장 작물생산 교육실시

(가) 교육 목적



< 그림 322-5-7. 처리구별 광원비율과 GM 담배 생육 >

- ① LED 식물공장의 확산 보급 및 저변 확대
- ② 센터 보유 LED 식물공장 인프라를 이용한 이론&실습 심화 교육
- ③ LED 식물공장 관련 필수 기술 (광원, 양액재배시스템, 자동환경제어, 식물공장 구조 설계/설비 등) 교육
- ④ 재배 생산 과정에서의 재배 이론 교육 및 전 과정에 필요한 현장 실무 교육

(나) 교육개요

- ① 교육 기간 : 2017. 10. 25(수) ~ 27(금) 2박3일
- ② 교육 장소 : 전북대학교 특성화캠퍼스(익산) LED농생명융합기술연구센터
- ③ 교육 대상 : 서울형 뉴딜일자리(도심형 식물공장 전문관리사 양성) 근로자 5명

(다) 세부 교육일정

교육 일정	교육 시간	교육 내용	교육 강사
1일차 10. 25(수)	09:00~12:00	오리엔테이션 및 LED 농생명 융합 기술 이론	박재영 팀장
	12:00~13:00	점심 식사	
	13:00~14:00	식물생장용 LED 조명 이론	박재영 팀장
	14:00~17:00	LED 식물공장 시스템 현장교육 (재배베드, 양액공급장치, 인공광원)	남민우 선임
2일차 10. 26(목)	09:00~12:00	식물 종묘 생산 이론	김선기 연구교수
	12:00~13:00	점심 식사	
	13:00~17:00	LED 식물공장 정식 및 수확 실습	이혜인 주임

3일차 10. 27(금)	09:00~12:00	LED 식물공장 파종 실습	이혜인 주임
	12:00~13:00	점심 식사	
	13:00~16:00	LED 식물공장 양액 제조 이론 및 실습	남민우 선임
	16:00~17:00	종합 토론 및 수료식	박재영 팀장

(라) 세부 교육 내용

교육 내용	세부 교육 내용
1일차 오리엔테이션 및 LED 농생명 융합 기술 이론	<ul style="list-style-type: none"> - LED 센터 홍보영상 시청 - 참가 인원의 현장 경험 내용 공유 기회 - LED 식물공장의 정의와 의의 - LED 식물공장 요소 기술 이론
1일차 식물생장용 LED 조명 이론	<ul style="list-style-type: none"> - 식물생장용 LED 광원의 광특성 측정 기초 이론 교육 - 식물의 광반응 스펙트럼과 광합성 - 광원과 조명 설계 (광도의 단위, 요구되는 광량자속, 조명 설계 방법 등) - 식물생장용 LED 조명 동향 및 적용 사례
1일차 LED 식물공장 현장 교육	<ul style="list-style-type: none"> - LED 식물공장 현장 소개 및 설명 - LED 식물공장 운영 및 연구 현황 소개
2일차 식물 종묘 생산 이론	<ul style="list-style-type: none"> - LED 식물공장 재배 작물을 중심으로 식물의 기본구조, 양분과 수분생리, 물질대사 및 성장생리 등에 관한 기초 이론 - 식물공장 내 식물 성장 환경 요인과 성장 - 식물 조직배양의 필요성 및 방법 - 조직배양에 의한 무병주(고구마) 생산 기술 실습
2일차 LED 식물공장 정식 및 수확 실습	<ul style="list-style-type: none"> - 작물의 성장과 재배특성, 품종 및 작형, 수확 방법을 이해하고 실습을 통해 재배관리, 수확 및 저장 등에 관한 기술을 습득 - LED 식물공장의 대상이 되는 작물 소개 - 실습 중 부족한 이론 보충 설명 - 실습 후 수확한 엽채류를 이용한 샐러드 시식
3일차 LED 식물공장 파종 실습	<ul style="list-style-type: none"> - LED 식물공장 재배 엽채류의 육묘관리기술과 실습을 통해 실제 식물공장 육묘 재배기술을 습득하여 실제 재배에 적용할 수 있는 능력을 배양
3일차 LED 식물공장 양액 제조 이론 및 실습	<ul style="list-style-type: none"> - 양액공급 시스템의 기본 원리와 운영 - LED 식물공장에서 요구되는 수경재배 특성, 작물 필수원소의 기능과 결핍 및 과잉증상과 대책, 양액 조성과 농도, 양액 조제 방법 및 이론 교육 - LED 식물공장 재배 작물별 농축액 제조 (2인1조) 후 EC, pH meter 사용법 교육 및 측정/보정 실습
3일차 종합 토론 및 수료식	<ul style="list-style-type: none"> - LED 식물공장 교육 만족도 조사 및 설문 - LED 식물공장 산업 활성화를 위한 제안 공유 - LED 식물공장 종합 토론 - 스마트 농업의 사례와 발전 방안 토론 - 농업·농촌 정보화 확산 및 체계 마련을 위한 추진 계획 토론

교육 내용	교육 사진
<p>1일차 오리엔테이션 및 LED 농생명 융합 기술 이론편</p>	
<p>1일차 식물생장용 LED 조명 이론편</p>	
<p>1일차 현장 교육</p>	
<p>2일차 식물 종묘 생산 이론편</p>	
<p>2일차 LED 식물공장 수확 및 정식 실습</p>	

<p>3일차 LED 식물공장 파종 실습</p>	
<p>3일차 LED 식물공장 양액 제조 이론 및 실습</p>	
<p>3일차 종합 토론 및 수료식</p>	

(마) 교육 결과활용 방안 및 파급효과

- 도심형 식물공장(Vegetable Farm) 식물 재배 및 환경 제어 기술, 현장 실습 교육을 실시함으로써 식물공장에 대한 이해도를 높이고 전문 관리자 직무 역량 강화
- 식물공장 운영기업, 예비 창업자, 농업인 등을 위한 식물공장 관련 기초이론 및 실무 교육의 기회 제공
- 식물공장 관련 기초 이론 교육과 체계화된 실무 교육의 병행을 통해 교육성과 극대화를 기대할 수 있음. 교육 사업(이론, 실무 교육 병행)에 센터가 선도적인 역할 수행
- 식물공장 관련 사업자 및 현장 실무자의 교류로 현장애로 기술 공유를 통해 현장 실무자 역량 강화 기회. 나아가 식물공장의 장기적인 발전 계기 마련함

3-2-3. 식물유래 Anti-FimA 항체 생산기술 확립 및 효능검증

1. 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체 대량 생산 및 고순도 분리정제

○ 연구수행기관 : 전북대학교, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체 현탁세포주 구축

- ① Anti-FimA 생산 형질전환 벼의 최적 생산조건 확립
- ② FimA 항체 발현을 위한 당이 없는 배지에서 배양
- ③ Protein G affinity column을 이용한 정제

(2) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체의 대용량 고순도 분리정제 체계확립

- ① 식물유래 anti-FimA 항체 고순도 분리정제를 위한 추출, 분리, 정제 프로세스 확립
- ② 산업화 규모의 (300L이상) 재조합 FimA 항체 단백질 분리 정제하기 위한 농축
- ③ FimA Ab를 고순도 분리 정제하기 위한 affinity chromatography 수행
- ④ Affinity chromatography 수행 후 Desalting
- ⑤ Ion-exchange chromatography 수행
- ⑥ Ion-exchange chromatography 수행 후 최종 제품을 만들기 위한 Desalting
- ⑦ FimA Ab의 정제 단계별 단백질 정량

(3) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체의 적정 포장방법 확립

- ① 식물유래 anti-FimA 항체에 대한 장기 보존을 위한 적정 포장방법 확립

(4) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체의 안정성 확인

- ① 단기 저장기간에 따른 식물유래 anti-FimA 항체에 대한 안정성 확인
- ② 장기 저장기간에 따른 식물유래 anti-FimA 항체에 대한 안정성 확인

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 최근에 충치 유발균으로 알려진 *P. gingivalis*로 인하여 류마티스의 유발이 보고되고 있고 있으며, *P. gingivalis*에 의한 충치 및 류마티스 유발을 억제 및 치료를 위하여 *P. gingivalis*의 감염에 관여하는 fimbriin에 대한 항체가 주목을 받고 있음
- FimA 항체를 포함한 충치예방을 위한 기능성 가글제, 치약 등의 제품화가 가능하며,

바이오메터로 인정받을 수 있는 신약이 될 수 있음

- 본 연구는 식물유래 FimA 항체의 효능을 확인하기 위하여 전북대학교가 기 개발하여 확보하고 있던 FimA 항체 생산 세포주에 대한 대량생산 및 고순도 분리정제조건을 확립하고 이의 장기보존을 위한 적정 포장방법을 확립하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체 현탁세포주 구축

(가) 연구개발 수행내용

① 현탁 세포배양

- 형질전환 된 벼 현탁세포는 2 mg/L의 2,4-D와 0.02 mg/L의 카이네틴 및 3%의 설탕을 포함하는 50 mL의 N6 액체배지를 포함하는 삼각플라스크를 이용하여 28 °C, 회전속도 100 rpm 조건의 현탁 배양기에서 암 상태에서 배양하였다. Anti-FimA 항체의 생산을 확인하기 위하여 현탁 세포를 설탕이 첨가되지 않은 50 mL 액체 배지에 생체중량 5g의 균일화 된 현탁 세포를 접종하여 7일 동안 배양한 후 배양액을 수거하였다.

② Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)과 Western blot analysis

- 배지내로 분비된 anti-FimA 항체의 배지 내 축적된 양을 확인하기 위하여 먼저 Bradford's method를 사용하여 형질전환 된 캘러스의 현탁 배양으로 부터 설탕이 첨가되지 않은 배지내로 7일 동안 분비된 배양액의 전체 단백질량을 측정하였다 (Bradford 1976).
- 5 μ g의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 non-reducing condition에서 8 % 와 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다. Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 Anti-mouse IgG (whole) alkaline phosphatase conjugated (A3562, Sigma), anti-mouse IgG (γ -chain specific) alkaline phosphatase conjugated (A3438, Sigma) 그리고 monoclonal anti-mouse kappa light chain (K2132, Sigma) 등을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:7,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

③ Affinity chromatography를 이용한 anti-FimA 항체의 정제

- Anti-FimA 항체를 생산하기 위해 당이 없는 조건에서 형질전환 벼 현탁 세포를 배양한 후 배양액을 수거하여 거름종이로 filtration하여 soup을 분리하여 동결건조 한 후 PBS buffer에 녹여서 sodium phosphate buffer로 투석 하였다. 투석을 한 후에 배양액을 Protein G column (GE Healthcare)을 장착한 BioLogic LP, chromatography system (BIO-RAD)을 이용하여 다음과 같은 방법으로 정제하였다.
- Column을 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 washing 한 후 sample을 loading하고 다시 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 washing 하였다.
- Sample을 washing한 후에 항체 단백질을 분리하기 위하여 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7)를 이용하여 elution 하였다. 항체단백질을 elution 한 후에 용액의 pH를 중성으로 맞추기 위해 미리 준비해놓은 1 M Tris-HCl (pH 9.0)을 1/10 volume 넣은 tube에 elute를 섞고 정제된 항체는 fraction 별로 SDS-PAGE과 Western blot analysis를 수행하였다.

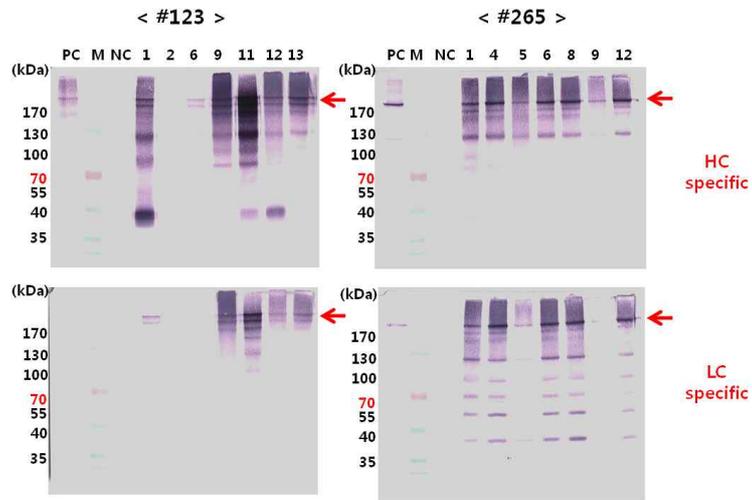
(나) 연구결과 및 고찰

① anti-FimA 생산 GM벼의 최적 생산조건 확립

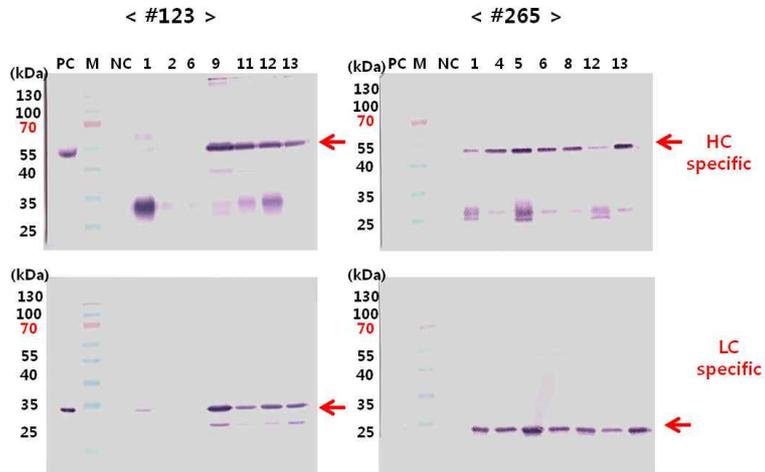
- 선행연구 결과 확립된 anti-FimA 항체를 고 생산하는 벼 현탁세포를 2주 간격으로 1mm × 1mm의 스텐레스 망을 이용하여 현탁세포를 동조화 하고 300 ml flask에 50 ml 규모로 계대배양 하였다. 선발된 elite라인의 현탁세포 배양으로부터 배지내로 분비된 항체 단백질을 확인하기 위하여 당이 첨가되지 않은 50 ml 배지에 생체중량 5g의 현탁 세포만을 접종하여 7일 동안 배양하였다. 배양액만을 수거하여 다음 분석을 위하여 사용하였다.

② anti-FimA 항체 발현 및 생산 확인

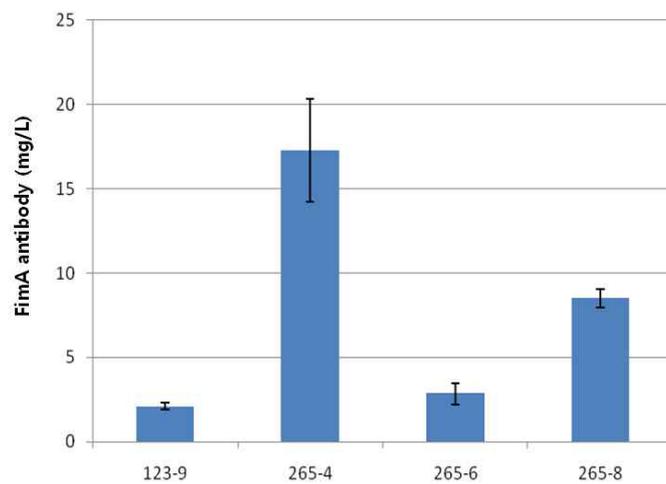
- 설탕이 첨가되지 않은 배지에서 7일 동안 배양된 배양액에 축적된 anti-FimA 항체 단백질 양을 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다. Non-reducing condition에서 hybridoma cell line 123과 265 항체의 발현이 whole 항체 크기인 대략 170 kDa에서 주된 발현양상을 나타냈으며 (Kim et al., 2014), 다양한 형태의 heavy chain과 light chain이 assembly 된 크기의 항체들이 확인되었다 (그림 323-1-1). Reducing condition에서 대략 55 kDa의 heavy chain과 25 kDa의 light chain이 발현된 것을 확인하였다 (그림 323-1-2).
- 생산량을 확인하기 위하여 상기에서 기술된 바에 의거하여 ELISA를 수행한 결과 hybridoma cell line 항체 123의 경우 엘리트 라인인 9번 계통에서 2 mg/L 그리고 항체 265의 경우 엘리트 라인인 4번 계통에서 17 mg/L의 식물 유래 FimA 항체가 생산됨을 확인하였다 (그림 323-1-3).



< 그림 323-1-1. Non-reducing 상태에서 식물 유래의 anti-FimA 항체의 발현 >



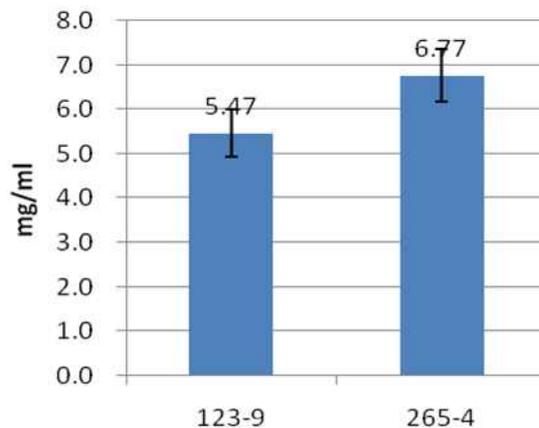
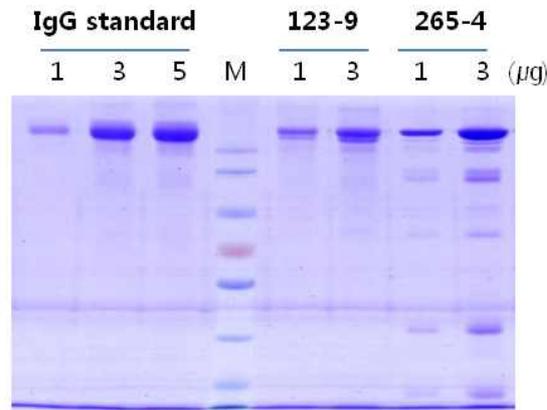
< 그림 323-1-2. Reducing 상태에서 식물 유래의 FimA 항체의 발현 >



< 그림 323-1-3. ELISA를 통한 식물 유래 FimA 항체의 정량 >

③ Protein G affinity column을 이용한 정제

- 상기에서 기술된 FimA 항체를 포함하는 현탁세포 배양액으로부터 FimA 항체를 분리하기 위하여 protein G affinity chromatography를 이용하여 정제하였다. 시판되고 있는 IgG 표준품을 기준으로 정제된 식물 유래 FimA 항체의 양을 정량하기 위하여 SDS-PAGE와 ELISA를 수행하였다 (그림 323-1-4). 그 결과 hybridoma cell line 123-9의 경우 90% 이상의 순도를 보였으며 50 ml batch culture에서 대략 3 mg의 항체를 확보하였으며, 265-4의 경우 80% 이상의 순도를 보였으며 50 ml batch culture에서 대략 5 mg의 항체를 확보하였다.
- 확립된 FimA 항체 고생산 세포주에 대한 대량생산과 고순도의 정제는 주관기관인 (주)NBM에서 수행하였으며 이의 결과는 이후에 기술하였음.



< 그림 323-1-4. Protein G affinity chromatography를 이용한 식물 유래 anti-FimA 항체의 정제 및 정량 >

(2) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체의 대용량 고순도 분리정제 체계 확립

① 식물유래 anti-FimA 항체 고순도 분리정제를 위한 추출, 분리, 정제 프로세스 확립

○ 재조합 FimA 항체 단백질을 정제하기 위한 sequence 분석

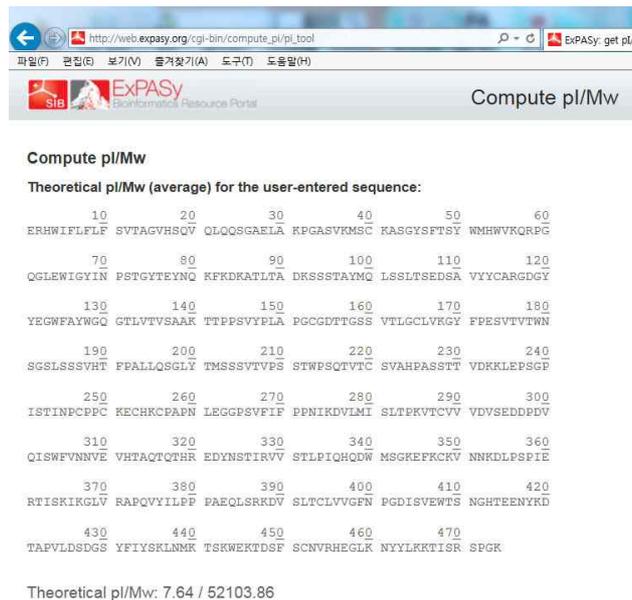
- 정제하고자 하는 타겟 단백질인 FimA Ab의 분자량과 pI값을 분석하기 위해

http://web.expasy.org/compute_pi/ 사이트에 FimA Ab의 light chain과 heavy chain의 아미노산 서열을 입력하고 pI/Mw를 클릭하여 분석하였음.

- 분리정제하기 위한 타겟 단백질인 FimA Ab의 light chain의 분자량은 약 26.5kDa이고 pI값은 약 6.7이고 heavy chain의 분자량은 52.1kDa이고 pI는 7.64임을 확인 함.



< 그림 323-1-5. FimA 항체의 light chain의 pI값과 분자량 분석 결과 >



< 그림 323-1-6. FimA 항체의 heavy chain의 pI값과 분자량 분석 결과 >

② 산업화 규모의 (300L이상) 재조합 FimA 항체 단백질 분리 정제하기 위한 농축

○ 연구개발 수행내용

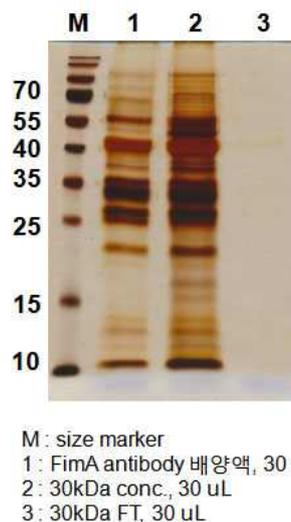
- 벼 현탁세포의 배양액 320L를 산업화 규모의 농축 SOP에 따라 10L로 약 32배 농축한 후 20 mM sodium phosphate, pH 7.0이 되도록 pH를 보정함. 이후 0.45 um 카트리지를 사용해 여과하고 affinity chromatography를 수행함. 농축액을 equilibration하기 위해 농축액 약 10 L에 Na_2HPO_4 , 16.4g과 NaH_2PO_4 , 10.2g을 넣고 pH를 7.0으로 보정하고 최종부피 10L로 D.W로 맞춤. 이후 저온실에서 2h 동안 stir 한 후 0.45 um filter를 사용하여 여과하여 column에 loading 함



< 그림 323-1-7. 벼 현탁세포로부터 재조합 FimA 항체를 생산한 배양액, 320L >

○ 연구개발 수행결과

- 320L의 배양액을 농축한 후 단백질의 농축 유무를 12% acrylamide 농도의 gel을 사용해 gel run 한 후 silver staining 으로 확인 함. 그 결과 30kDa 카트리지를 사용해서 농축하였을 때 15시간에 32배 농축하여 10L로 제조 함. Flow through에서는 어떠한 단백질도 silver staining으로 확인 할 수 없음. 95% 이상 농축 됨을 확인 함.



< 그림 323-1-8. 320L의 FimA 항체가 발현된 배양액을 농축한 후 silver staining >

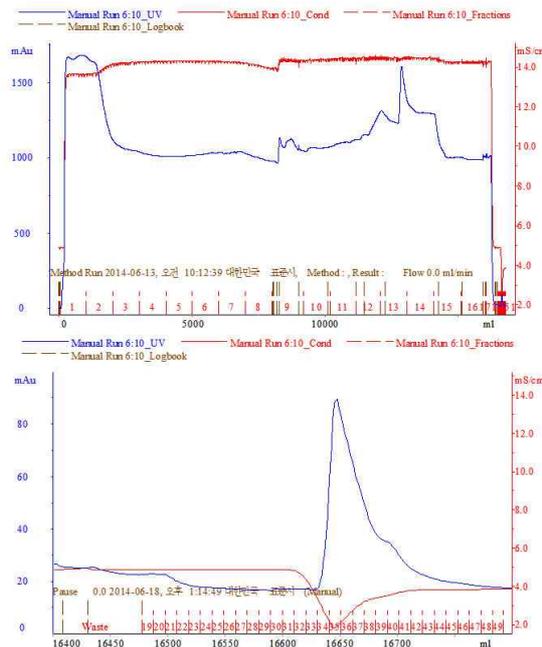
③ FimA Ab를 고순도 분리 정제 하기 위한 affinity chromatography 수행

○ 연구개발 수행내용

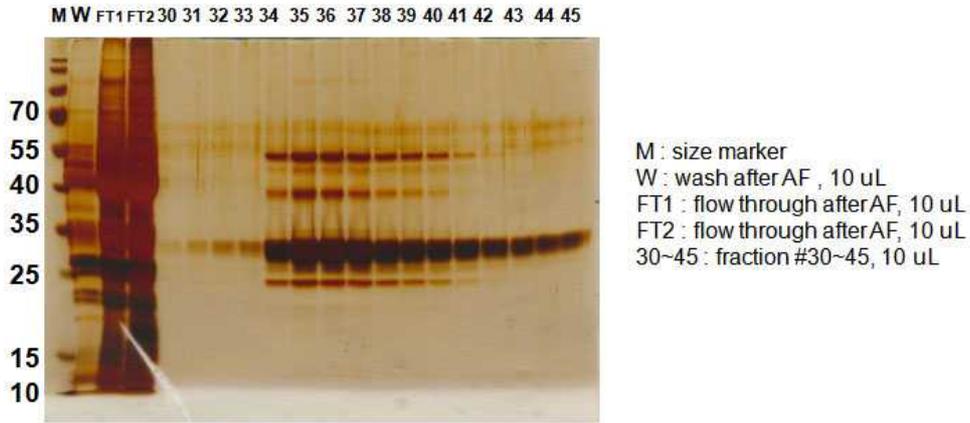
- FimA Ab 배양액 320L를 산업화 규모의 농축 SOP에 따라 10L로 약 32배 농축한 후 pH 보정한 시료 10L를 column에 loading. 상기 FimA Ab 정제를 위한 SOP에 따라 고순도 분리 정제함. 미리 준비해둔 protein G sepharose가 packing 되어 있는 affinity chromatography용 컬럼에 AKTA prime의 buffer A line으로 sample을 loading 함. flow rate 는 5 mL/min이고 wash는 equilibration buffer, 500 mL, elution은 elution buffer, 1L로 affinity chromatography를 수행함. fraction size는 10 mL 이지만 pH 2.7로 elution 하기 때문에 FimA 항체가 변성이 일어날 수 있어서 fraction tube에 1M Tris, 1 mL씩 넣어 둔 후 fraction을 받음.

○ 연구개발 수행결과

- 농축한 FimA Ab 배양액 10L를 affinity chromatography 수행한 결과 크로마토그램은 pH 2.7의 낮은 pH로 elution 하였을 때 대부분의 항체가 resin에서 분리되어 정제 됨. 충전된 protein G의 binding capacity가 약 3g의 항체를 결합 할 수 있기 때문에 300L이상의 많은 양의 배양액을 정제할 수 있음. 각각의 fraction을 12% acrylamide gel에 10 uL씩 loading하고 gel run 한 후 silver staining 하여 확인 한 결과 SDS-PAGE상에서 90% 이상의 purity를 확인 할 수 있었음. 일부 다른 단백질이 동일한 분자량을 가지고 있어서 PAGE상에서 band에 가려 질수 있어서 Ion-exchange chromatography를 추가로 수행하여 고순도로 분리 정제함. 일부 발견된 후 배양액 내에 존재하는 endopeptidase에 의해 분해되는 것을 확인 할 수 있었음.



< 그림 323-1-9. FimA 항체의 affinity chromatography 이후 chromatogram >



< 그림 323-1-10. Affinity chromatography 이후 각각의 fraction을 12% gel에서 확인 >

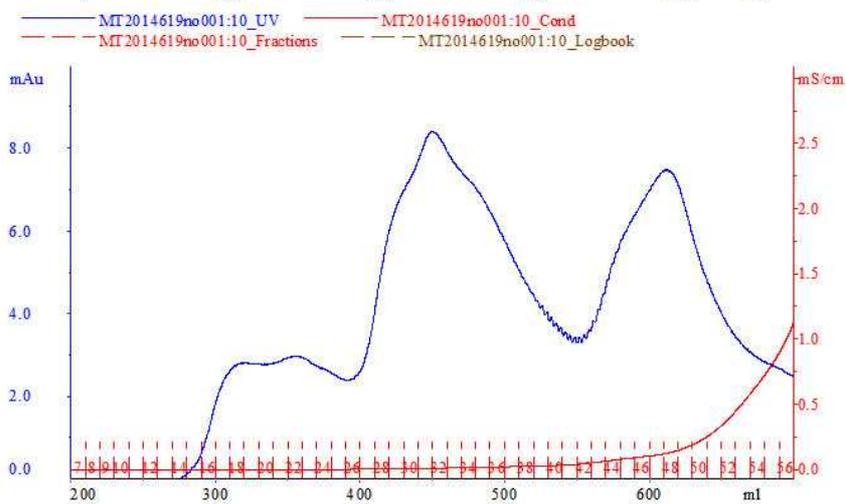
④ Affinity chromatography 수행 후 Desalting

○ 연구개발 수행내용

- affinity chromatography 후 FimA 항체가 있는 fraction #34~45, 약 121 mL를 모아 2번에 나눠서 desalting 수행. 각각 70 mL씩 desalting column에 loading 하고 buffer는 RO수를 사용하며, flow rate는 10 mL/min으로 하고, fraction size는 10 mL로 함. 1L의 RO수를 사용하여 elution 함.

○ 연구개발 수행결과

- Desalting 시 size가 상대적으로 큰 단백질은 빠른 시간에 빠져 나오지만 size가 작은 단백질은 salt보다 늦게 나오는 경우가 있음. 하지만 FimA Ab의 경우 분자량이 크기 때문에 salt 보다 일찍 elution 되어 나옴. 1차 desalting 한 후 fraction #8-53을 모으고, 2차 desalting 한 후 fraction 12-57를 모은 후 하나로 합쳐 ion-exchange chromatography 수행 함.



< 그림 323-1-11. Affinity chromatography 수행 후 FimA Ab fraction의 1차 desalting한 chromatogram >

⑤ Ion-exchange chromatography 수행

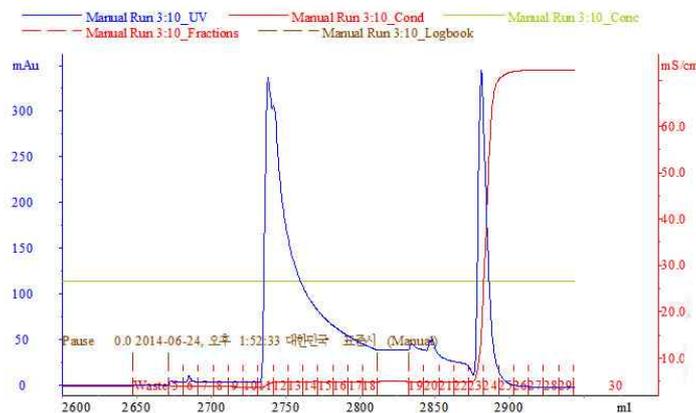
○ 연구개발 수행내용

- 1,2차에 걸쳐 desalting한 후 fraction #8-53과 fraction12-57를 모은 후 하나로 합쳐 약 900 mL에 Mcvaine's buffer, 10 mM NaCl, pH 6.0으로 pH를 보정하고 0.45 um로 여과한 후 ion-exchange chromatography 수행 함. FimA 항체 분리 정제에 관한 SOP에 따라 미리 준비해 둔 SU-BPX 22 column에 100 mL의 CM sepharose를 충전 하여 equilibratino 한 컬럼에 시료 loading. flow rate는 5 mL/min, wash는 equilibration buffer(buffer A)로 500 mL, elution은 2차에 걸쳐 수행함. 첫 번째는 buffer B로 하고 2차로 buffer C를 사용하여 eltuion함. fraction size는 10 mL로 함. 아래 표는 ion-exchange chromatography에 사용한 각각의 buffer 조성을 나타냄.

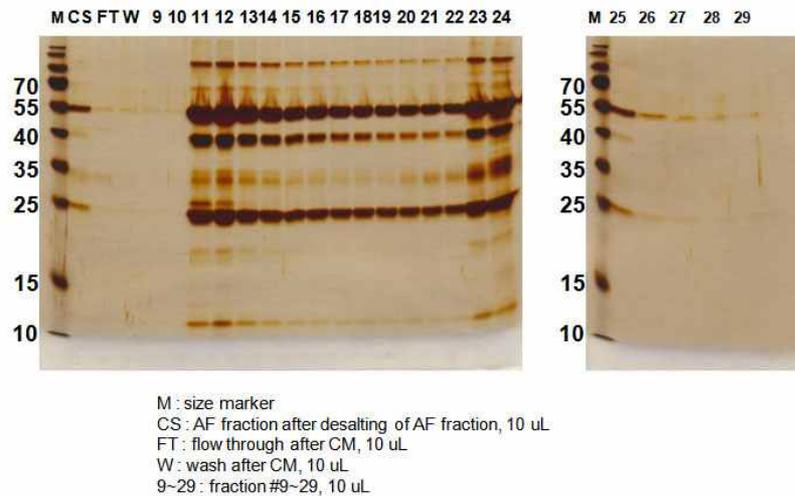
Buffer name		성분
Buffer A	Equilibration buffer (pH 6.0)	Na2HPO4 : 35.9g Citric acid : 14.2g NaCl : 5.84g
Buffer B	Elution buffer I (pH 7.0)	Na2HPO4 : 46.8g Citric acid : 6.8g NaCl : 5.84g
Buffer C	Elution buffer II, (pH 7.0)	Na2HPO4 : 46.8g Citric acid : 6.8g NaCl : 584.4g

○ 연구개발 수행결과

- desalting 한 FimA Ab를 ion-exchange chromatography를 수행하여 고순도로 분리 정제 함. 동일한 size의 분자량을 가지고 있는 벼 현탁세포 배양액내에 다른 단백질 들을 제거하고 FimA Ab의 순도를 올리기 위해 단백질의 pI와 salt strength에 의해 분리 정제하였음. 그 결과 아래 그림 그림 323-1-12의 크로마토그램을 보면 pH 7.0 buffer로 eltuion 했을 때 일부 분리되고, 2차로 1M NaCl로 salt의 농도를 올렸을 때 분리되는 것을 확인함. 그림 323-1-13은 각각의 fraction을 12% acrylamide gel에 10 uL씩 loading 하고 silver staining 한 결과를 나타냄. FimA Ab의 fraction #10~25를 모아 최종적으로 salt를 제거하기 위해 desalting 함.



< 그림 323-1-12. Ion-exchange chromatography 수행 후 chromatogram >



< 그림 323-1-13. Ion-exchange chromatography 수행 후 각각의 fraction을 silver staining으로 확인 >

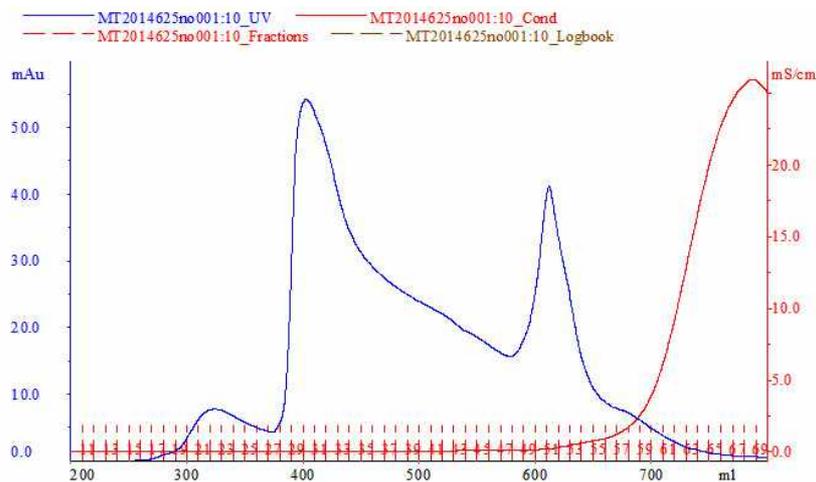
⑥ Ion-exchange chromatography 수행 후 최종 제품을 만들기 위한 Desalting

○ 연구개발 수행내용

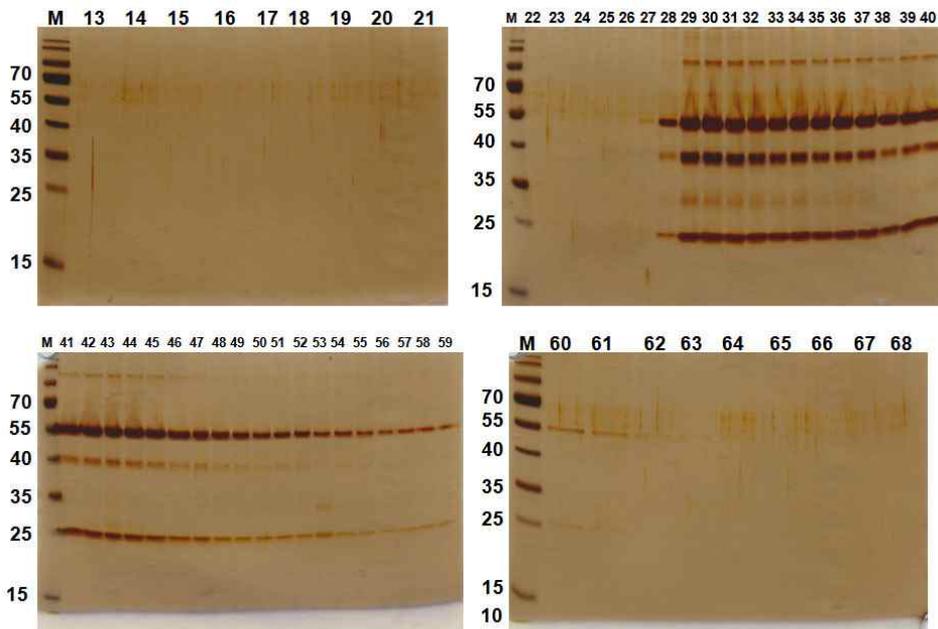
- ion-exchange chromatography 수행 후 fraction #10-25를 모은 후 약 150 mL를 2차에 걸쳐 desalting 수행함. 각각 sephadex G-25가 충전된 desalting column에 80 mL씩 loading 하고, RO수 1L를 elution buffer로 사용하여 desalting 수행함. flow rate는 10 mL/min, fraction size는 10 mL로 수행하였음.

○ 연구개발 수행결과

- Gel filtration으로 desalting 한 후(그림 323-1-14) 각각의 fraction을 silver staining으로 확인 하였고 (그림 323-1-15), silver staining한 후 1,2차 desalting에서 각각 fraction #27-68을 모아 하나로 합치고 다음단계인 제품 포장을 위해 -70도에 overnight 한 후 동결건조를 수행함. 정제한 FimA Ab의 purity는 silver staining으로 약 98% 이상으로 예측됨.



< 그림 323-1-14. Ion-exchange chromatography 이후 1차 desalting 한 chromatogram >



M : size marker 13-68 : fraction #13-68 after desalting, 10 uL.

< 그림 323-1-15. Desalting 후의 silver staining 결과 >

⑦ FimA Ab의 정제 단계별 단백질 정량

○ 연구개발 수행내용

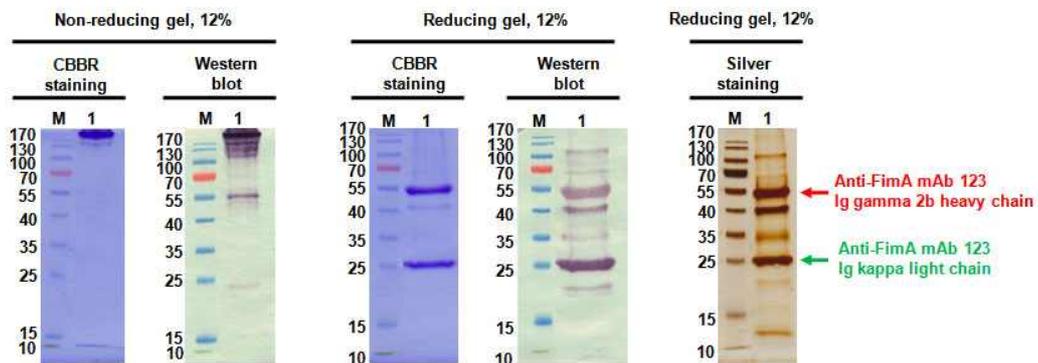
- 각각의 시료를 96 well plate에 각각 5, 10 uL씩 넣고 농도가 진한 경우에는 2배, 5배, 10배 희석하여 5, 10 uL를 첨가하였음. standard BSA, 1mg/mL 0, 4, 8, 12, 16, 20 uL를 사용하여 standard curve를 구하였음. 각각의 시료가 들어있는 well에 D.W를 15 또는 10 uL를 넣고 발색시약 Bicinchonic acid와 4% CuSO₄ mixture를 180 uL를 넣고 30분 동안 37°C에서 반응시킨 후 562nm에서 흡광도를 측정하였음. 흡광도 측정 후 Graphpad prism 4.0 프로그램을 사용하여 단백질의 농도를 분석하였음.

○ 연구개발 수행결과

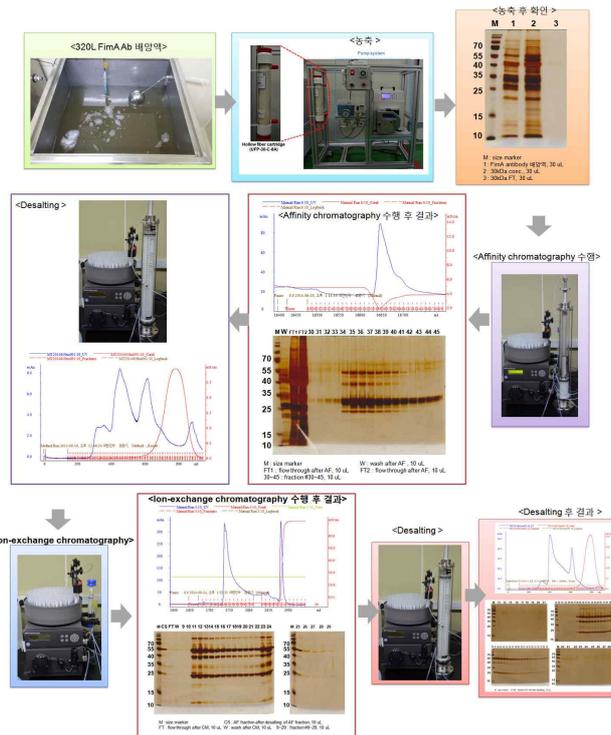
- 정제단계별 단백질량을 정량한 결과 총단백질 약 320g이 존재하는 culture sup. 320L로부터 농축 및 단백질 컷팅을 해서 300g을 회수 하였고, affinity chromatography를 수행하여 타겟단백질, FimA antibody를 1.6 g을 회수 하였음. 이후 1차 desalting과 ion-exchange chromatography를 수행 한 후 약 1g을 회수 하였고, 이를 최종 제품으로 만들기 위해 desalting 하여 순도 98% 이상 FimA Ab를 약 800 mg을 생산 하였음. 그림 323-1-16은 고순도로 분리정제한 FimA antibody의 purity를 확인한 결과임. non-reducing gel과 reducing gel에서 CBBR과 western blot 및 reducing gel에서 silver staining 하여 light chain과 heavy chain 및 purity를 확인하였음.

< 표 그림 323-1-1. 정제 단계별 분리 정제된 단백질 량 >

Purification step	Protein	Total protein	Total volume
	mg/mL	g	mL
Cultuer sup.	1.2 ±0.02	384 ±7.6	320,000
Concentration step	31±1.2	310±13	10,000
Affinity chromatography	15±0.9	1.8±0.014	120
Ion-exchange chromatography	7.3± 0.4	1.1±0.05	150
Desalting	1.08±0.04	0.89±0.06	820



< 그림 323-1-16. anti-FimA mAb의 purity 조사 >



< 그림 323-1-17. 벼 현탁세포 배양액으로부터 FimA 항체 고순도 분리정제 과정 모식도 >

(3) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체의 적정 포장방법 확립

(가) 연구개발 수행내용 및 결과

① 식물유래 anti-FimA 항체에 대한 장기 보존을 위한 적정 포장방법 확립

- 본 연구에서 생산한 FimA Ab의 formulation을 토대로 대용량 제품을 위한 500 ug/mL 이상의 formulation 및 포장 방법을 개발 함. 대용량 포장의 경우 액상 제형은 보관, 운반, 및 다양한 측면에서 장점보다 단점이 많아 생략하고 동결건조 분말 형태의 제형 위주로 개발함. 액상제형의 경우 보관 또는 운반시에 얼렸다 녹이면서 용기의 파손이 생길 수 있기 때문에 완전 동결건조 후 분말 형태로 개발하고 최종 사용자가 제품에 첨가된 PBS에 녹여 분주해서 사용하기 편리하도록 제품 포장방법을 개발하였음.

(나) 연구개발 수행내용 및 결과

① Formulation 1

- 식물 rice에서 발현시켜 98%이상 고순도로 분리정제한 FimA antibody를 PBS buffer (pH 7.2)로 dialysis 또는 Gel filtration column을 사용하여 buffer exchange를 한 후 0.2 um 필터 함. ELISA를 수행하여 antibody를 정량한 후 1 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg이 되게 각각의 vial에 분주하고 동결건조하여 분말형태로 포장. 제품내에 endotoxin free의 10 mL의 RO수를 함께 포장하여 최종 사용자가 액상으로 녹일 수 있도록 함.



< 그림 323-1-18. 각각 10 mL vial에 분주하여 동결건조 수행과정 >

② Formulation 2

- 식물 rice에서 발현시켜 98%이상 고순도로 분리정제한 FimA antibody를 RO수로 dialysis 또는 Gel filtration column을 사용하여 desalting 한 후 ELISA를 수행하여 antibody를 정량하고 1, 10, 50, 100 mg이 되게 각각의 vial에 분주하고 동결건조 하여 분말형태로 포장 함. 제품내에 10mL의 PBS를 함께 포장해 최종 사용자가 사용하기 편리하도록 함.



< 그림 323-1-19. 동결건조 후 라벨을 붙이고 캡핑하여 제품 포장 >



< 그림 323-1-20. 식물유래 재조합 anti-FimA monoclonal antibody 제품 포장 >

(4) 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체의 안정성 확인

① 단기 저장기간에 따른 식물유래 anti-FimA 항체에 대한 안정성 확인

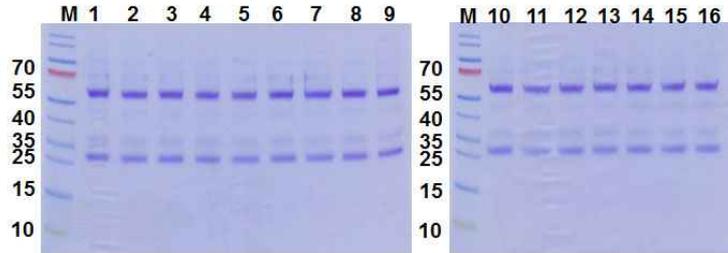
○ 연구개발 수행내용

- 일반적으로 재조합 단백질의 최적 보관방법은 $-20^{\circ}\text{C} \sim -70^{\circ}\text{C}$ 에서 12 month 동안, $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 에서는 1 month 동안 안정하다고 알려짐. 또한 $-20^{\circ}\text{C} \sim -70^{\circ}\text{C}$ 보관하는 동안 freeze-thaw 하게 되면 1 month 까지 안정하다고 알려짐. 하지만 제품의 형태 즉, 분말, 액체에 따라서 그 저장 온도와 방법은 달라짐. 따라서 본연구팀도 일반적으로 알려진 재조합 단백질의 보관방법에 대한 연구를 -70°C , -20°C , 4°C , RT의 조건에서 최적 보관방법을 결정하고자 함.
- 1차년도에 고순도 분리정제 한 FimA antibody 동결건조 분말 1mg을 각각 -70°C 와 -20°C 에 12개월간 보관한 후 1 mg/mL로 녹인 후 SDS-PAGE와 western blot으로 타겟 단백질의 band를 확인 함.

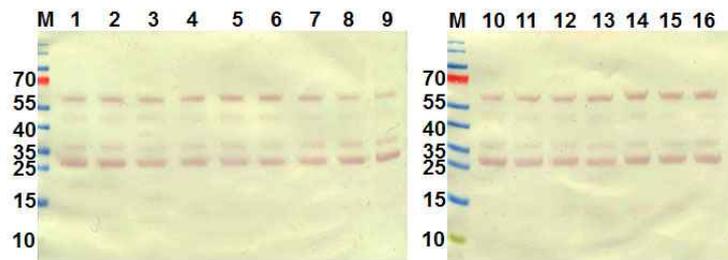
○ 연구결과

- FimA antibody 동결건조 분말을 -70°C 와 -20°C 에 12개월간 보관한 후 확인 결과 안정한 상태로 보관되었음을 확인 함.
- 동결건조 상태에서 -70°C 와 -20°C 에서 1년 이상 보관 가능함을 확인

(A) CBBR staining, -20°C



(B) Western blot, -20°C



M : size marker
 1~16 : 저장기간 1 month~16 month
 (A) Reducing gel, 10 ug loading
 (B) Reducing gel → western blot, 5 ug loading

< 그림 323-1-21. FimA antibody에 대한 안정성 확인 >

② 장기 저장기간에 따른 식물유래 anti-FimA 항체에 대한 안정성 확인

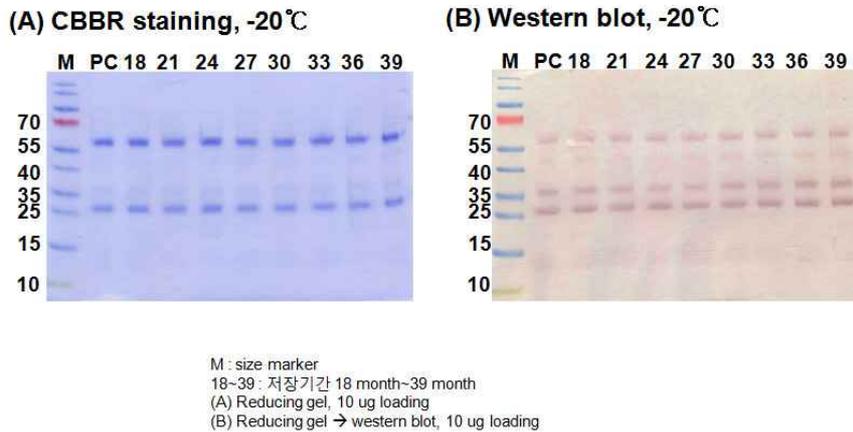
○ 연구개발 수행내용

- 일반적으로 재조합 단백질의 최적 보관방법은 -20°C ~ -70°C 에서 freeze-thaw 하지 않고 보관하도록 알려져 있음. 하지만 제품의 형태 즉, 분말, 액체에 따라서 그 저장 온도와 방법은 달라짐. 따라서 본연구팀도 일반적으로 알려진 재조합 단백질의 보관방법에 대한 연구를 -70°C , -20°C , 4°C , RT의 조건에서 최적 보관방법을 1, 2차년도에 결정하였음.
- 1차년도에 고순도 분리정제 한 FimA antibody 동결건조 분말 1mg을 각각 -20°C 에 39개월간 보관한 후 1 mg/mL로 녹인 후 SDS-PAGE와 western blot으로 타겟 단백질의 band를 확인 함.
- 일반적으로 재조합 단백질의 최적 보관방법은 -20°C ~ -70°C 에서 freeze-thaw 하지 않고 보관하도록 알려져 있음. 하지만 제품의 형태 즉, 분말, 액체에 따라서 그 저장 온도와 방법은 달라짐. 따라서 본연구팀도 일반적으로 알려진 재조합 단백질의 보관방법에

대한 연구를 -70°C , -20°C , 4°C , RT의 조건에서 최적 보관방법을 1, 2차년도에 결정하였음.

○ 연구결과

- 1차년도에 고순도 분리정제 한 FimA antibody 동결건조 분말 1mg을 각각 -20°C 에 39개월간 보관한 후 1 mg/mL로 녹인 후 SDS-PAGE와 western blot으로 타겟 단백질의 band를 확인 함.
- FimA antibody 동결건조 분말을 -20°C 에 39개월간 보관한 후 확인 결과 안정한 상태로 보관되었음을 확인 함.
- 동결건조 상태에서 -20°C 에서 3년 이상 보관 가능함을 확인하였음



< 그림 323-1-22. FimA antibody에 대한 저장 기간에 따른 안정성 확인 (18-39개월) >

2. 식물 viral vector를 이용한 anti-FimA 항체 대량 체계 구축

○ 연구수행기관 : 연구수행기관: 전북대학교, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) Anti-FimA 항체 고발현 담배 시스템 구축

- ① FimA 항체의 transient expression vector에 클로닝
- ② Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환
- ③ Western blot법을 이용한 고 발현 확인

(2) Anti-FimA 항체의 고발현, 생산시스템 구축

- ① anti-FimA 항체의 고발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축

② 효과적인 agroinfiltration 법 구축

(3) Anti-FimA 항체의 대량생산법 구축

① 효과적인 transient expression 시스템을 통한 FimA 항체의 대량생산

② 일시적 고발현 확립조건외의 재현성 검증 및 대량생산 조건 확인

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 최근에 충치 유발균으로 알려진 *P. gingivalis*로 인하여 류마티스의 유발이 보고되고 있고 있으며, *P. gingivalis*에 의한 충치 및 류마티스 유발을 억제 및 치료를 위하여 *P. gingivalis*의 감염에 관여하는 fimbriin에 대한 항체가 주목을 받고 있음
- FimA 항체를 포함한 충치예방을 위한 기능성 가글제, 치약 등의 제품화가 가능하며, 바이오베터로 인정받을 수 있는 신약이 될 수 있음
- 본 연구는 식물 viral vector을 FimA 항체의 대량생산 체계를 구축하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) Anti-FimA 항체 고발현 담배 시스템 구축

(가) 연구개발 수행방법

① FimA 항체의 transient expression vector에 클로닝

- TMV based vector인 pMYV150에 선행연구결과 확보된 FimA 항체의 heavy chain과 light chain 각각을 삽입하여 pMYV151과 pMYV152로 명명하였으며, PVX based vector인 pMYV170에 FimA 항체의 heavy chain과 light chain을 각각 삽입하여 pMYV171과 pMYV172로 명명하였다.

② Electroporation을 이용한 *Agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환

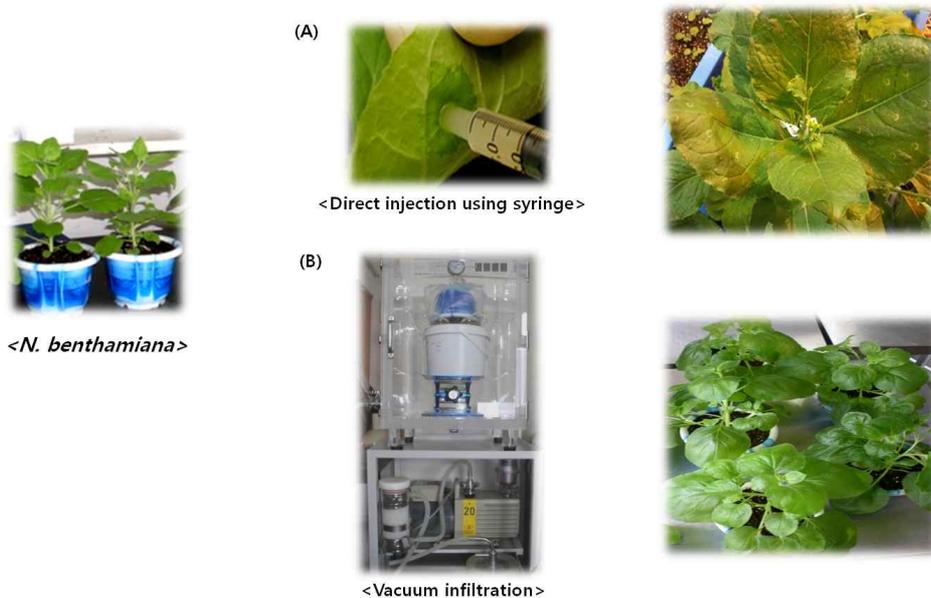
- Electrocompetent agrobacteria cell을 만들기 위하여 agrobacteria (strain GV3101)을 50 mg/L rifampicin이 첨가된 5 ml의 LB medium에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후 agrobacteria 만을 수거하여 항생제를 제거하기 위하여 차갑게 준비된 500ul의 10% glycerol을 이용하여 2번 washing 하였다. Pellet에 차갑게 준비된 100 ul의 10% glycerol로 resuspension 한 후 25 ul를 취하여 미리 차갑게 준비된 EP tube에 분주하여 electrocompetent cell을 준비하였다. 25 ul의 electrocompetent cell에 상기에서 준비된 1 ul의 plasmid DNA를 첨가한 후 미리 차갑게 준비된 cuvette에 mixture를 넣고 ice에서 5분간 방치하였다. GenePulser를 이용하여 1800 kV, 25 uF 그리고 200 Ω 조건하에서 형질전환을 수행하였다. 형질전환 된 electorcompetent cell을 EP tube에 옮긴 후 신선한 1ml의 LB 배지를 첨가한 후 28°C에서 2-3시간 암 상태에서 현탁배양 하였다.

형질전환 된 세포를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에 도말하여 28℃에서 2-3일 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 항생제가 첨가된 배지에서 형성된 단일 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출 한 후 제한 효소 처리로 상기의 유전자들이 성공적으로 도입된 것을 확인하였다.

③ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYV151, 152, 171 그리고 172가 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28℃, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재 현탁하였다. Agrobacterium 현탁액은 OD₆₀₀에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe와 vacuum을 이용하여 infiltration을 수행하였다 (그림 323-2-1).

- Syringe를 이용한 direction injection은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*의 잎의 뒷면에 박테리아 현탁액을 주사기 바늘없이 주사기로 주입함으로써 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 PVX based vector에 삽입되어 있는 light chain 그리고 PVX based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 TMV based vector에 삽입되어 있는 light chain의 혼합 박테리아 현탁액은 각각의 조건당 2개의 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 ℃, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 11일 동안 성장하였고, infiltration 후 5,8 그리고 11일에 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리하였다. Vacuum을 이용한 vacuum infiltration은 전체 식물체를 화분에 있는 흙이 쏟아지지 않게 고정한 후 화분을 뒤집어서 5L의 상기의 아그로박테리아 혼합액에 잠기도록 한 후 -90 kPa에서 1분 동안 vacuum을 걸어서 현탁액 안에 있는 기포를 빼준 후 재빨리 vacuum을 대략 -10 kpa 까지 잠근다. 이때 아그로박테리아 현탁액이 식물체의 잎 안으로 침투되는 것을 육안으로 확인할 수 있다. Vacuum에 의해 infiltration 된 식물체는 22 ℃, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 3일 동안 배양하였다. 1, 2 그리고 3일째 식물의 잎을 수확하여 최대 항체 생산 시기를 결정하기 위한 분석에 사용하였다.



<그림 323-2-1. Agrobacterium infiltration 방법. (A) syringe를 이용한 direct injection, (B) vacuum infiltration >

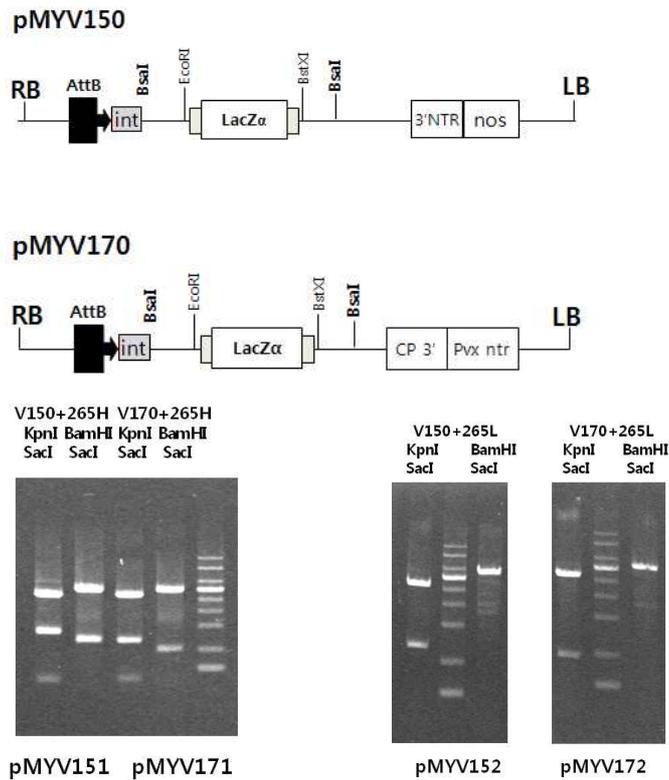
④ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)과 Western blot analysis

- Anti-FimA 항체의 발현을 확인하기 위하여 시간별로 수확한 agrobacterium infiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 μ g의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 non-reducing condition에서 10 % 와 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 poly acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다. Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 Anti-mouse IgG (whole) alkaline phosphatase conjugated (A3562, Sigma), anti-mouse IgG (γ -chain specific) alkaline phosphatase conjugated (A3438, Sigma) 그리고 monoclonal anti-mouse kappa light chain (K2132, Sigma) 등을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:7,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① Anti-FimA 항체의 transient expression vector에 클로닝

○ TMV based vector인 pMYV150에 선행연구결과 확보된 FimA 항체의 heavy chain과 light chain 각각을 *Bsa* I site를 이용하여 삽입하여 pMYV151과 pMYV152로 명명하였으며, PVX based vector인 pMYV170에 FimA 항체의 heavy chain과 light chain을 각각 삽입하여 pMYV171과 pMYV172로 명명하였다 (그림 323-2-2). 각각의 *E. coli* 균주는 agroinfiltration을 위해 agrobacterium strain GV31010에 형질전환 하였다.

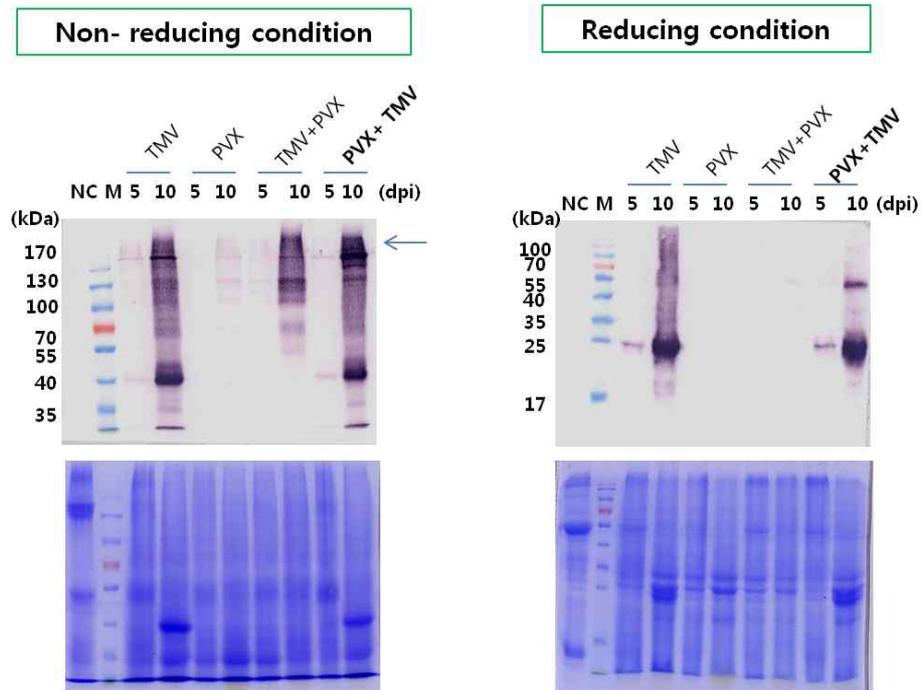


< 그림 323-2-2. TMV based vector (pMYV150)와 PVX based vector (pMYV170)에 FimA 항체의 heavy chain과 light chain의 클로닝 >

② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환

○ 온실에서 4-6주 정도 자란 *N. benthamiana* 식물체를 이용하여 anti-FimA 항체의 고 발현을 위한 TMV based vector와 PVX based vector의 효과적인 조합을 알아보기 위하여 주사바늘을 제외한 주사기를 이용하여 잎 뒷면에 아그로박테리아 혼합 현탁액을 주입하였다. TMV based vector에 각각 삽입된 heavy chain (pMYV151)과 light chain (pMYV152), PVX based vector 각각에 삽입된 heavy chain (pMYV171)과 light chain (pMYV172), TMV based vector에 삽입된 heavy chain과 PVX based vector에 삽입된 light chain 그리고 PVX based vector에 삽입된 heavy chain과 TMV based

vector에 삽입된 light chain 조합별로 infiltration을 수행한 후 5일과 10일째 잎을 수확하여 단백질 분석을 수행하였다. 그 결과 PVX based vector에 삽입된 heavy chain과 TMV based vector에 삽입된 light chain 조합의 경우 infiltration 후 10일째 수확한 잎으로부터 추출한 단백질의 non-reducing condition과 reducing condition SDS-PAGE 및 Western blot analysis에서 whole 항체의 발현이 높게 나타났다 (그림 323-2-3).



< 그림 323-2-3. Transient expression을 통한 FimA 항체의 최적 조건 선발 >

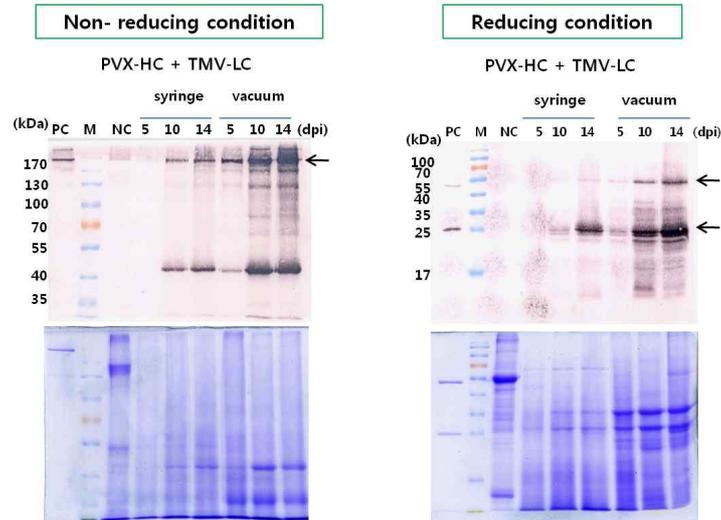
○ FimA 항체의 고 발현을 위한 효과적인 infiltration 방법을 선발하기 위한 다음 실험에서는 PVX based vector에 삽입된 heavy chain (pMYV171)과 TMV based vector에 삽입된 light chain (pMYV152) 조합을 선택하였다.

③ Western blot analysis와 ELISA를 이용한 고 발현 확인

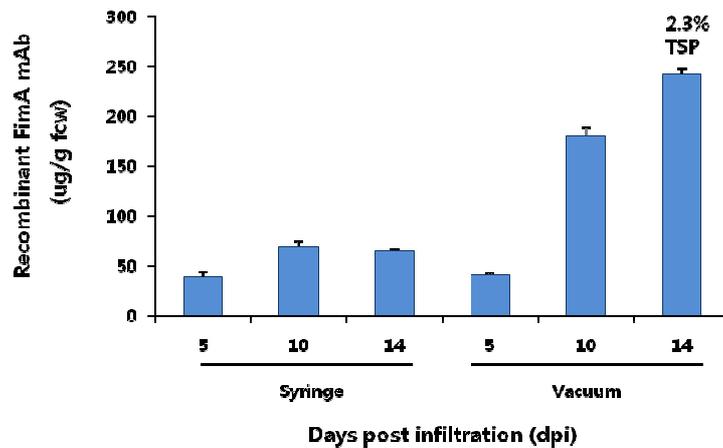
○ PVX-HC (pMYV171)과 TMV-LC (pMYV152)의 조합으로 FimA 항체의 고 발현 조건을 알기 위해 syringe와 vacuum을 이용하여 agroinfiltration을 수행하였다. Infiltration 후 5, 10 그리고 14일 후 잎을 수확하여 추출한 단백질로부터 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다 (그림 323-2-4).

○ 그 결과 vacuum infiltration의 경우 FimA 항체의 고 발현이 확인되었으며, 두 개의 viral system에서 경쟁 없이 각각의 heavy chain과 light chain이 발현되어 성공적으로 assembly가 이루어진 것을 확인하였다. 특히 vacuum infiltration 후 14일째 수확한 잎

샘플에서 FimA 항체의 고 발현이 확인 되었으며, 전체 단백질 중 2.3 %를 차지 하였으며, 생체중량 kg당 242.5 mg의 FimA 항체가 생산됨을 확인하였다 (그림 323-2-5).



< 그림 323-2-4. Syringe와 vacuum infiltration을 이용한 FimA 항체의 고 발현 조건 선발 >



< 그림 323-2-5. ELISA를 통한 FimA 항체의 정량 >

(2) Anti-FimA 항체의 고발현, 생산시스템 구축

(가) 연구개발 수행 내용

① Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYV151, 152, 171 그리고 172가 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L

acetosyringone, pH5.6)에 재 현탁하였다. Agrobacterium 현탁액은 OD600에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe와 vacuum을 이용하여 infiltration을 수행하였다.

- Agroinfiltration은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*를 이용하여 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 PVX based vector에 삽입되어 있는 light chain 그리고 PVX based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 TMV based vector에 삽입되어 있는 light chain의 혼합 박테리아 현탁액은 각각의 조건당 2개의 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 11일 동안 성장하였고, infiltration 후 5,8 그리고 11일에 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리하였다. 또한 FimA 항체의 고 발현을 위한 아그로박테리아 현탁액의 농도를 결정하고자 OD₆₀₀에서 0.3, 0.6 그리고 0.9로 맞추는 후 infiltration을 수행하였다. Vacuum을 이용한 vacuum infiltration은 전체 식물체를 화분에 있는 흙이 쏟아지지 않게 고정된 후 화분을 뒤집어서 5L의 상기의 아그로박테리아 혼합액에 잠기도록 한 후 -90 kPa에서 1분 동안 vacuum을 걸어서 현탁액 안에 있는 기포를 빼준 후 재빨리 vacuum을 대략 -10 kpa 까지 잠근다. 이때 아그로박테리아 현탁액이 식물체의 잎 안으로 침투되는 것을 육안으로 확인할 수 있다. Vacuum에 의해 infiltration 된 식물체는 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 3일 동안 배양하였다. 3,4,5,6,7,8 그리고 9일째 식물의 잎을 수확하여 최대 항체 생산 시기를 결정하기 위한 분석에 사용하였다.

② Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)과 Western blot analysis

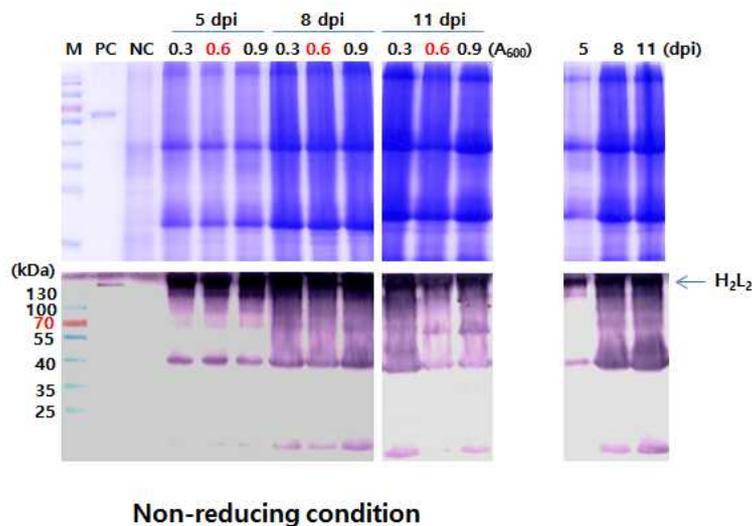
- Anti-FimA 항체의 발현을 확인하기 위하여 시간별로 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 µg의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 non-reducing condition에서 10 % 와 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 poly acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다. Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 Anti-mouse IgG (whole) alkaline phosphatase conjugated (A3562, Sigma), anti-mouse IgG (γ-chain specific) alkaline phosphatase conjugated (A3438, Sigma) 그리고 monoclonal anti-mouse kappa light chain (K2132, Sigma) 등을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:7,000으로 희석하여 실온에서

2시간 동안 반응하였다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① FimA 항체의 고 발현을 위한 최적 아그로박테리아 현탁액 농도 조절

○ FimA 항체의 고 발현을 위한 효과적인 infiltration 방법을 선발하기 위한 다음 실험에서는 PVX based vector에 삽입된 heavy chain (pMYV171)과 TMV based vector에 삽입된 light chain (pMYV152) 조합을 선택하였다. 아그로박테리아 현탁액의 농도를 OD₆₀₀ 0.3, 0.6 그리고 0.9로 맞춘 후 syringe를 이용하여 담배 잎 뒷면에 agorinfiltration을 수행하고 5,8 그리고 11일째 잎을 수확하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다. 그 결과 아그로 박테리아 현탁액 농도 OD₆₀₀ 0.6에서 H2L2의 CCP whole antibody 비율이 높게 나타나는 것을 확인 하였다 (그림 323-2-6).



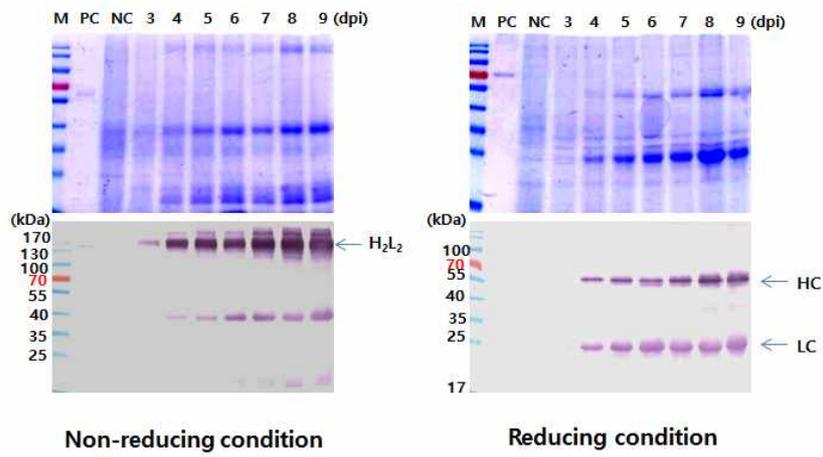
→ **Optimal density of agrobacterial cells (OD₆₀₀ = 0.6)**

< 그림 323-2-6. FimA 항체의 고 발현을 위한 최적 아그로박테리아 현탁액 농도 선별 >

② FimA 항체의 고 발현 시기 결정

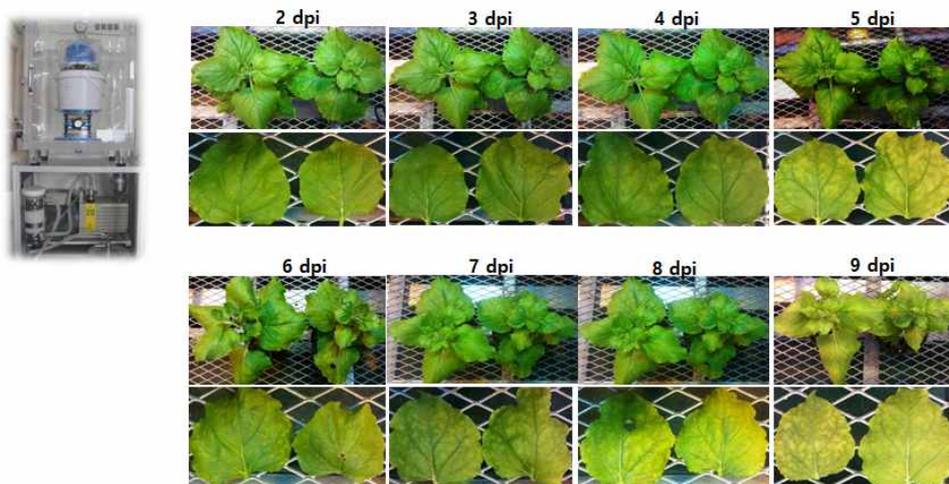
○ FimA 항체의 고 발현을 위한 아그로박테리아 현탁액 농도를 OD₆₀₀ 0.6으로 결정한 후 대량 생산을 위한 식물체 확보를 위해 vacuum infiltration을 위한 조건을 잡기 위해 1차 년도에 확립된 PVX based vector에 삽입된 heavy chain (pMYV171)과 TMV based vector에 삽입된 light chain (pMYV152) 조합을 선택하여 FimA 항체가 최대로 생산되는 시기를 결정하는 실험을 수행하였다. 4-6주 정도 자란 *N.benthamiana* 식물체를 이용하여 vacuum infiltration을 수행한 후 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 그리고 9일 동안 배양한

후 시간별로 식물체를 수확하여 최대 발현량을 확인하기 위한 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다 (그림 323-2-7). 아그로박테리아 현탁액의 농도가 OD600 0.6에서 Vacuum infiltration을 수행한 후 식물체의 상태를 확인 한 결과 배양 7일 이후부터는 식물체의 잎이 노화되는 현상이 관찰되었다 (그림 323-2-8). Western blot analysis를 수행한 결과 FimA 항체의 발현이 5일 이후부터 증가하기 시작하였으며, 7일째 최대 발현량을 보이는 것을 확인하여 FimA 항체의 대량 생산을 위한 agroinfiltration 조건으로 아그로박테리아 현탁액 농도 OD600 0.6에서 vacuum infiltration 후 7일째 식물들을 수확하는 것이 바람직하다고 사료된다.



→ PVX-HC+TMV-LC & TMV-HC+PVX-LC
 → Density of agrobacterial cells (OD600=0.6)
 → Sampling time (7 dpi)

< 그림 323-2-7. FimA 항체의 고 발현을 위한 최적 생산시기 결정 >



PVX-HC+TMV-LC & TMV-HC+PVX-LC
 Density of agrobacterial cells (OD₆₀₀=0.6)

< 그림 323-2-8. Vacuum infiltration을 수행한 후 시간에 따른 식물체의 상태 >

(3) Anti-FimA 항체의 대량생산법 구축

(가) 연구개발 수행 내용

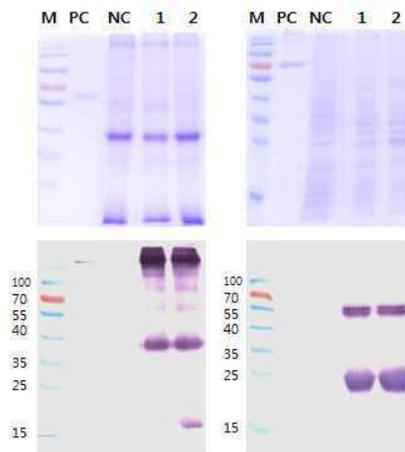
① 효과적인 transient expression 시스템을 통한 FimA 항체의 대량생산

- 2차년도에 정립된 대량생산법을 이용해 단백질을 생산 및 분석에 이용하고 있으며, 반복적으로 수행하였을 때에도 그 발현 수준이 크게 변화하지 않음을 확인하기 위해 생산일이 다른 두 개의 단백질을 이용하여 동일 조건에서 단백질을 추출하여 western blot analysis를 수행하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① 균일한 수준의 Anti-FimA 항체 생산 확인

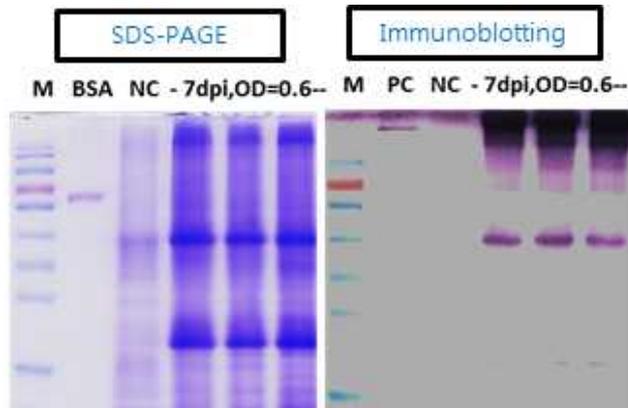
- 기존에 확인된 Anti-Fim A 항체의 발현 수준과 비교하여 보았을 때, 그 양이 크게 변하지 않았음을 확인하였고, 서로 다른 날에 Agroinfiltration하여 harvest해놓은 담배 잎에서 그 발현 수준이 거의 흡사함을 western blot을 통해 확인해 보았을 때, 그 발현 수준이 거의 흡사함을 확인하였다(그림 323-2-9).



< 그림 323-2-9. Western blot을 통한 Anti-FimA 항체의 확인. Non-reducing 조건(좌), Reducing 조건(우) >

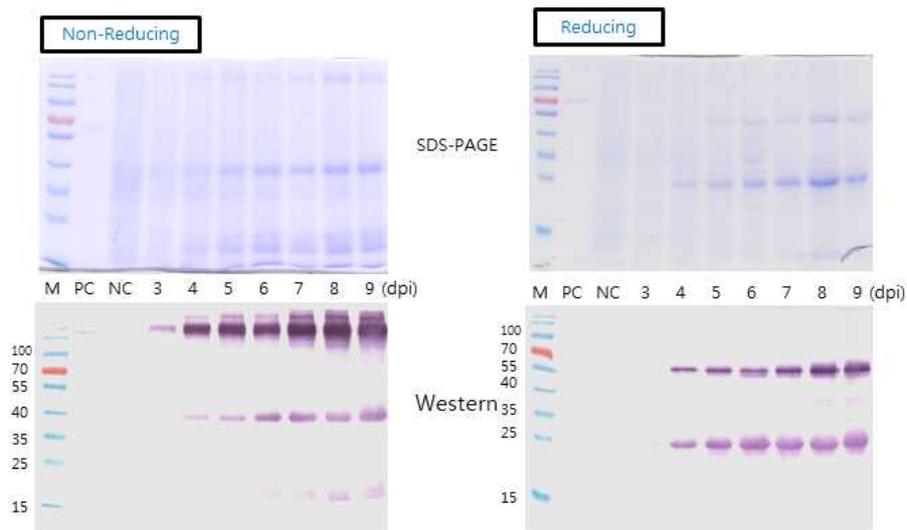
② 일시적 고발현 확립조건의 재현성 검증 및 대량생산 조건 확인

- 3차년도에 정립된 고발현 조건의 재현성 검증을 위하여 FimA 항체(clone 265)의 Heavy chain (HC)과 Light chain (LC)의 발현벡터별, Agrobacterium 농도별, 발현날짜별로 단백질 분석을 수행하였으며 다음과 같이 3차년도의 결과와 같음을 확인함으로써 재현성있는 안정적 기술조건으로 확립됨을 알 수 있었다. PVX 발현벡터 유래의 LC과 TMV 발현벡터 유래의 HC 조합의 공동발현, 각각의 발현벡터가 형질전환 된 *agrobacterium* 현탁액의 농도가 OD₆₀₀에서 0.6의 최적 농도를 식물체로 도입, 그리고 발현 7-8일째 식물체의 수확 조건에서 최고의 발현률을 나타냈다 (그림 323-2-10.)



< 그림 323-2-10. FimA 265항체의 고발현 조건 확인 >

- 위의 결과와 같이 FimA 항체를 식물체에서 일시적으로 고발현 시킬 수 있는 조건을 구축하였으며, 이후 연구내용인 항체의 기능성 확인 및 적정 투여형태 확립에 관한 연구를 위하여 50 여 이상의 *N. benthamiana* 식물체에 FimA 항체 유전자를 vacuum infiltration으로 도입시켜 FimA 항체 단백질 생산을 반복적으로 수행하였고 확보된 식물 추출물을 활용하여 Protein G affinity chromatography를 이용하여 분리 정제 한 후 SDS-PAGE를 통하여 2H2L형태의 whole assembly형태의 anti-FimA 항체를 확인하였으며, 대략 90% 이상의 순도로 정제됨을 확인하였다 (그림 323-2-11.)



< 그림 323-2-11. 대량생산을 통한 FimA 항체 단백질 확인 >

3. 식물유래 anti-FimA 항체 효능검증을 위한 PG-CIA 동물모델 확립 및 효능확인

○ 연구수행기관 : 연구수행기관: 전북대학교, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) PG-CIA 동물모델 확립

- ① *P.gingivalis* 확보하여 투여형태 결정 (extract vs live bacteria, mouth vs intraperitoneal 등)
- ② PG의 투여 횟수 및 방법에 따른 관절염 점수 관찰하여 최적의 PG-CIA 모델 정립

(2) PG-CIA에서 anti-FimA 항체의 효과 조사

- ① PG-CIA모델에 anti-FimA 항체 투여방법 결정 (oral, intraperitoneal, intravenous 등)
- ② anti-FimA 항체의 농도별 관절염 억제효과 관찰
- ③ PG-CIA모델에서 anti-FimA 항체를 처리했을 때 면역학적인 변화 및 염증정도의 변화 조사

(3) Anti-FimA 항체의 환자세포에서 in vitro 효과 조사

- ① RA환자의 치주병변에서 PG complex를 분리하여 culture시행
- ② PG complex에서 anti-FimA 항체를 처리하여 병적인 역할(Fim A고유역할인 접착력) 감소를 조사

(4) Anti-FimA 항체의 환자세포에서 in vitro 효과를 조사

- ① 접착력, PAD enzyme발현 정도, virulence factor의 발현 정도 등 균주의 병독성 약화에 대한 추가 파라미터를 조사

(5) 적절한 anti-FimA 항체 투여형태 확립

- ① Gargle형태의 anti-FimA 항체
- ② Intravenous 투여형태의 anti-FimA 항체
- ③ 고형질의 anti-FimA 항체등의 다양한 형태의 제형을 만들어 억제효과가 좋은 투여형태 결정

(6) 유효성 평가방법 확립

- ① 식물유래 anti-FimA 항체의 유효성 평가방법 확립

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

○ 본 연구는 식물유래 FimA 항체의 류마티스 치료관련 효능을 확인하기 위한 동물모델을 확립하고 효능을 확인하여 최종적으로 유효성 평가방법을 확립하고자 수행하였음

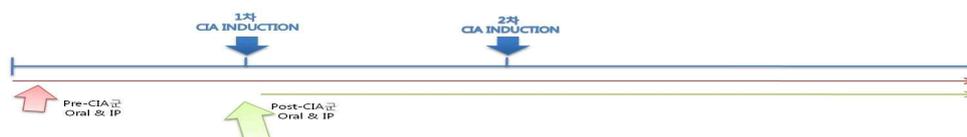
다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) PG-CIA동물모델 확립

(가) 연구개발 수행내용

① 관절염 동물모델의 유도

- *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 균 및 류마티스 관절염의 상관관계를 연구하기 위해 관절염 동물 모델을 제조한 것으로서, *P. gingivalis* W83 및 2561 균주로 6주령 암컷쥐(DBA/1J; 오리엔트 바이오에서 입수) 실험군 당 5마리 씩을 각각 감염. 우선, *P. gingivalis* 균의 전달 경로를 상징하기 위해, 구강투여(oral) 및 복강투여(IP) 균으로 나누어서 수행함. 또한, 관절염을 유도하는 시점을 기준으로 일주일 전부터 균을 먼저 투여하는 균을 Pre균으로 명명하였으며, 관절염 유도 후 균을 투여하는 균을 Post로 명명하여 진행하였다. 관절염으로의 유도는 0.05M 아세트산(acetic acid)에 녹인 2mg/ml 농도의 제2형 콜라겐(type II collagen)(Chondrex) 및 완전 프로인트 면역증강제(complete Freund's adjuvant, CFA) (Chondrex) 4mg/ml 을 1:1(v/v)의 비율로 섞은 후 이 혼합액 100ul를 쥐에 1차 피하주사 하였다. 이로부터 3주 뒤 2차로 제2형 콜라겐(type II collagen) 5mg/ml 및 불완전 프로인트 면역증강제(Incomplete Freund's adjuvant, IFA)(Chondrex) 5mg/ml을 1:1(v/v) 비율로 섞은 후 혼합액 50ul를 피하주사 하였다.
- 구강투여는 실제 감염경로와의 유사성을 나타내기 위해 주 5일 동안 입안에 직접 투여하는 방식을 사용하였으며, 복강투여는 균의 복강 내 침입으로 쇼크사할 수 있는 가능성을 배제하기 위하여 3일에 한번씩 주2회 투여를 기본으로 진행하였다.
- *P. gingivalis* W83 또는 2561 균주를 구강 또는 복강을 통해 감염시킨 후 관절염을 유도한 경우(Pre)에는, 관절염 유도(즉, 제2형 콜라겐의 2차 투여시점) 0일을 기준으로 -28일부터 계속 투여하였으며, 또한, 관절염을 유도한 후 *P. gingivalis* W83 또는 2561 균주를 구강 또는 복강을 통해 투여한 경우(Post)는 상기 2차로 제2형 콜라겐(type II collagen) 5mg/ml 및 Incomplete Freund's adjuvant (IFA)를 주입한 날을 0일로 하여 이를 기준으로 -20일부터 +28일까지 투여하였다.
- 투여한 *P. gingivalis* W83 및 2561 균주는 모두 1×10^9 CFU의 세포를 사용하여 PBS 에 혼합한 후 구강투여의 경우에는 최종 50ul, 복강투여의 경우에는 100ul를 사용하였다. 하기 관절염이 유도된 쥐를 제조하는 구체적인 방법들에 있어서, 균주의 농도, 제2형 콜라겐 및 면역증강제의 농도 및 처리 기간 등은 모두 상기와 동일하며, 다만 균주의 종류, 균주의 투여경로, 투여시점을 달리한 것으로 실험에 사용하였다 (그림 323-3-1).



< 그림 323-3-1. 관절염 동물 모델과 균주 감염 계획표 >

② 동물 모델에서의 관절염의 평가

- 관절염 유도를 통한 동물모델에 대해 류마티스 관절염 유도 후 쥐의 사지가 부어오르는 것을 육안으로 관찰한 후, 각 다리당 0 내지 4점으로 붓기에 따른 점수를 부여한 후 환산하여 RA 스코어를 측정하였다.
- 구체적인 기준으로, 0점은 다리가 전혀 붓지 않은 상태이며, 1점은 발가락이 하나 또는 두개가 부은 상태로 설정하였다. 2점은 1점을 포함하는 상태로 발바닥 혹은 발등이 부은 상태이다. 3점은 2점을 포함하여 발목이 부은 상태를 말하며, 4점은 앞에서 언급한 사항들을 포함하여 매우 심하게 부어 오른 상태를 의미한다.

③ 세포염색을 통한 관절염 심화정도 측정

- 관절염의 심화정도를 측정하기 위하여 관절의 상태를 확인하기 위한 염색실험을 수행하였다. H&E 염색법(staining) 및 사프라닌 O 염색법을 이용하여 세포를 관찰하였다. 쥐의 뒷발을 파라핀으로 고정시킨 후 절단하여 조직 염색을 실시하는 방법으로 수행하였다.
- H&E 염색법(staining)의 경우, 자일린(xylene) I 과 자일린(xylene) II 에서 15분간 탈파라핀(deparaffin)과정을 거쳐 100% 에탄올, 90% 에탄올, 80% 에탄올, 70% 에탄올 (hydration 함수) 순으로 각각 5분씩 통과시키고, 수돗물에서 5분간 세척 후 Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich HHS32)으로 10분간 염색한 후 수돗물로 충분히 세척한 뒤 1%HCl에 2-3회 살짝 담근 후 0.2% 암모니아수에 2-3회 세척작업을 거쳐 Eosin(Sigma-Aldrich HT110132)으로 1분 30초간 염색 후 세척하였다. 70% 에탄올, 80% 에탄올, 90% 에탄올, 100% 에탄올 (dehydration 탈수) 순으로 통과시킨 후 자일린(xylene)에 담가 봉입(mounting)과정을 진행하여 관찰하였다.
- Safranin O 염색의 경우 상기 H&E 염색법(staining)과 동일한 과정을 수행하고 염색약만 다른 것을 이용하였으며 이 때에는 Weigert's iron hematoxylin (Sigma-Aldrich HT1079-1SET)와 Fast green(FCF, Sigma-Aldrich F7252-5G)으로 5분간 염색한 뒤에, 1% 아세트산에 2-3회 살짝 담그고, Safranin o(Sigma-Aldrich S2255-25G)로 5분간 염색한 후 수돗물에서 세척 후 동일한 봉입과정을 수행하였다.

④ Mouse TNF- α and IL-6 ELISA(Enzyme-linked immunosorbant assay)

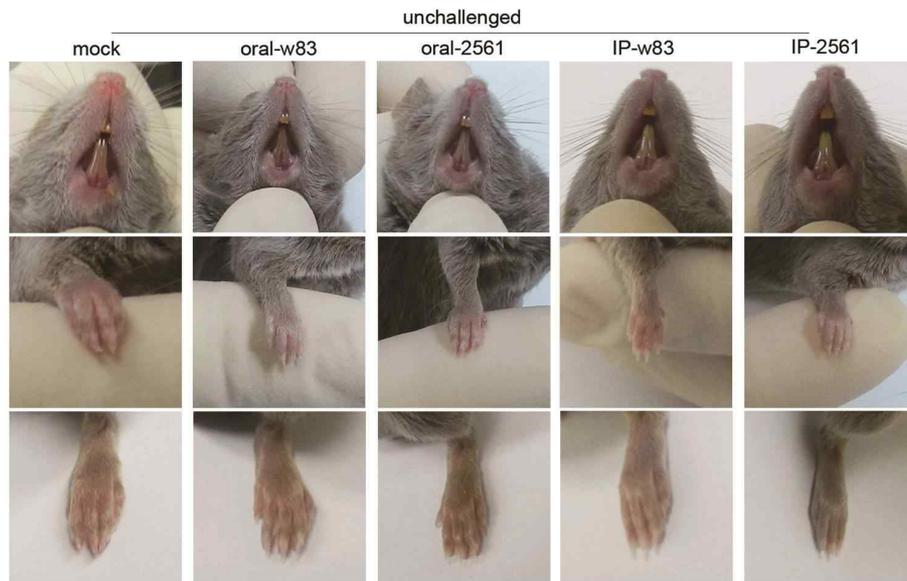
- 안와 채혈을 하여 마우스의 혈액 샘플을 얻음. 얻은 혈액 샘플은 상온, 12,000rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. *P. gingivalis* 균의 접종과 관절염 유도가 마우스 체내의 염증성 사이토카인인 TNF- α 에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 ELISA를 수행하였고, kit(mouse TNF alpha ELISA ready-set-go!, Cat REF# 88-7324-88, eBioscience)의 protocol에 따라 진행하였다.

○ 96 microwell plate(Cat REF# 439454, Nunc)에 anti-mTNF-a 항체(250x)를 1x로 희석한 후, 100μl 씩 넣고 4℃에서 overnight하였다. Washing buffer로 다섯 번씩 washing한 뒤, 1x assay diluent를 한 well 당 200μl 씩 넣어 1시간 동안 실온에서 blocking 후 다시 washing을 다섯 번 수행하였다. 지정된 well에 mouse TNF alpha를 넣어 standard를 로딩하고 나머지 well은 쥐의 혈청 샘플을 PBS에 희석한 뒤, 100μl 씩 넣고 실온에서 2시간 동안 incubation하였다. Washing을 다섯 번 수행한 후, detection antibody인 anti-mouse TNF alpha biotin(250x)을 1x로 희석한 후, 각 well에 100μl 씩 넣고 실온에서 1시간 동안 incubation한 후 Washing과정을 거쳐 avidin-HRP를 1x로 희석하고 100μl 씩 well에 넣고 30분 동안 incubation하였다. Incubation이 끝나고 최종적으로 washing을 진행한 후, TMB substrate solution을 100μl 씩 넣고 상온에서 15분 동안 incubation하였다. 50μl의 stop solution을 첨가한 뒤, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 위와 동일한 방법으로 anti-IL-6 antibody를 사용하여 IL-6 s농도를 측정하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① 시기와 접종방식에 따른 관절염 동물 모델 유도

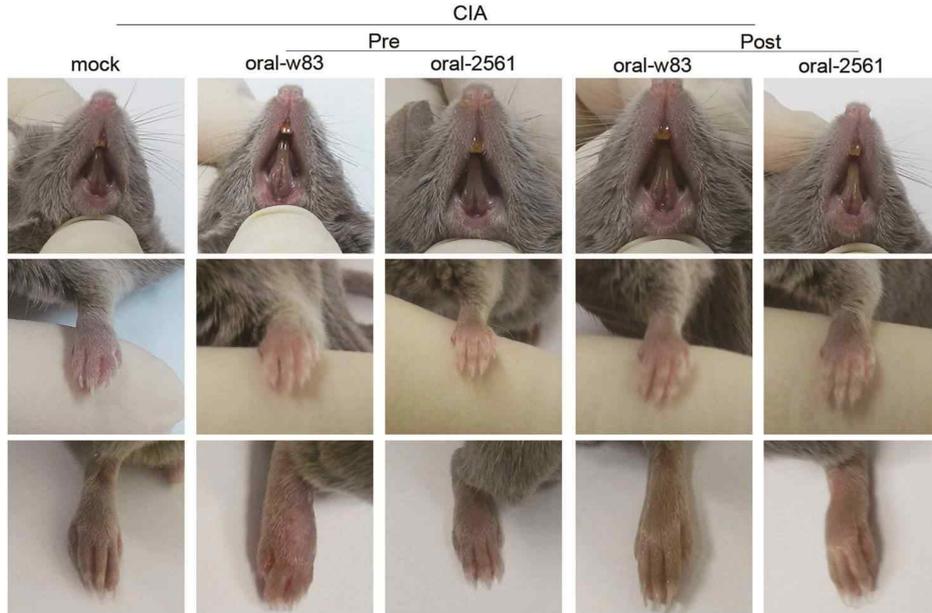
- *P. gingivalis* 균과 류마티스 관절염과의 상관관계를 밝히기 위해 류마티스 관절염 동물모델을 기반으로 실험을 진행하였다. *P.gingivalis*균의 적합한 전달 경로를 상정하기 위해 구강내 투여(oral)균과 복강내 투여(IP)균으로 구분하여 진행하였으며 *P.gingivalis*균주의 종류에 영향을 받을 수도 있기에 FimA의 기능적 돌연변이로 알려진 W83과 정상적인 2561 이라는 두 종류의 *P.gingivalis*균을 이용하여 실험을 수행하였다.
- 균의 투여 시기 역시 본 실험에 어떠한 영향을 끼치는지 아직 정해진 바가 없기에 관절염을 유도하는 시점을 기준으로 일주일 전부터 균을 투여하는 균을 Pre균으로 명명하였으며, 관절염 유도 후 균을 투여하는 균을 Post명명하여 실험을 진행하였다. 이때 사용되는 균류는 전날 미리 배양하여 정상적인 성장과정을 확인한 뒤에 신선한 균류의 상태로 접종하였다. 이때 관절염의 유도시기 중 2차 부스팅 시기를 실험 기준 날짜 0일로 상정하고 실험을 진행하였다. 기본적으로 pre균의 경우 -28일을 시점으로 관절염을 유도하기 전에 균을 접종하여 실험을 진행하였다. 또한 Post의 경우는 2차 부스팅 0일을 기준으로 -20일 투여 하였다. (그림 323-3-2, 323-3-3, 323-3-4).



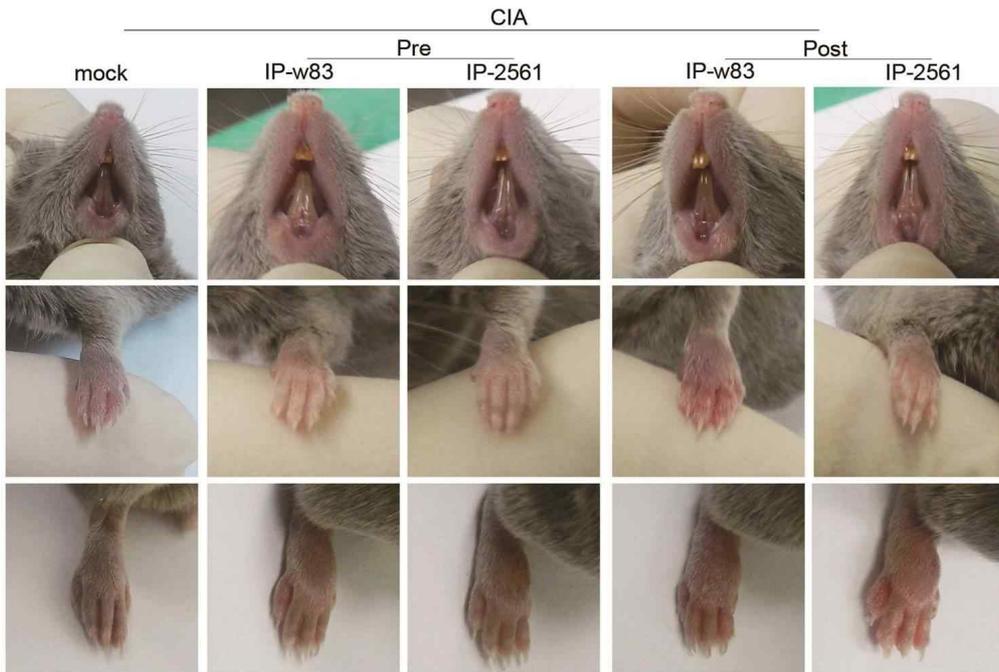
< 그림 323-3-2. 정상 그룹에서의 *P. gingivalis* 감염시치아와 각발의 붓기정도 >

- 그림 323-3-2에서 알 수 있듯이 쥐의 경우 관절염을 유도하지 않은 상태에서 *P. gingivalis* 가 감염 되더라도 잇몸의 작은 출혈외에 관절염의 붓기나 다리의 이상이 관찰되지 않았다. 또한 pre와 post에서도 특정한 차이를 보이지는 않으며, 관절의 붓기와 행동적 이상에서도 차이를 나타내지 않았다.
- 특히 구강 투여를 실시한 군에서 잇몸에 약하나마 출혈이 관찰되지만, 균에 의한 것이라 단정 짓기에는 주변의 조직의 색의 변화가 미비 하며, 출혈 정도 역시 크지 않아 부족하다고 판단되어진다.
- 흥미로운 것은 복강 내 균의 투여는 기존의 보고에 의하면 외부물질로 인한 면역 반응의 촉진을 유도할 수도 있을 것처럼 보이지만, 실제로 일주일동안 그러한 반응은 보이지 않았다. 이는 균주의 도입만으로는 충분한 면역 반응을 유도하지 못하며, 더불어 치주 감염균으로 결정적인 면역반응을 일으킬 만큼 치명적인 양의 균주를 본 실험에서 사용하지 않았기 때문이다.
- 하지만, 그럼에도 기본 가설을 증명하기 위해 관절염을 각 군에서 유도시킨 뒤에 초기 설계에 따라 균을 감염시킨 군에서는 균의 감염시기, 감염 방법 그리고 감염 균주의 종류에 따라 관절염 유도 정도의 차이가 나타나며 특히 쥐의 뒷발의 붓기가 특이적으로 부어오르는 것을 관찰할 수 있었다. (그림 323-3-3, 323-3-4).
- 그림 323-3-3의 구강내 투여군은 실제 감염경로의 유사성을 보이기 위해 매일 입안에 직접 투여하는 방식을 택했으며, 앞서 설명한 것과 같이 pre와 post로 명명되는 관절염 유도 시기 이전의 감염과 이후의 감염으로 나누어 실험을 진행 하였다. 각 균주의

감염시에 사용되는 균주의 양은 동일하게 수행되었으며 이로 인해 관절염만을 유도한 CIA균과의 동등한 비교를 하고자 균주를 처리하지 않는 군에는 균을 녹인 PBS만을 투여 하였다.



< 그림 323-3-3. *P. gingivalis*의 구강감염 (oral)을 통한 관절염의 유도 >



< 그림 323-3-4. *P. gingivalis*의 복강내 감염 (IP)을 통한 관절염의 유도 >

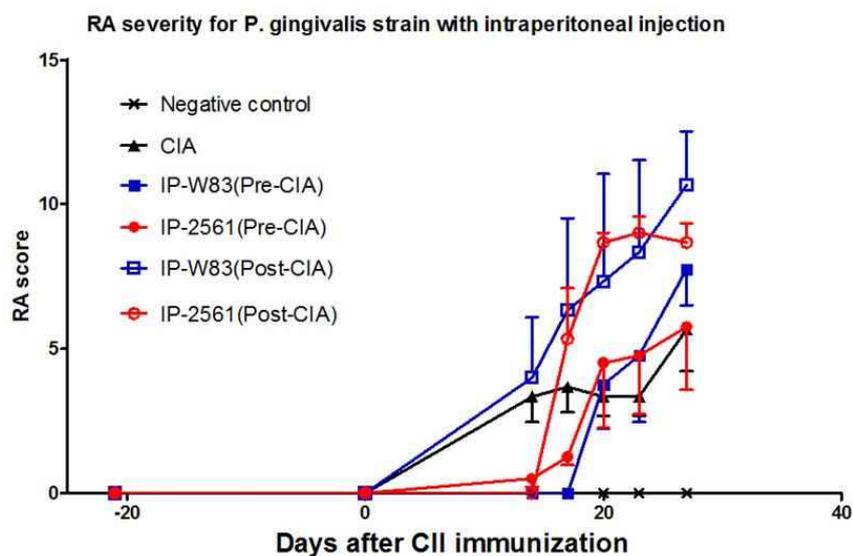
- 관절염을 유도하기 전이나 혹은 유도한 뒤에 균을 처리한 pre와 post 모두에서 기본적으로 균을 처리하지 않은 채 관절염을 유도한 CIA군 이상의 수치로 앞발과

뒷발이 모두 부은 것을 관찰할 수 있었다. 또한 관절염을 유도하지 않은 채 균만을 감염시켰던 그림 323-3-3에서의 사진과는 달리 구강내의 상태도 육안으로 더욱 좋지 않은 것을 확인 할 수 있었다.

- 그림 323-3-4의 복강내 투여균은 균의 복강내 침입으로 쥐가 쇼크사를 할 수 있는 우려를 배제하기 위해 3일에 한번씩 주 2회 투여를 기본으로 실험을 진행하였다. 기존의 연구결과에서도 균에 의한 면역반응을 보기 위해 균을 복강내에 투여하는 경우가 있으나, 이 경우 균의 양이 너무 많거나 면역 반응이 과하게 발생할 경우 쥐의 사망에 이르게 할 수 있는 것으로 보고되었다. 이에 본 연구팀은 관절염을 유도하지 않은 쥐 균을 통해 복강내 균을 투여해도 적당한 지를 먼저 확인하고 실험을 진행하였다. 쥐의 복강내 투여할 균주의 수치와 횟수를 상정하였다.

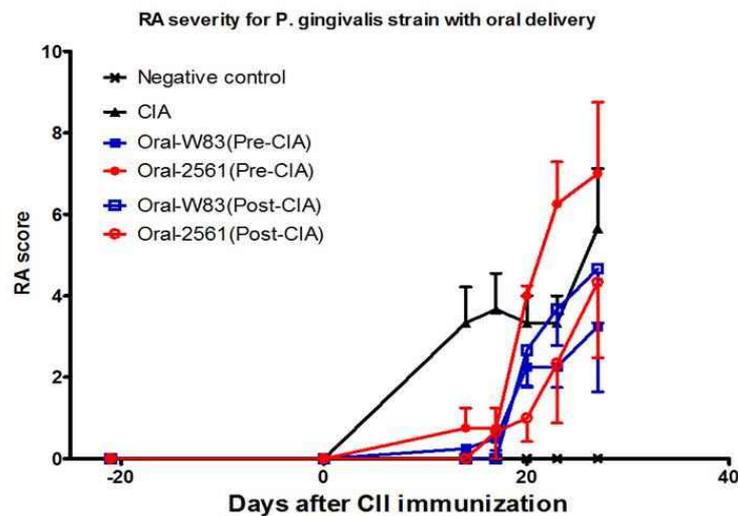
② 관절염 동물 모델의 평가

- 관절염의 유도 정도를 조사하고자 일반적으로 사용되는 관절염 평가방식과 조직 염색을 통해 실험을 수행하였다. 각각의 균들의 조합으로 나누어 Pre와 Post균의 시기에 따라 관절염을 유도하는 시점에서 나누어 실험을 진행하였고, 관절염 유도후 쥐의 사지가 부어 오르는 것을 각 다리당 0~4점으로 붓기에 따른 점수를 명기하여 환산하였다. 관절염 평가는 3일에 한번을 기준으로 주기적으로 수행 기록하였으며, 각 다리의 붓기를 합한 뒤 그에 따른 평균 수치를 계산하였다.
- 각 다리 별로 4점을 최고 점수로 하기에 가장 붓기가 심한 경우가 16점이 되며, 일반적인 CIA모델에서는 8~10점을 기록하도록 되어 있다. 그림 323-3-6은 균주 별로 복강 내로 균을 투여하였을 경우의 관절염 수치를 보여줌.



< 그림 323-3-5. 균주별 복강 감염시 관절염 환산 점수표 >

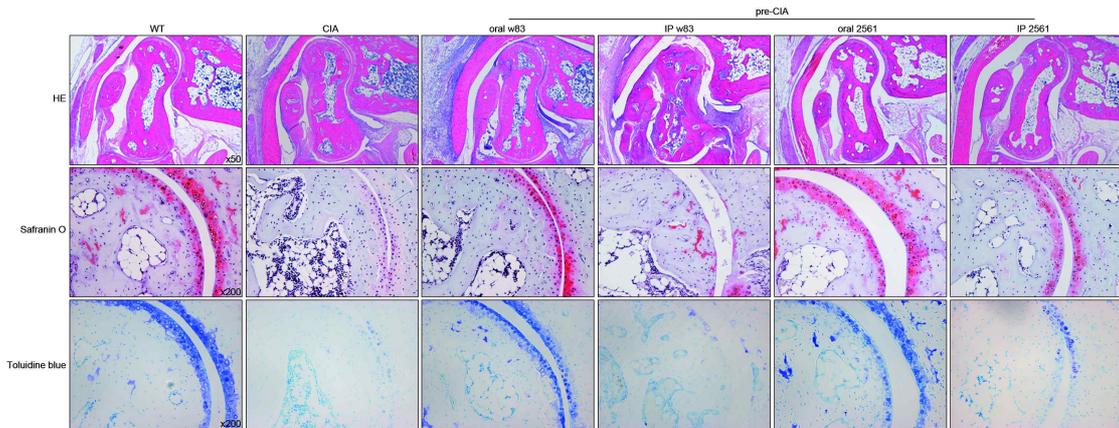
- 그림 323-3-5에서 보듯이 기존에 알려진 방법처럼 복강 내로 균주를 도입할 경우 관절염의 형성 시기를 기준으로 관절염 유도 전에 균을 도입시키는 것보다 관절염 유도 후에 균을 도입시키는 것이 효과적으로 사료된다. 또한 균주의 종류에 상관없이 두 개의 균주 모두 관절염 유도에 있어서 악화시키는 영향성을 보여줌.
- 이는 복강으로의 균주의 투여가 균의 종류에 상관없이 면역 반응을 유도한다는 것을 의미한다. 하지만, 단순히 아무런 자극없이 복강내의 투여만으로 면역 반응을 유도하거나 면역 반응으로 인한 부작용을 유도하는 것은 아니며, 관절염을 유도 한 뒤에 만이 이러한 자극이 강하게 이루어진다는 것을 알 수 있었다.
- 특히 균주의 노출 시간이 매우 긴 pre균의 경우에는 균의 노출 시간과 반비례의 경향성으로 관절염을 유도하는 현상을 관찰할 수 있었으며 결과에서 알 수 있듯이 post균의 관절염 유도군에서의 균 감염은 균의 종류와 관계없이 단순한 관절염 유도군이 CIA보다 더 높은 관절염 유도 수치를 보여주고 있으나, pre의 경우는 균주의 적용과 무관하게 CIA와 동일한 관절염 유도 수치를 보여주는 것을 알 수 있었다. 이는 단순히 관절염을 유도하기 위해 균의 노출이 무조건적으로 관절의 면역 반응을 악화시키기 보단 오히려 장시간에 노출된 균주에 대해서는 면역 반응성이 이미 생겨버린 항체나 또는 앞서 일어난 면역반응에 의해 역치 이하의 값을 갖는 것은 아닌지 고려할 수 있는 부분이 된다.
- 기존에 알려진 바에 따르면 W83과 2561의 감염성과 병원성이 FimA 분자에 의해 매우 다른 것을 고려할 경우 복강내의 감염으로 인한 관절염의 악화는 FimA 분자에 존재나 혹은 그 기능 여부와는 관계가 없는 것처럼 보여진다. 이런 실험 결과는 향후 본 과제에서 수행하고자 하는 anti-FimA 항체에 의한 관절염 억제 효과를 측정하기 위한 동물모델로서는 적절치 못한 모델이 될 수 있다는 것을 시사한다.



< 그림 323-3-6. 균주별 구강내 감염 시 관절염 환산 점수표 >

- 실제로 구강내 세균이 감염하는 경로는 구강에서의 감염이다. 이에 본 실험에서는 실질적 감염 경로를 재현하고 비교하기 위하여 그림 323-3-6에서 얻은 방식과 다르게 구강내부를 통해 *P. gingivalis*를 감염시켰다. 이렇게 동일한 방식으로의 감염과 균주를 사용하였으며, 동일한 시기에 복강내 감염을 구강 내 감염으로 바꾸어서 실험을 수행하였으며 흥미로운 것은 구강내를 통해 균주의 감염을 시킬 경우는 복강내 감염과는 다른 결과를 도출해 낸다는 것이다 (그림 323-3-6).
- 구강내의 감염에서도 마찬가지로 관절염 유도 시기 이후에 균을 도입시키는 것에서도 관절염을 악화시키는데 현상이 나타나기는 하지만, 그리 크게 영향을 준다고 고려하기는 힘들다고 사료된다. 또한 구강 내 감염에서는 균주의 차이와 상관없이 감염 시기만이 영향을 주는 것에 반해 흥미롭게도 구강 내 감염 시에는 균주의 종류에 영향을 받는 현상을 관찰할 수가 있었다.
- 결과에서 볼 수 있듯이 관절염의 악화 현상을 가장 강력하게 나타내는 것이 바로 관절염 유도 전부터 노출된 균주의 영향과 FimA의 기능성 돌연변이인 W83과는 다르게 2561만이 관절염을 악화 시킨다는 것을 확인 하였다. 이러한 원인은 향후 과제를 통해 면밀히 조사할 필요가 있으나, 현재로서는 FimA의 존재 유무가 구강 내의 균주의 감염을 좌우하며, 이렇게 유도된 구강내 감염이 관절염을 악화 시킨다는 것을 알 수가 있다.
- 따라서 이렇게 해서 설정된 동물 모델의 경우 FimA에 대한 확연한 차이를 보이기에 향후 과제에서 진행하고자 하는 anti-FimA 항체의 기능을 테스트 하기 위한 동물 모델로서 매우 좋은 모델이라고 고려된다. 즉 anti-FimA 항체의 존재 유무에 맞추어 2561 균주를 관절염 유도 이전부터 구강을 통해 감염시킬 경우 후에 그 항체의 성능에 따른 차이를 보일 수 있을 것으로 기대한다. 앞선 결과에서 관절염의 붓기를 수치화 시키는 방식을 통해 각 감염 방식과 균주에 따른 변화 그리고 감염 시기에 따라 관절염 악화 정도가 달라지는 것을 확인하였다.
- 이렇게 해서 관절염을 FimA분자 의존적으로 악화 시키는 동물 모델이 무엇인지를 설정할 수 있었지만, 단순히 관절염의 붓기 수치로만은 정확하게 판단하는데 무리가 있기에 관절염을 유도하여 악화시킨 쥐의 관절을 이용하여 특정 관절 부위에서 관절염 특이적으로 발생하는 조직적 소견을 통해 관절염 붓기를 수치화 시킨 것과 동일한 효과를 갖는 결과가 나타나는 지를 확인하고자 하였음. 그래서 염색실험을 통해 관절의 상태를 확인하였다.
- 그림 323-3-7의 결과에서는 관절염을 유도하기전에 균주를 감염시킨 결과에 대한 조직 데이터를 모아 나열하였다. 결과에서 보이는 것처럼 H&E 염색을 수행하였을 때 관절염을 유도하지 않은 WT군에서는 매우 선명하고 깨끗한 뼈 모양의 관절을 확인할 수가 있으나 이와는 대조적으로 CIA군에서는 뼈 주변을 덮고 있는 활막 조직이 부풀어 올라 있으며 뼈를 향해 자라나며 침윤 현상이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 또한

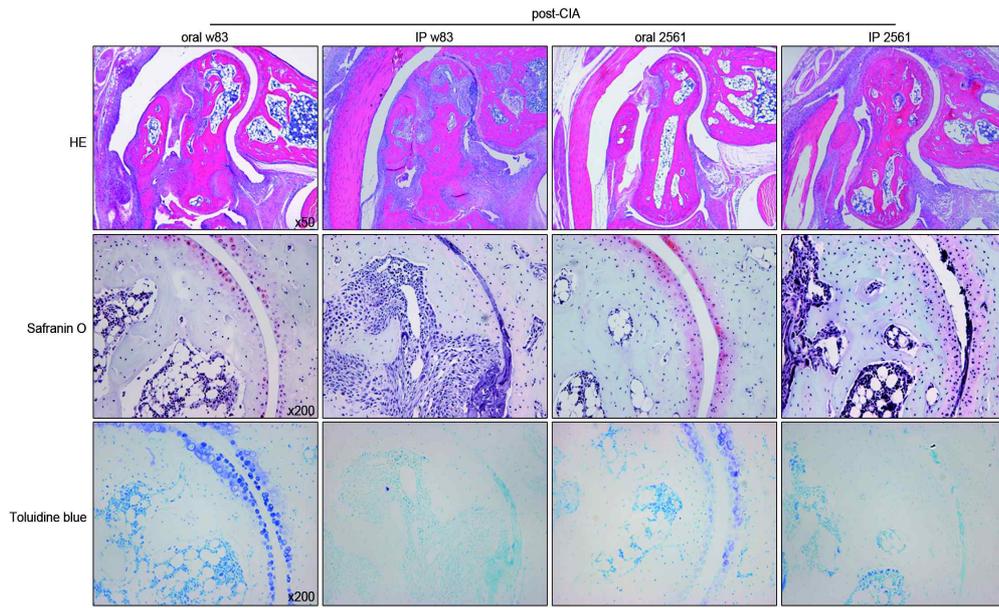
그렇게 부풀어 오르고 부어 오른 활막 조직 사이 사이에 면역 세포들이 자리하여 자주색으로 강하게 염색되어 있는 것을 볼 수가 있었다.



< 그림 323-3-7. 관절염 유도에 따른 조직 염색 실험 결과 (관절염 유도 전, pre) >

- 이와 동시에 균주를 감염시킨 샘플들에서는 더욱 심한 뼈파괴가 발생되고 있는 것을 볼 수 있는데, 이러한 뼈 파괴와 활막세포의 증식, 그리고 침윤 현상들을 관찰 할 수가 있었다. 그림 323-3-7에서 볼 수 있듯이 구강 감염의 경우 관절염 발생 이전 시점부터 균주를 감염시킨 pre군의 경우 균주의 종류에 영향을 받는 것을 알 수가 있었다. pre군의 W83의 경우는 관절의 파괴 정도나 연골의 염색 상태 모두 WT과 유사한 것을 보여주고 있으나, 2561을 감염시킨 pre군의 경우에는 관절염이 심하게 진행되어 H&E 염색의 결과가 쥐의 관절 부분의 뼈가 파괴되었으며, 주변의 활막 세포가 정상 세포와는 달리 과다 증식을 통한 과형성 되어 있음을 확인할 수가 있음.
- 또한 자주색의 세포를 염색하는 염색 시약의 진하기를 통해 과형성 되어진 활막 주변 조직에 얼마나 많은 면역 세포들이 모여 있는지를 추정할 수 있다. 대표적인 관절의 형성 조직인 연골 조직의 경우, 사프라닌 O 염색과 툴루이딘 염색을 통해 연골의 파괴가 관절염의 심화정도에 따라 파괴되어 검출되지 않는 것을 확인 할 수 있다. 이러한 결과는 이전에 언급한 관절염 수치의 결과가 일치되게 나타난 것을 알 수 있는데, 특별히 관절염 유도 이전 시점에서부터 균주를 도입한 pre군의 차이가 더욱 특이적으로 나타난다.
- 구강투여의 경우 관절염 발생 이전부터 2561균주를 이용하는 것이 효과적이며, 이러한 현상은 W83에서는 나타나지 않으며, 이런 결과가 앞선 관절염 붓기를 수치화한 그래프에서도 동일하게 나타남을 알 수 있다. 하지만, 복강내 투여의 경우는 pre에서도 매우 강력하게 균주와 상관없이 관절염이 유도됨을 알 수 있다.
- 그림 323-3-8에서는 앞서 언급한 것과 마찬가지로 관절염 유도이후 각 균을 감염시킨 결과를 확인할 수 있었다. 뼈파괴의 정도와 활막의 증식등을 각종 염색을 통해서

고려할 경우 앞선 관절염 붓기를 수치화 시킨 결과 매우 유사하게 나타난다는 것을 확인 할 수 있었으며 침윤 현상은 이전에 보여주었던 관절염 붓기 수치와 동일하게 관절염 유도 이후 균인 post균에서 나타나고 있다. 또한 붓기를 수치화 시킨 그래프에서 나타내는 것과 일치되게 균주의 종류와 상관없이 모든 균주에서 post시기에 감염을 유도하였을 때 뼈 파괴와 활막 세포의 증식이 두드러지게 관찰 되었다.

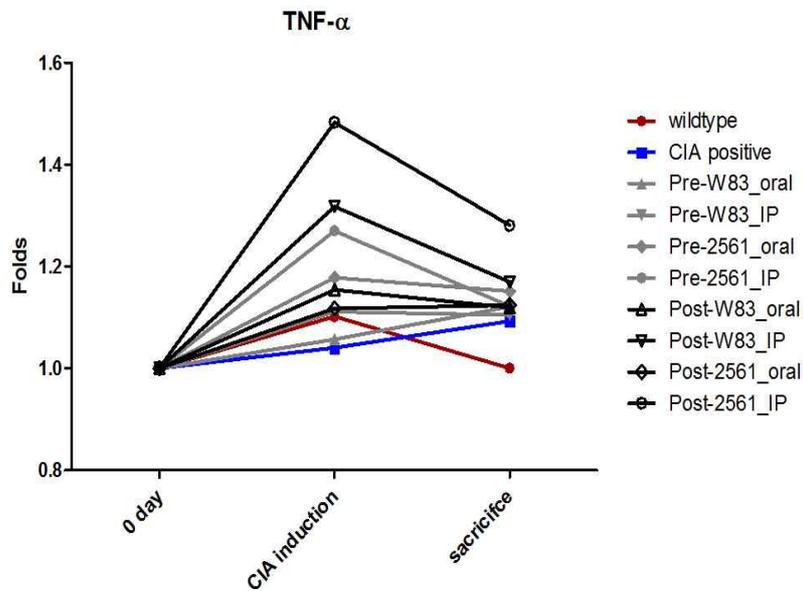


< 그림 323-3-8. 관절염 유도에 따른 조직 염색 실험 결과 (관절염 유도 후, post) >

- 또한 관절염의 대표적인 증상으로 관절을 가동성을 구성하고 있는 연골 조직이 파괴되는 것을 들 수 있는데, 사프란인 O 염색과 툴루이딘 블루 염색을 통해 특이적으로 연골 세포들을 염색하여 관절염의 진행도와 뼈의 파괴 상황을 확인할 수가 있었다.
- 이렇게 연골 조직을 특정하게 염색하는 방식을 통하여 관절의 상태를 고려하는 실험 결과에서도 앞서 H&E와 마찬가지로 CIA를 유도한 관절염 동물 모델에서 연골이 사라진 것보다 post균에서 두가지 균주 모두에서 연골이 파괴되어 더 이상 염색되지 않는 것을 확인 할 수 있었다.
- 이러한 사실은 관절염 붓기를 수치화 시킨 앞선 실험에서도 확인 되었던 것이며, 조직 염색을 통해 뼈의 상태와 활막 세포의 증식 정도, 그리고 뼈 파괴의 정도와 일치되는 것이다. 더불어 연골의 파괴정도 역시 관절염 유도 이후의 post균에서 균주의 종류와 상관없이 진행되고 있음을 알 수 있었다. 더불어 post균에서의 구강 투여에서는 여전히 균주의 종류에 영향을 받고 있는 것을 볼 수가 있는데, W83과는 다르게 2561 균주의 감염이 앞선 결과와 동일하게 영향을 주고 있음을 확인할 수가 있었다.

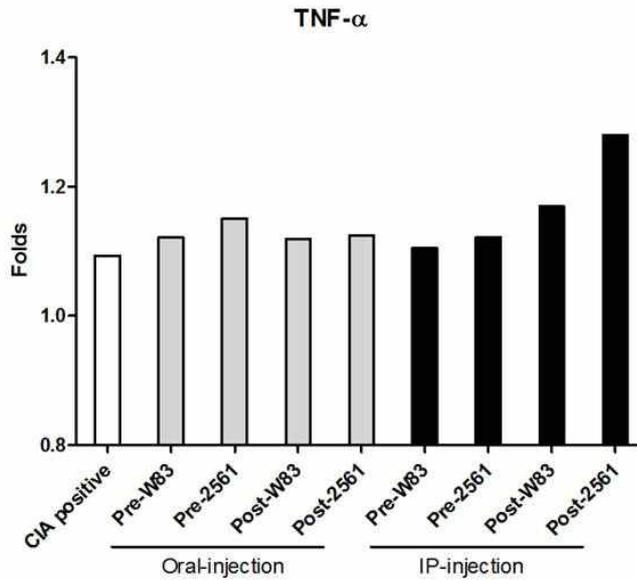
③ 관절염 유도과 균의 감염이 사이토카인에 미치는 영향

- 류마티스 관절염에서 사이토카인은 매우 중요한 위치를 차지하고 있음. 특히 면역반응을 촉진시키고 뼈를 파괴하는데 있어서의 좋은 형질로 알려져 있다. 이에 본 그룹은 관절염의 유도와 균의 감염이 기존에 알려진 사이토 카인에 어떻게 영향을 주는지를 확인 하였다.
- 동물 모델에서 관절염을 유도하지 않는 시기를 0 day로 삼아서 채혈을 통해 혈액을 확보한 뒤에 관절염을 유도했을 시기 (CIA induction)와 실험을 마무리 하는 시기 (sacrifice)로 나누어 채혈을 진행하였다. 이렇게 얻은 혈액에서 사이토카인을 분석하는 ELISA 실험을 수행하였다. 그림 323-3-9에서 보여지는 것처럼 TNF- α 의 경우 관절염을 유도 하였을 당시에 매우 높은 수치로 올라가는 것을 확인할 수 있으나 이후 실험을 마무리하는 단계에서 떨어지는 양상을 전체적으로 보여주고 있다. TNF- α 를 유도하는 균주의 감염 방식으로는 post시기에 2561을 복강내로 투여했을 경우라는 것을 알 수 있었다.

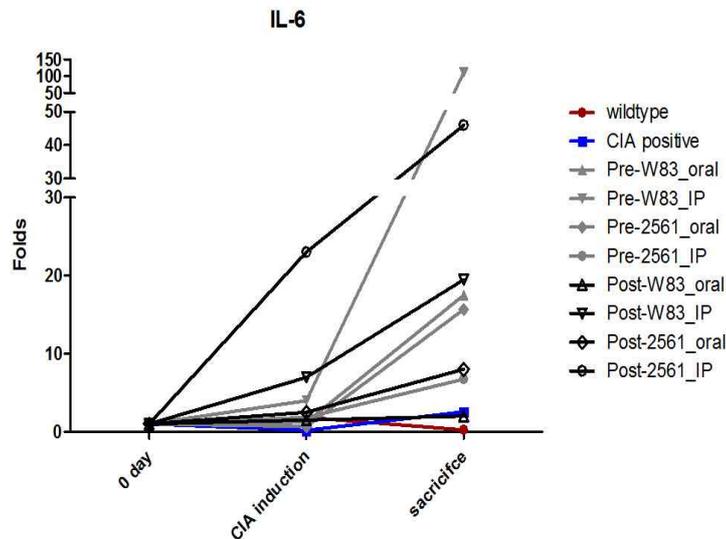


< 그림 323-3-9. 관절염 동물 모델과 균주의 감염시 혈중에 존재하는 TNF- α 의 농도 >

- 앞 그림 323-3-9에서 보여준 그래프의 결과를 균주의 감염방식으로 다시 정리하여 실험 마무리 시기를 기준으로 정리하여 본 그림이 그림 323-3- 10이며, 관절염의 대표적인 사이토카인인 TNF- α 의 경우 관절염 동물 모델에서 나타난 균주의 종류나 또는 감염방식에 의존적으로 그 값이 증가되는 것을 관찰할 수는 없었으며 실제 균주없이 유도된 정상적인 관절염 동물 모델(CIA)과 유사한 값을 보이는 것으로 관찰된다. 하지만 이렇게 나타나는 사이토카인인 TNF- α 의 수치가 직접적으로 조직 결과나 관절염 붓기 수치와는 완벽하게 일치하지는 않는 것을 확인하였다.



< 그림 323-3-10. 균주의 감염방식에 TNF- α 의 혈중 농도 >

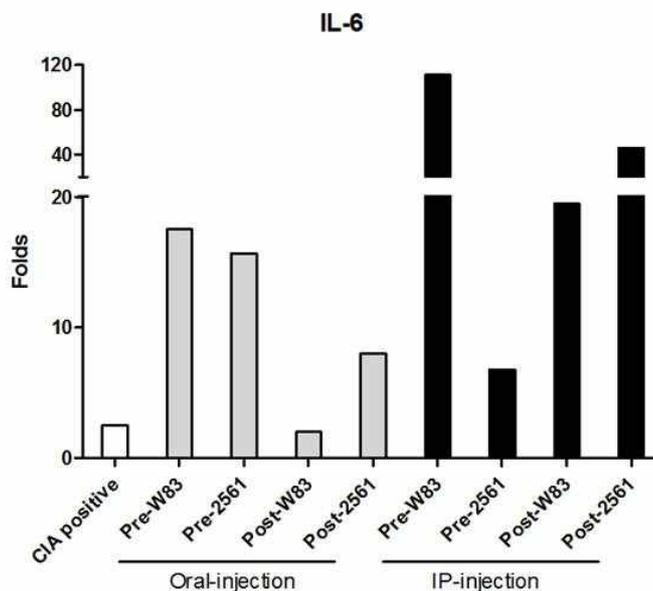


< 그림 323-3-11. 관절염 동물 모델과 균주의 감염시 혈중에 존재하는 IL-6 의 농도 >

- 또 다른 대표적인 관절염의 사이토카인으로서 IL-6의 농도를 측정하여 본 결과를 앞서 소개한 시기별 채혈을 통해 ELISA로 측정 하였다. 결과에서 보여지는 것처럼 TNF와는 다른 패턴으로 사이토카인이 증가하는 것을 알 수가 있었다.
- TNF는 관절염 유도 시기에 매우 높은 값으로 존재하지만 이후 떨어지는데 반해 IL-6는 실험을 마무리 하는 단계 시점에서도 매우 높은 수치를 유지하는 것을 알 수 있었다. 더불어 TNF에서 가장 급격한 값의 변화를 보여주었던 관절염 유도 이후 시기인 post에 복강을 통해 2561 균주를 감염시킨 샘플이 관절염 유도 시점에서부터 지속적으로 높은 IL-6 수치를 보여주고 있는 것을 관찰 할 수 있었지만 그와 다르게 W83을 관절염 유도

이후 시기부터 복강을 통해 감염시키고 있던 pre 군에서 이후 더욱 높은 수치의 IL-6의 농도를 보여주는데 이는 지속적으로 감염되었던 W83군에 의한 것으로 추정되지만, 이러한 농도의 변화가 실질적 관절염의 붓기에 영향을 주고 있지는 못하는 것으로 보인다. 또한 전반적으로 IL-6의 경우가 TNF보다 더욱 높은 수치의 농도를 보여주고 있으며, 두 사이토카인 모두 다 관절염 붓기 수치나 파괴 정도와는 다르게 농도 수치 양상을 보여주고 있는 것을 알 수 있었다.

- 보다 정확한 IL-6의 농도 변화를 군주의 종류와 시기별로 보기 위하여 실험을 마무리 하는 시기의 농도만을 비교하여 그래프화 하였다. IL-6의 혈중 농도를 측정하여 본 결과는 앞서 측정했던 TNF의 혈중 농도와는 확연히 다르게 관절염 유도 이전에 균주를 공급하여 줄 때 이미 그 반응성이 나타나는 것을 확인 할 수가 있으며 이는 innate immune response가 IL-6의 발현에 영향을 주기 때문인 것으로 고려된다. 또한 관절염 붓기와의 상관관계는 부족하나, 균이 접종되는 방식이나 균의 종류에 따라 각각의 차이를 보여주고 있으며 기본 관절염 동물 모델에서 유도되는 양에 비해 매우 과량의 IL-6가 균에 유도되는 것을 확인할 수가 있었다 (그림 323-3-12).
- 결론적으로 *P. gingivalis* 와 류마티스 관절염의 상관관계를 밝히기 위한 동물 모델의 확립하였으며, 식물 유래 anti-FimA 항체의 기능을 검증하기 위해서는 특정 균주와 유도방식의 관절염 동물 모델이 필요하다는 것을 입증하였다. 균주를 통해 유도된 관절염의 경우 TNF- α 보다 IL-6가 면역반응에 관여하는 것으로 확인되었으며, 이러한 정보는 향후 anti-FimA 항체에 대한 효과를 검증할 때 지표로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.



< 그림 323-3-12. 균주의 감염방식에 IL-6의 혈중 농도 >

(2) PG-CIA에서 anti-FimA 항체의 효과 조사

(가) 연구개발 수행내용

① 실험 균주와 배양 조건

- *Porphyromonas gingivalis* (PG) 균주는 2561이며, 현재까지 밝혀진 6개의 유형 (Type) Fimbriae (FimA) 중 제 1형 type을 가지는 균이다. 균체는 경희대 치대에서 통상적인 혐기배양 방법에 따라 배양한 것을 분양을 받아 사용하였다.

② DBA/1 마우스 콜라겐 유도성 관절염 모델 (Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice, CIA)

- 현재 가장 많이 사용되는 류마티스 관절염의 대표적인 모델로서, 제 2형 콜라겐이 자가 항원으로 작용하여 관절염을 일으키게 된다. 본 실험에서 6주령의 암컷 DBA/1 마우스 (오리엔트 바이오에서 입수)를 구입하여, 1주일 이상의 동물 실험실 적응 및 병적 상태 등을 검사한 후 실험에 사용하였다. 콜라겐 유도 시약은 시중에 판매되는 Bovine 제 2형 콜라겐 용액을 complete Freund's adjuvant (CFA, 유화제와 mineral oil의 혼합물을 건조시킨 mycobacteria에 확산시켜 만든 용액)와 1:1 (v/v) 비율로 넣은 뒤 homogenizer (균질기)를 이용하여 강하게 교반 후 (제조 후 빠른 시간에 사용하며, 4°C 상태를 유지한다), 이 혼합액 150 ul를 마우스에 피하주사 하였다.

③ 구강염 유도 조건 및 FimA 항체 처리

- 구강염을 유도하기 위하여 5×10^9 CFU/ml의 PG균을 2% carboxymethyl-cellulose를 녹인 PBS 버퍼에 혼합한다. 이 혼합액을 실제 감염경로와의 유사성을 나타내기 위하여 15일간 매일 마우스 구강에 직접 투여를 하였다 (그림 323-3-1). 투여는 스포이드를 이용하여 마취를 시킨 마우스 구강에 직접 하였으며, 얇은 치간 칫솔을 이용하여 구강 내로 고루 퍼지게 자극을 주었다. 이는 PG균이 인간의 구강 내에만 존재하는 것이라 마우스에서의 감염이 쉽게 일어나지 않음을 감안하여 양을 기존 논문에서 사용하는 양보다 5배가량 늘렸으며, FimA 항체와의 반응성을 최대한 끌어올리기 위함이다.
- 본 실험을 위하여 마우스 군은 6군으로 나누었다. 각각은 wild type (WT, 아우것도 넣지 않은 그룹), Buffer (2% arboxymethyl-cellulose 처리한 PBS 버퍼만 처리한 그룹), CIA (collagen을 처리하여 관절염 유도 그룹), CIA+PG (관절염 유도 그룹에 PG균을 처리한 그룹), CIA+PG+FimA Ab (관절염 유도 그룹에 FimA 항체를 섞은 PG균을 처리한 그룹), CIA+FimA 항체 (관절염 유도 그룹에 FimA 항체를 섞은 그룹)이며, 각 군은 3마리씩 실험 하였다. FimA 항체 (엔비엠 {nbm}, recombinant anti-FimA mAb) 처리 시에는 한 시간 동안 500ng FimA 항체와 PG균을 섞어주고, PG균을 원심분리기로 모은 후 2% carboxymethyl-cellulose 녹인 PBS 버퍼에 현탁한다.

④ 동물 모델에서의 관절염 평가 (Paws scoring)

- 관절염 유도를 통한 동물모델에 대하여 류마티스 관절염 유도 후 마우스의 사지가 부어오르는 것을 육안으로 관찰하며, 각 다리 당 0 내지 4점으로 붓기에 따른 점수를

부여한 후 환산하여 관절염 스코어를 측정하였다. 구체적인 기준으로, 0점은 다리가 전혀 붓지 않은 상태이며, 1점은 발가락이 하나 또는 두개가 부은 상태로 설정하였다. 2점은 1점을 포함하는 상태로 발바닥 혹은 발등이 부은 상태이다. 3점은 2점을 포함하여 발목이 부은 상태를 말하며, 4점은 앞에서 언급한 사항들을 포함하여 매우 심하게 부어 오른 상태를 의미한다. 관절염 평가는 7일에 한번을 기준으로 44일 동안 주기적으로 수행 기록하였으며, 각 다리의 붓기를 합한 뒤 그에 따른 평균 수치를 계산하였다 (그림 323-3-13). 각 다리 별로 4점을 최고 점수로 하여 합하였을 때, 가장 붓기가 심한 경우가 16점이 되도록 하였다.

⑤ 마우스 구강내의 혐기성 박테리아 균수 측정

- PG균 감염에 따른 구강 내 상주하는 혐기성 균수를 측정하기 위해, 멸균된 면봉을 이용하여 각 군의 마우스 구강 내를 잘 닦아내어 non-selective Tryptic Soy broth (TS 액체 배지)에 통상적인 혐기성 배양 방법에 따라 배양하고 다음 날 혼탁도를 측정 및 분석하여, 박테리아 수를 얻었다.

⑥ 치조골 손실(alveolar bone loss) 측정

- 각 마우스 군의 치조골의 부식 정도를 측정하기 위하여, 해부된 마우스 아래턱 부분을 가압멸균장치 (autoclave)로 익힌 후 뼈를 발라내어, 3% hydrogen peroxide에 18시간 이상 처리하여 남은 조직을 제거하고 잘 말린 후, 1분간 0.1% methylene blue로 염색해 준다. 이 후 염색된 세멘토에나멜 접합점 (cemento-enamel junction) 에서 치조골 라인 (alveolar bone crest) 까지 거리를 임의적으로 3곳을 상정하여 측정하였다.

⑦ 컴퓨터 단층 촬영 (CT: Computerized Tomography)

- 각 마우스 군의 뼈 밀도 및 관절의 형태학적 변화를 확인하기 위해, 해부를 통해 마우스 뒷다리 부분을 절취하여 피부를 벗겨내고, 4% formaldehyde 보관한 후 컴퓨터 단층 촬영을 실시하였다. 본 실험은 서울 아산 병원 소동물 연구센터에 의뢰하여 진행하였다. 장비는 SkyScan 1172 라는 desktop X-ray Microtomography를 이용하여 촬영하였다.

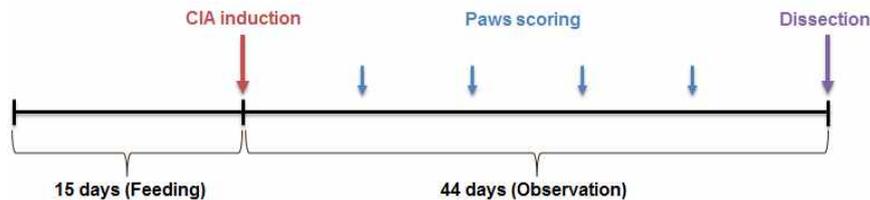
(나) 연구결과 및 고찰

① 관절염 유도 실험 마우스를 이용한 균 접종 방법

- *Porphyromonas gingivalis* (PG)균은 치주질환을 일으키는 대표적인 독성세균으로, 구강 내 상피 세포에 감염되어 세포 변형, 치조골 파괴등과 관련된 구강염을 일으킨다. 또한, 류마티스 관절염 환자는 이러한 구강염의 발생 빈도가 높다고 알려져 있어, PG균과 이로 인해 생기는 구강염은 류마티스 관절염과 서로 관련성이 높음을 알 수 있다.
- 이러한 PG균이 병원성을 일으키기 위해서는 반드시 구강 상피 세포에 붙어서 감염을 일으켜야 하는데, 이 때 필요한 구조체가 균체 막에 존재하는 Fimbriae (FimA)이다. FimA는 일종의 섬모로서 숙주세포로의 감염에 대단히 중요한 역할을 수행한다.

그러므로 본 실험에서는 PG-induced 관절염 동물모델을 이용하여 FimA가 류마티스 관절염에 미치는 영향을 파악하며, 더 나아가 FimA 항체를 이용하여 FimA의 작용을 억제하였을 때 변화를 확인하여, 구강염과 류마티스 관절염의 관련성을 규명하고자 한다.

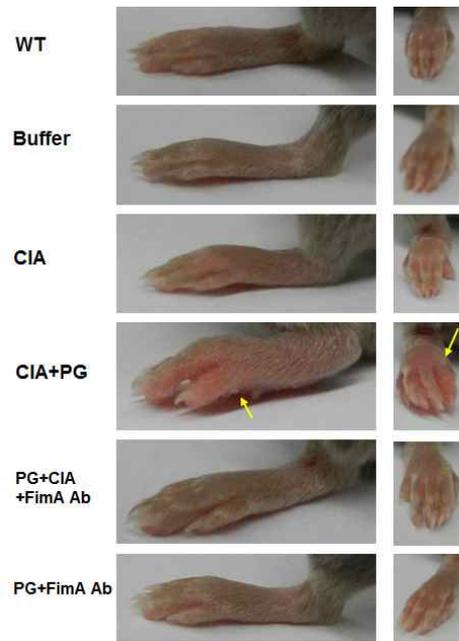
- 관절염에서의 FimA의 영향을 평가하기 위하여, 류마티스 관절염 마우스 모델 (DBA-1)을 이용하여 직접적으로 PG (2561, type 1 FimA)균과 FimA를 차단하는 FimA 항체를 섞은 PG균을 마우스의 구강에 접종하여 관절염의 정도를 확인하는 실험을 진행하였다.
- 일반적으로 관절염 발생 빈도를 증가시키기 위해 2차로 collagen을 추가로 처리를 하지만 본 실험에서는 PG균 처리에 따른 관절염 평가 정도를 높이기 위하여 1차 처리만 진행하였다. 실험이 끝나는 44일 후 마우스를 CO₂를 이용하여 안락사를 시킨 다음 결과를 얻기 위한 해부 및 조직 채취를 진행하였다 (그림 323-3-13).



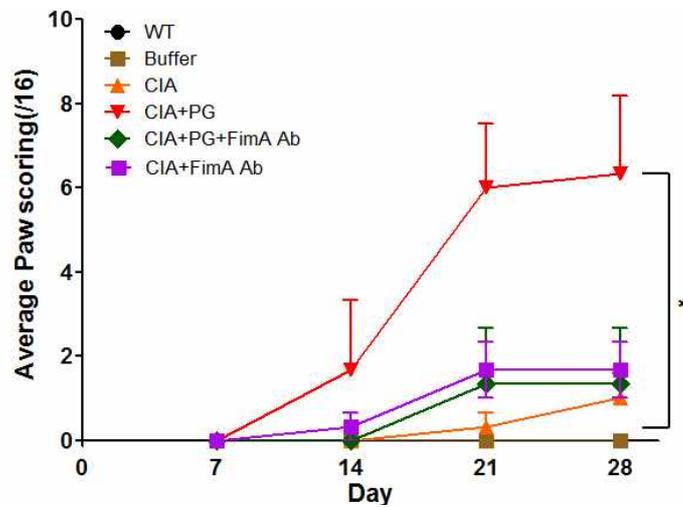
< 그림 323-3-13. 실험 일정 >

② 관절염 평가

- 본 연구에서 15일간 PG균을 처리하여 구강염을 유도한 후 collagen 처리를 하여 관절염을 유도한 경우 WT 나 buffer 그룹에 비하여 현저하게 마우스 발이 부어오르고 붉은 빛을 띠는 것을 확인할 수 있으며, 관절염 유도만 한 그룹에 비하여도 관절염 중증도가 높은 것을 알 수 있다. 특히, PG균을 감염시킬 때 FimA의 작용을 막는 항체를 같이 혼합하여 처리하는 경우에는 관절염 중증도가 거의 아무 것도 처리하지 않은 정상 마우스와 같아지는 것을 확인 할 수 있다 (그림 323-3-14, 화살표).
- 이러한 결과는 인간의 구강 내에서 구강염을 일으키는 PG균이 통상적으로는 마우스에 감염이 잘 일어나지 않는다고 알려진 사실에 반해 본 연구에서는 구강내의 감염이 잘 이루어졌음을 알 수 있으며, PG균으로 인한 구강염의 발생은 류마티스 관절염의 악화에 영향을 줄 수 있다는 것을 확인 할 수 있다. 이러한 변화들을 점수로 환산하여 나타내면 다른 그룹들에 비하여 PG균을 처리한 그룹에서 관절염의 정도가 심한 것을 확연하게 알 수 있으며, 항체를 처리하면 이와 같은 관절염 발생 및 정도가 증가하지 않고 아무것도 처리하지 않은 정상 그룹과 비슷한 것을 알 수 있음 (그림 323-3-15).



< 그림 323-3-14. PG균의 구강 감염 (oral)을 통한 관절염의 유도 >

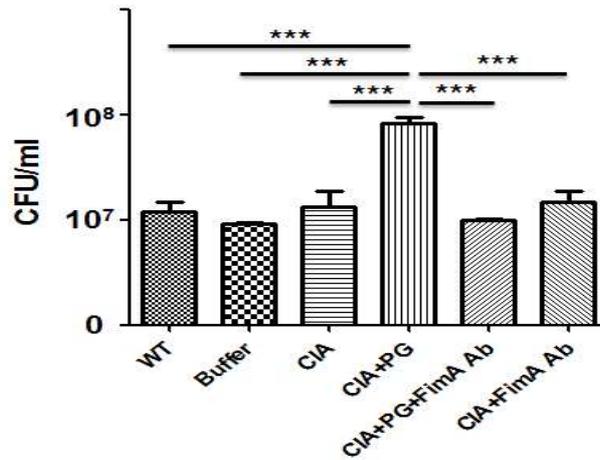


< 그림 323-3-15. PG균 감염에 따른 관절염 환산 점수표 >

③ 마우스 구강내의 혐기성 박테리아 균수의 증가

- 이미 발표된 논문에 의하면 PG균은 구강 내에 감염이 되면 독단적인 독성을 일으키는 것뿐만 아니라 구강 내에 일반적으로 존재하는 균들의 활성을 증가시켜 면역반응을 유도한다고 알려져 있다. 본 연구에서도 구강 내로 감염 시킨 PG균의 활성이 실제 활발히 진행되고 있음을 균들의 성장 정도를 비교하여 확인하였다.
- PG균을 처리하여 구강염을 유도하고 관절염을 유도한 경우 구강에 생육하는 혐기성 (anaerobic) 균들의 수가 다른 균들에 비하여 확연히 증가함을 확인 할 수 있다. 특히, FimA 항체를 이용하여 FimA의 작용을 차단한 경우에는 혐기성 균들의 정상 마우스와

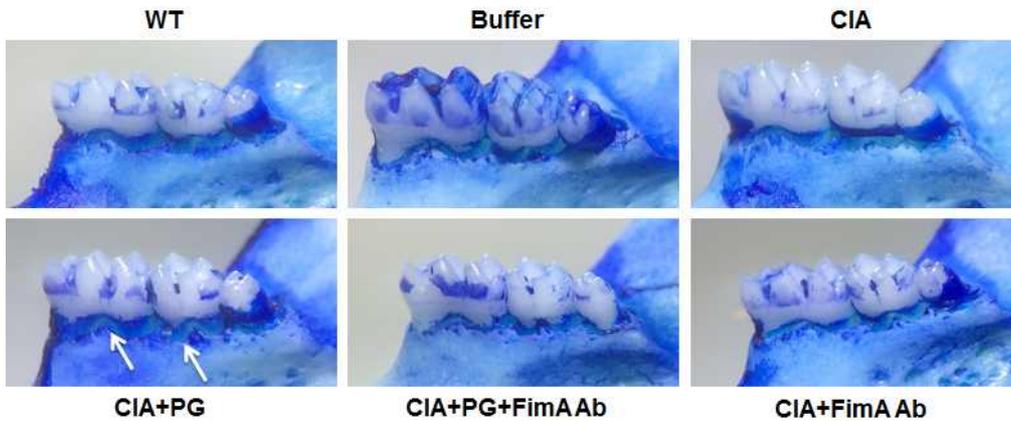
같이 생장이 다시 감소함을 알 수 있다 (그림 323-3-16). 이러한 결과는 본 연구에서 PG균의 감염 유도가 제대로 이루어졌음을 보여 주는 것이고, PG균 감염으로 인한 구강균의 공생체계가 무너져 치주질환 정도가 심해짐을 예상할 수 있다. 또한 그에 따른 관절염의 발생이 증가했음을 알 수 있다.



< 그림 323-3-16. PG균 감염에 따른 혐기성 균층의 성장 변화 >

④ 치조골 손실(alveolar bone loss)의 증가

- PG균 감염에 따른 치주질환은 치조골의 부식(침식)을 동반하는데 이러한 치조골의 손실을 거리로 측정하여 치조골의 부식 정도를 평가하였다.

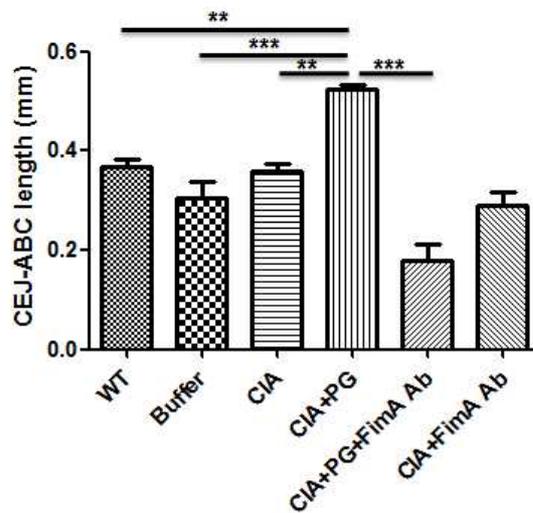


< 그림 323-3-17. PG균 감염과 관절염 발생에 따른 치조골 손실 평가 >

- 일반적으로 치아는 cementum (상아질, 백악질)이 enamel (법랑질)에 덮여 있는데, 이 법랑질이 우리가 눈으로 보이는 치아를 의미하고, 상아질은 치조골에 싸여 잇몸을 유지하고 신경을 보호하는 역할을 수행한다. 이러한 법랑질과 상아질을 나누는 경계지점을 cementoenamel junction (시멘트에나멜 접합점) 이라고 하는데, 이를

methylene blue 염색을 하면 접합점을 기준으로 cementum은 염색이 되고, enamel 부위는 염색이 되지 않는다. 본 연구에서 마우스의 아래턱뼈를 발라내어 염색을 실시하였고, PG균을 처리하고 관절염을 유도하였을 때, 정상 마우스 그룹에 비하여 부식 정도가 확연하게 높은 것을 알 수 있다 (그림 323-3-17, 화살표). 또한, FimA 항체를 처리하여 PG균의 FimA 작용을 억제하면 부식 발생이 생기지 않음을 알 수 있다 (그림 323-3-17).

- 이러한 부식의 정도를 현미경을 이용하여 거리를 측정하면 0.1~0.3mm 정도 PG균을 처리하고 관절염을 유도한 그룹의 마우스에서 그렇지 않은 그룹의 마우스에 비해 증가함을 알 수 있다 (그림 323-3-18).



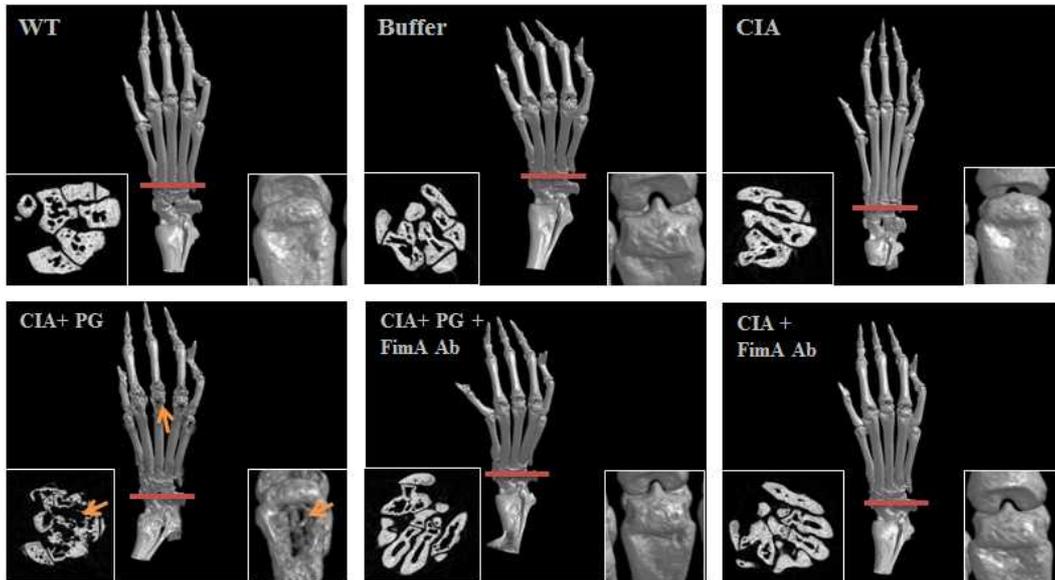
< 그림 323-3-18. PG균 감염과 관절염 발생에 따른 치조골 손실 평가 그래프 >

- 이러한 결과는 PG균에 의한 치주질환의 정도는 관절염을 발생과 관련이 높은 것을 반영하며, 구강염으로 인한 관절염의 질환 중증도 증가와 함께 관절염 역시 치주 질환에 영향을 미칠 수 있음을 보여주는 결과이다. 또한, FimA 항체를 사용하면 PG균의 감염을 차단하여 이러한 치주질환이 발생을 억제 할 수 있음을 확인 하였다.

⑤ 마우스 모델의 관절부위 컴퓨터 단층 촬영 분석

- PG균 처리 후 관절염을 유도한 후 관절 부위의 골의 밀도 및 골의 형태를 분석하기 위하여 컴퓨터 단층 촬영을 실시하였다. PG균을 처리하여 구강염을 유도하고 관절염을 유도하면 그렇지 않은 정상 마우스 그룹에 비해 골 침식이 현저하게 증가함에 따라 골 밀도가 감소함을 알 수 있다 (그림 323-3-19, 화살표).
- 이러한 결과는 실제 류마티스 관절염을 앓고 있는 환자에게서 보이는 질환 현상과 같으며, 본 실험에서도 이러한 PG균의 감염이 류마티스 관절염에 영향을 줄 수 있음을

증명하였다. 또한, FimA를 처리한 그룹에서는 이러한 골 밀도와 형태가 질환이 나타나지 않는 정상 마우스와 같아짐을 확인함으로써 FimA 항체가 PG균의 감염을 억제하여 이러한 질환의 중증도를 줄여 주는데 탁월하다는 것을 확인하였다.



< 그림 323-3-19. PG균 감염과 관절염 발생에 따른 관절염 컴퓨터 단층 촬영 분석 >

- 본 연구를 통하여 구강염 특히 구강염을 일으키는 대표적인 균인 *porphyromonas gingivalis*가 류마티스 관절염과 상관관계가 높음을 확인 할 수 있었으며, 반대로 관절염이 구강염의 질환 중증도를 가중 시킴을 확인하였다. 이상의 결과들은 구강염과 류마티스 관절염과의 질환 연관성이 높음을 반영하는 결과이며, FimA 항체가 치료학적으로 높은 잠재력이 있음을 보여주었다.

(3) Anti-FimA 항체의 환자세포에서 *in vitro* 효과

(가) 연구개발 수행내용

① 면역 조직 화학 염색법 (Immunohistochemistry assay)

- 마우스 관절부위의 조직학적 변화를 확인하기 위해 실험이 끝난 마우스 뒷다리를 대퇴부 위까지 절개하여 조직을 얻어, 10% formalin에 고정시킨 후 10% EDTA 담그어 21일 동안 석회질 제거(decalcified) 작업을 시행하였다. 이 후 수세과정을 거쳐, 농도가 다른 Ethanol에 순차적으로 탈수 과정을 시행하고, 자일렌에 담가 치환과정을 거쳐 파라핀에 굳혀 조직 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 얇게 슬라이스 작업을 하여 파라핀을 제거하고, 슬라이드 글라스에 올려 haematoxylin and eosin (H&E), safranin O, or toluidine blue를 이용하여 각각 염색을 진행하였다. 조직 형광 염색실험을 하기 위해 박테리아 염색은 본 연구에서 개발한 FimA 안티바디를

사용하였고, 핵 염색은 DAPI를 사용하였다. 면역 세포 염색을 위하여 CD11c 항티바디는 수지상세포 (Dendritic cells), F4/80 항티바디는 대식세포 (Macrophages), Ly6G/C 항티바디는 호중구세포 (Neutrophils)를 각각 이용하였다.

② 컴퓨터 단층 촬영 (micro-CT)

- 각 마우스 군의 뼈 밀도 및 관절의 형태학적 변화를 확인하기 위해, 해부를 통해 마우스 뒷다리 부분을 절취하여 피부를 벗겨내고, 4% formaldehyde 보관한 후 컴퓨터 단층 촬영을 실시하였다. 본 실험은 서울 아산 병원 소동물 연구센터에 의뢰하여 진행하였다. 장비는 SkyScan 1172 라는 desktop X-ray Microtomography를 이용하여 촬영하였다. CTAn software를 이용하여 삼차원적 분석을 진행하였다.

③ 세포 실험

- 항티바디의 박테리아 세포 결합 억제 정도를 평가하기 위하여 류마티스 환자 수술 시에 얻은 활막조직에서 분리한 활막섬유모세포 (synovial fibroblasts)와 ATCC사에서 구입한 치은섬유모세포 (gingival fibroblasts)를 이용하였다. 먼저 박테리아를 세포에 처리하기 전에 박테리아의 결합을 억제하기 위한 실험군으로 1×10^8 cell의 박테리아에 50ng의 항티바디를 1시간 동안 처리하였다. 이 박테리아 실험군을 배양된 세포에 2 시간동안 처리하였다.

④ 전자 현미경 (electron microscopy)

- 박테리아의 부착능을 확인하기 위해 세포를 전자 현미경으로 확인하였다. 박테리아 처리를 마친 세포의 배지를 제거하고 4 % paraformaldehyde를 처리하여 고정한 후 2.5 % glutaraldehyde가 들어 있는 0.1 M phosphate buffer에 담근다. 다음날 용액을 제거하고 1% osmium tetroxide를 1시간 동안 처리하여 후 고정을 시킨다. 투과 전자 현미경 (Transmission electron microscopy) 샘플을 제작하기 위하여 이전에 과정을 거친 샘플을 에탄올과 아세톤에 순차적으로 탈수 과정을 거치고, 60~70 nm로 얇게 슬라이스를 하여 200 mesh grid에 올려 관찰하였다. 주사 전자 현미경 (Scanning electron microscopy) 샘플을 제작하기 위하여 샘플을 에탄올과 hexamethydisilazane 용액에 처리 하여 탈수하고 말린 후 도금처리를 한다. 이 후 현미경으로 관찰하였다.

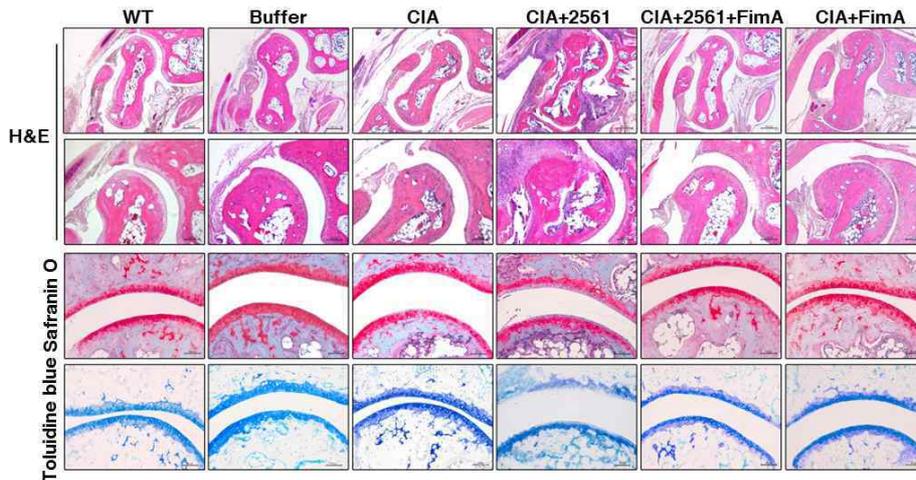
⑤ 면역 형광 염색법 (Immunofluorescence assay)

- 박테리아 처리를 마친 세포 배지를 제거하고, 4% formaldehyde를 처리하여 고정 시킨 후 0.1% tritonX100을 처리하여 세포 표면에 구멍을 뚫는다. 이 후 2% bovine serum albumin (BSA)에 1시간 동안 담가 blocking을 시킨 후에 박테리아 FimA 항티바디를 1시간 동안 처리하였다. 2차 항티바디를 처리하기 위하여 이전 용액은 제거하고 2차 형광 항티바디를 30분간 처리하여 슬라이드 글라스에 올려 형광 현미경으로 관찰하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① 면역 조직 화학 염색법 (Immunohistochemistry)을 통한 조직 분석

- 본 실험에서 구강염 원인균인 *porphyromonas gingivalis* 2561을 이용하여 마우스에 구강염을 발생시키고 이로 인한 류마티스 관절염 발생 정도를 확인하기 위해 면역조직 염색법을 시행하였다. 아무것도 처리하지 않거나 가볍게 류마티스만 유도한 대조군 마우스에서는 별다른 조직학적 질병발생이 일어나지 않았지만, 박테리아를 처리하여 구강염을 일으킨 마우스의 경우 조직학적으로 염증소견이 강하게 나타나며, 관절과 뼈의 파괴가 증가하였다.
- 또한, 염증 관련 세포의 침식이 증가하였으며, 활막이 염증관련 세포로 덩어리를 형성하는 pannus의 발생이 현저하게 증가함을 확인 하였다 (그림 323-3-20). 이러한 조직학적 변화는 임상학적으로 류마티스 관절염과 유사한 증상을 보이고 있음을 알 수 있으며, 특히 박테리아의 구강염 발생에 필수적인 Fimbriae의 활성을 억제 할 수 있는 항체바디를 마우스에 감염시키기 전에 박테리아에 처리한 경우 관절염 질환 발생이 현저하게 감소함을 알 수 있다. 결과적으로 구강염의 발생은 류마티스 관절염을 발생을 유도하며, 병의 진행 및 질환 중증도를 높일 수 있으며, 박테리아 부착을 억제하는 FimA 항체바디를 사용 시 질환 발생을 억제할 수 있다. 이러한 결과는 항체바디가 구강염으로 인한 류마티스 발생 치료에 효과적으로 사용 될 수 있음을 제시한다.

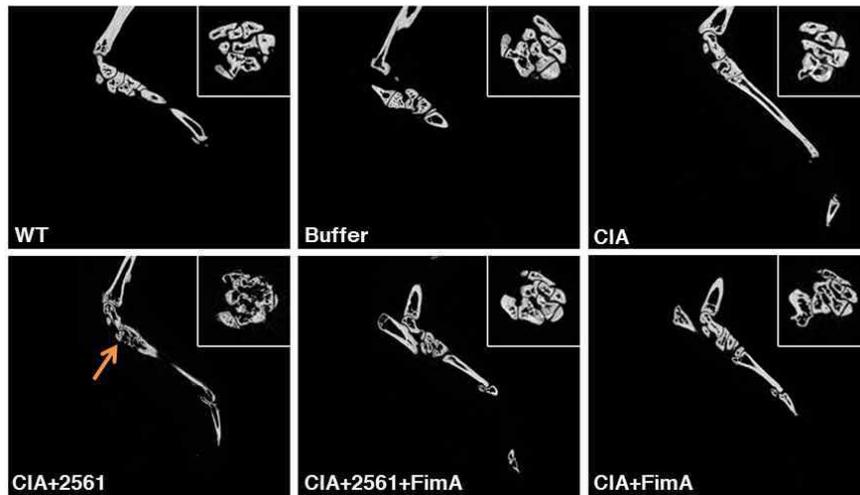


< 그림 323-3-20. 면역염색법으로 조직 변화 분석 >

② 컴퓨터 단층 촬영 (micro-CT) 분석

- 구강염으로 인한 류마티스 발생 정도를 실제적으로 측정 및 분석하기 위하여 컴퓨터 단층 촬영을 시도하였다. 본 결과에서 박테리아를 감염시키지 않은 마우스에 비하여 박테리아를 감염시킨 마우스에서 뼈 밀도가 현저하게 감소하였다 (그림 323-3-21).

또한, 조직학적 결과와 마찬가지로 안티바디를 사용 시 뼈 밀도가 정상 마우스와 차이가 없음을 확인 하였다. 이러한 결과로 구강염의 발생은 관절의 뼈 밀도를 감소시켜, 류마티스 관절염의 질환 중증도를 가중시킴을 확인하였으며, 안티바디가 이러한 류마티스 관절염으로 인한 뼈 밀도 감소를 억제시킬 수 있음을 알 수 있다.

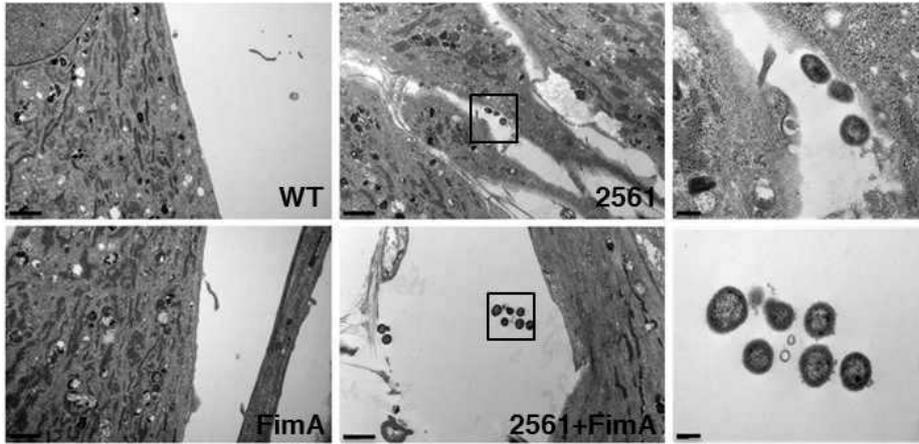


< 그림 323-3-21. 박테리아 감염과 관절염 발생에 따른 관절염 컴퓨터 단층 촬영 분석 >

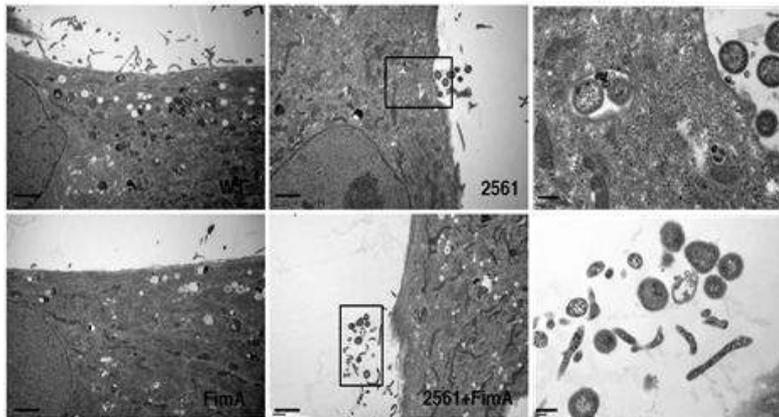
③ FimA 안티바디의 박테리아 부착 억제능 세포 실험 전자현미경 분석

- 박테리아가 구강염을 일으키기 위하여 치주표면에 부착하여 감염을 일으켜야 하는데, 이때 fimbriae라는 박테리아 세포 표면 구조물이 필수적이다. 이러한 fimbriae의 활성을 억제하는 FimA 안티바디의 성능을 검증하기 위하여 전자 현미경으로 관찰하였다. 박테리아를 2시간 동안 치은섬유모세포와 활막섬유모세포에 처리하였고, 대조군으로는 안티바디를 처리하여 fimbriae의 활성을 억제시킨 박테리아를 동일한 시간으로 처리하였다.
- 투과 전자 현미경을 이용하여 박테리아의 존재를 확인한 결과 박테리아를 처리한 두 가지 타입의 세포 표면에 박테리아가 부착하고 있음을 확인하였다 (그림 323-3-22). 특히, 일부는 박테리아는 세포 내부로 침투가 일어나 감염이 일어났음을 확인하였다 (그림 323-3-22). 이에 반해 FimA 안티바디를 처리한 세포 표면에는 부착하고 있는 박테리아의 존재가 현저하게 감소하였다 (그림 323-3-22). 또한, 세포의 형태를 삼차원적으로 확인이 가능한 주사 전자 현미경 관찰에서도 안티바디를 처리한 박테리아의 세포 표면 부착이 현저하게 감소하였음을 확인하였다 (그림 323-3-24).
- 흥미로운 점은 안티바디의 처리는 박테리아 자체 결합을 억제하여 덩어리를 형성하는 것을 억제하였다. 이는 박테리아가 실제 구강 환경에서 바이오 필름이라는 것을 형성하여 주변의 다른 세포의 번식을 증가하게 하는데 안티바디가 이러한 박테리아의 미생물학적 환경 변화를 억제시킬 수 있음을 보여준 결과이다. 이상의 결과들을 통하여

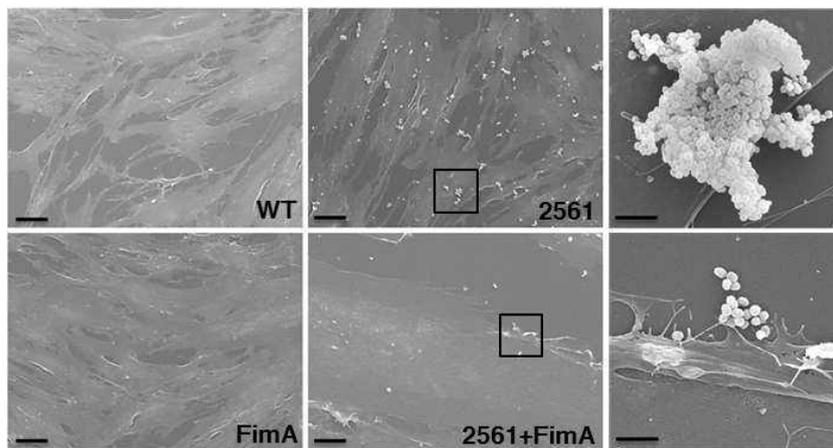
본 연구에서 개발한 FimA 항이바디가 효율적으로 박테리아의 부착을 억제시킬 수 있으며, 나아가 구강염을 유도할 수 있는 미생물의 환경 변화를 억제하고 이에 밀접하게 관련되어 있는 류마티스 관절염의 발생을 억제할 수 있음을 확인하였다.



< 그림 323-3-22. 치은섬유모세포의 투과 전자 현미경 사진 >



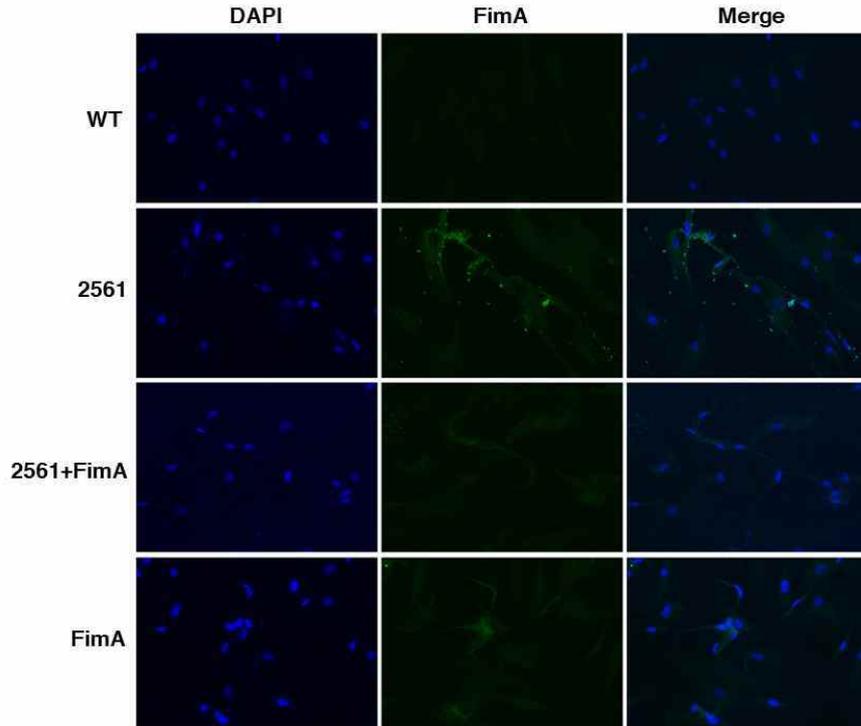
< 그림 323-3-23. 활막섬유모세포의 투과 전자 현미경 사진 >



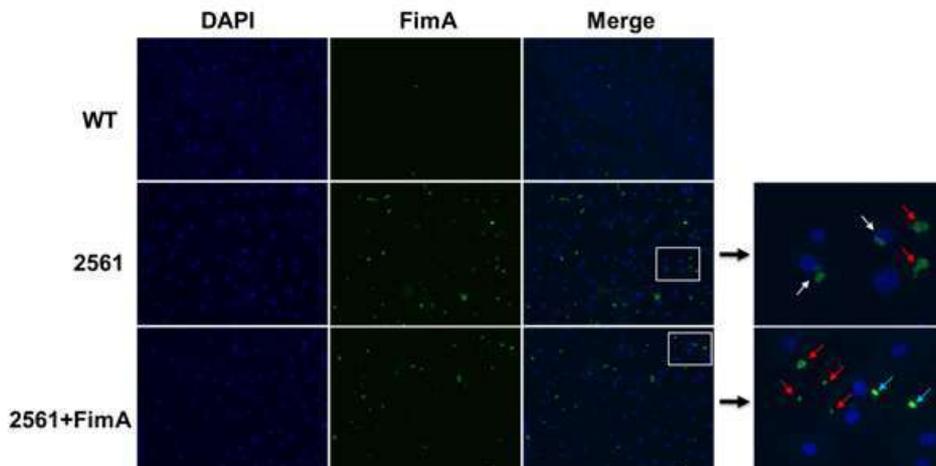
< 그림 323-3-24. 치은섬유모세포의 주사 전자 현미경 사진 >

④ FimA 항바디의 박테리아 결합 억제능 형광 세포 실험 분석

- fimbriae의 활성을 억제하는 FimA 항바디의 성능을 검증하기 위하여 면역형광염색법을 시행하였다. 본 실험에서 박테리아를 처리한 모든 세포에서 형광 발현이 안티바디를 처리한 박테리아에서보다 더 높게 나타났으며, 이는 안티바디가 박테리아의 부착능을 현저하게 감소시킬 수 있음을 확인 할 수 있다 (그림 323-3-25과 323-3-26).



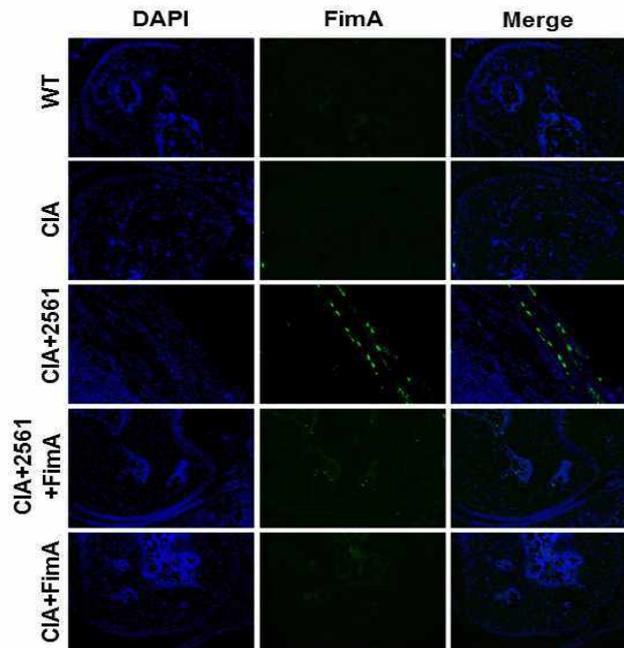
< 그림 323-3-25. 치은섬유모세포의 면역형광염색실험 >



< 그림 323-3-26. 활막섬유모세포의 면역형광염색실험 >

⑤ 조직 면역형광 염색을 통한 박테리아 확인

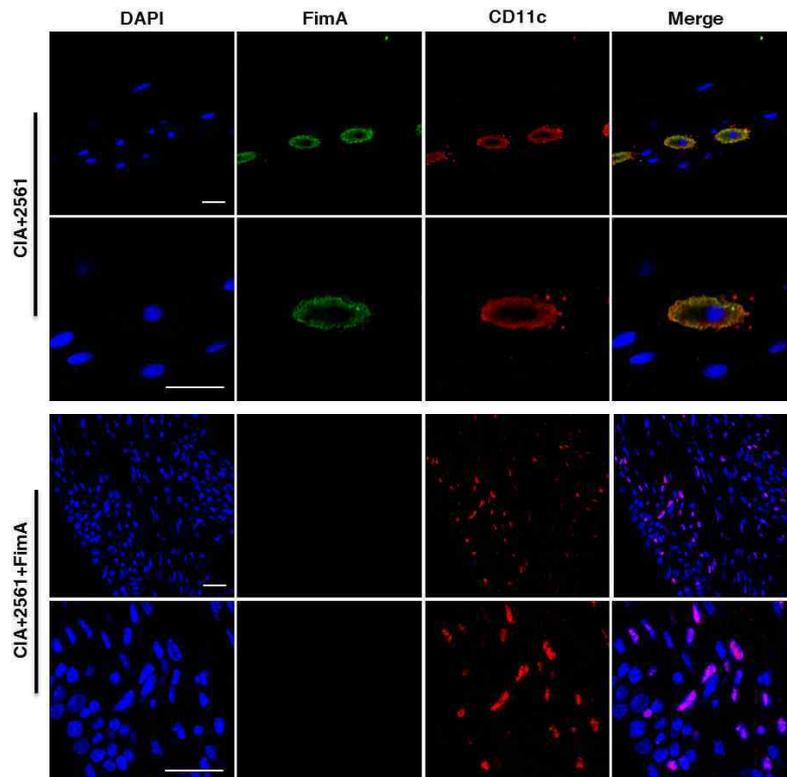
- 일반적으로 지금까지 발표된 논문에 의하면 구강염과 류마티스 관절염이 서로 밀접하게 연관되어 있다 하더라도 실제로 관절염 질환이 있는 조직상에서는 박테리아의 존재를 확인하지 못했다. 특히, 일부 논문에서만 류마티스 환자의 활막액에서 구강 박테리아의 DNA만을 확인했을 뿐이었다. 그렇기 때문에 류마티스 관절염에 작용하는 구강염은 박테리아의 직접적인 이동에 의한 결과가 아닌 간접적으로 구강염에 의해 발생하는 염증으로 인해 일어날 것이라는 것이 거의 이론화 되어 있었다. 그러나 이와 반대로 본 연구팀은 관절염 발현에 구강염을 일으키는 박테리아의 직접적인 이동 및 염증 발현이 있으리라 예상하고, 실제 조직상에서 박테리아의 존재여부를 안티바디를 이용하여 확인하였다.
- 본 연구팀이 예상한대로 실제 박테리아를 감염시켜 구강염을 유도시킨 마우스의 발 관절 조직에서 박테리아의 존재를 확인하였으며, 실제로 박테리아의 직접적인 이동이 관절염 발생 및 질환 중증도에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다 (그림 323-3-8). 이러한 결과는 세계에서 유래가 없는 발견이며, 본 연구에서 개발한 FimA 안티바디가 이러한 박테리아의 감염 경로를 초기에 차단하여 류마티스 관절염의 발생을 억제 할 수 있음을 확인한 것이다. 더불어 본 연구에서 개발한 FimA 안티바디가 이러한 박테리아의 존재를 확인하는 면역 형광 염색법에 적합한 안티바디임을 확인한 결과이다. 그러므로 치료적 목적 외에도 실험적으로 박테리아 검출에 용이하게 사용될 수 있다.



< 그림 323-3-27. 마우스 관절 조직에서의 면역형광염색실험 분석 >

⑥ 조직면역염색을 통한 박테리아의 이동 방법 및 항이바디 성능 확인

- 본 연구팀은 실제적으로 박테리아의 직접적인 관절내로의 이동이 관절염 발생에 중요한 요소가 된다는 라는 것을 실험을 통하여 보고하였다. 또한, 이러한 이동을 FimA 항이바디를 이용하면 초기의 구강염 발생을 억제하여 후차적으로 발생하는 박테리아의 조직 내로의 직접적인 이동 및 질병발생을 효과적으로 억제 할 수 있음을 보고하였다. 이를 바탕으로 본 연구팀은 직접적인 박테리아의 이동이 박테리아 독단적인 이동인지 아니면 다른 경로 및 다른 대상을 이용하여 이동하는 것인지 의구심을 가지고 이를 확인하기 위하여 면역 형광 염색을 진행하였다.
- 가장 최근에 발표된 논문에서 본 연구에서 사용된 박테리아와 유사한 종으로 실험한 결과 감염이 발생하면 선천 면역에 작용하는 수지상세포에 포식이 된 후 포식 후 용해 작용을 억제하여 박테리아가 수지상세포 내에서 살아남는다는 것을 보고하였다. 이를 이용하여 본 연구팀은 선천 면역에 관여하는 세포들을 이용하여 박테리아가 관절 조직까지 직접적인 이동을 할 수 있으리라 추정하였다. 본 연구팀의 결과에서 박테리아는 이전에 보고된 발표와 같이 수지상세포와 함께 마우스 관절 조직 내에서 형광 염색되는 것을 확인 할 수 있다 (그림 323-3-28, 녹색: 박테리아, 붉은색: 수지상세포).



< 그림 323-3-28. 마우스 관절 조직에서 면역형광염색법으로 면역세포 및 박테리아 특이 항이바디 처리를 통한 상관관계 확인 >

- 이러한 결과는 실제적인 박테리아가 수지상세포를 마치 자동차를 타듯이 이용하여 이동 가능성을 보여준 것이다. 흥미로운 점은 비단 수지상세포 뿐만이 아니라 선천 면역에 대표적인 세포인 대식세포나 호중구 역시 박테리아와 형광염색이 같은 위치에서 보인다는 점이다. 특히, 예상한대로 FimA 안티바디를 처리한 마우스에서는 이러한 박테리아의 이동과 면역 세포와의 연관성이 보이지 않았다.
- 이는 선천 면역에 작용하는 일반적인 대식세포는 박테리아가 모두 이용 가능성을 확인한 것이다. 이러한 결과는 류마티스 관련 질환에서 최초로 보고되는 결과이며, 안티바디의 사용은 박테리아의 직접적인 이동과 이로 인한 이차적인 면역 관련 작용들을 억제하여, 구강염으로 인한 관절염의 발생을 초기에 차단할 수 있음을 보여준 결과이다.

(4) Anti-FimA 항체의 환자세포에서 in vitro 효과를 조사

(가) 연구개발 수행 내용

① 면역 조직 화학 염색

- 마우스 관절 부위의 조직학적 변화를 확인하기 위해 감염 실험이 끝난 마우스 뒷다리를 대퇴부 위까지 절개하여 샘플을 채취하고, 10% formalin에 고정시킨 후 10% EDTA 담그어 21일 동안 석회질 제거 (decalcified) 작업을 시행함. 이 후 수세과정을 거쳐, 농도가 다른 Ethanol에 순차적으로 탈수 과정을 거쳐, 농도가 다른 Ethanol에 순차적으로 탈수 과정을 시행하고, 자일렌에 담가 치환과정을 거쳐 파라핀에 굳혀 조직 파라핀 블록을 제작함. 제작된 파라핀 블록은 얇게 슬라이스 작업을 하여 파라핀을 제거하고, 슬라이드 글라스에 올려 haematoxylin and eosin (H&E), safranin O, or toluidine blue를 이용하여 각각 염색을 진행함. 조직 형광 염색실험을 하기 위해 박테리아 염색은 본 연구에서 개발한 FimA 안티바디를 사용하였고, 핵 염색은 DAPI를 사용함. 특정 면역 세포 및 수용체 단백질을 확인하기 위하여 Th-17, TLR2, TLR4에 각각 안티바디를 사용하여 확인함.

② 환자 관절의 박테리아 침윤 검사

- 외과적 수술을 이용하여 관절염 환자의 활막조직을 절제하여 마우스 조직 실험과 마찬가지로 과정을 거쳐 조직 슬라이드를 제작하고 염색을 진행. 조직 형광 염색실험을 하기 위해 박테리아 염색은 본 연구에서 개발한 FimA 안티바디를 사용하였고, 핵 염색은 DAPI를 사용함.

③ 치석 미생물군 분석

- 본 대학 병원 치과에서 선발된 관절염 환자 구강 치석을 채취하여 서울대학교 천 랩에 미생물 군 분석을 의뢰하였다. 총 의뢰 수는 관절염 환자 8명, 일반인 2명으로 하였고 이 후 해당 회사에서 제공하는 분석 프로그램을 이용하여 확인하고자 하는 특정 박테리아의 종과 속을 분석하였다. 분석된 데이터를 참고하여 임상을 진행할 환자를

선별 하였다

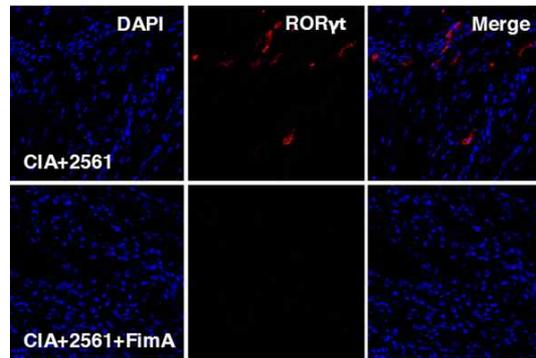
④ 국민건강 및 영양조사 분석 차원에서 관절염과 구강염의 상관성을 분석

- 분석 대상은 2010-2014 년 조사 대상자 중 성인(만 19세 이상)을 대상으로, 건강 설문조사, 검진조사, 영양조사에 모두 참여한 인원만을 대상으로 하였다. 그 중 각종 malignancy 진단 및 치료 중인 환자는 제외하였고 각 분석에서 핵심 변수인 류마티스 관절염, 치주염, 골 관절염에 대한 정보가 결측인 경우는 각 분석에서 제외하였다. 모든 분석은 SAS 9.4 이용하였다.

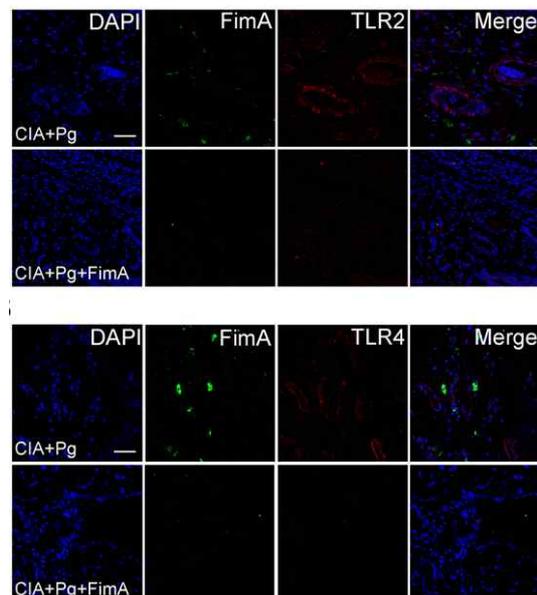
(나) 연구결과 및 고찰

① 관절염 유도 실험쥐를 이용한 억제능 실험

- 자가 면역 및 감염에 관여하는 세포 및 단백질 발현을 면역 화학 염색으로 확인하였으며, 이는 3차 년도에 진행하였던 실험에 추가적인 결과이다.



< 그림 323-3-29. Th-17 세포의 발현을 마우스 관절에서 확인 >



< 그림 323-3-30. 감염에 관여하는 단백질 발현 >

○ Th-17 세포의 발현이 FimA 안티바디를 처리한 마우스 조직에서 현저하게 감소함을 확인하였으며 (그림 323-3-29), 박테리아의 감염 시 발현하는 단백질 TLR2, TLR4가 FimA 안티바디를 처리한 마우스 관절 내 조직에서 현저히 감소함을 확인 하였다 (그림 323-3-30). 본 연구에서 제작한 FimA 안티바디가 효과적으로 박테리아의 구강 침윤을 억제함으로 인해 2차적으로 발생 가능한 관절염 완화에도 효과가 있음을 확인하였다.

② 박테리아의 생육 억제 효과 검증

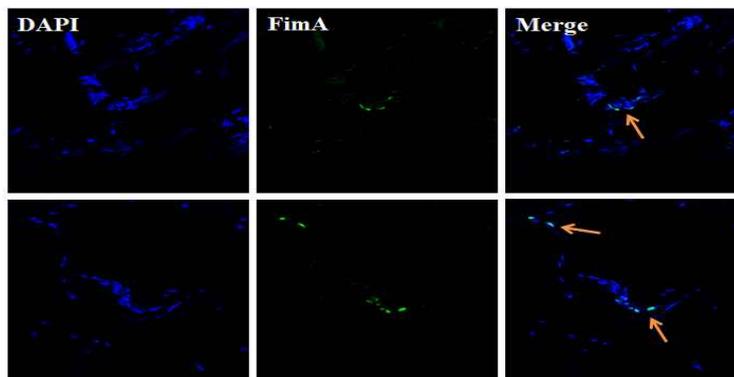
○ 마우스 잇몸에서 직접 샘플 채취하였으며, 구강염을 일으킨 마우스의 잇몸에서 얻은 샘플을 박테리아 전용 생육 배지에 키웠을 때, FimA 안티바디를 처리한 마우스에서 박테리아의 생육이 현저히 감소함을 확인하였다 (그림 323-3-31). 이러한 결과를 통하여 박테리아의 성장을 FimA 안티바디가 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.



< 그림 323-3-31. 블러드 아가배지에 생육 확인 >

③ 관절염 환자 활막 내 박테리아 존재 확인

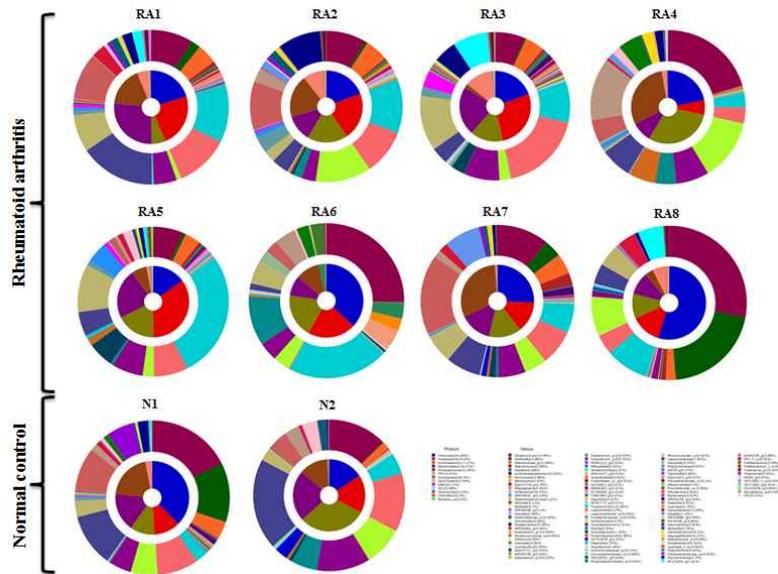
○ FimA 안티바디 활용성을 조사하기 위하여 관절염 환자 활막 조직 내에서 형광 발현을 조사한 결과 형광이 확인되는 것으로 보아 본 연구에 사용한 FimA 안티바디는 실제 환자 조직 내에서 특정 구강 박테리아의 침윤을 확인 할 수 있는 것으로 확인 되었다 (그림 323-3-32). 따라서 본 연구에서 개발한 FimA 안티바디는 박테리아 연구 및 측정에 상업적으로 판매가 가능할 것으로 사료된다.



< 그림 323-3-32. 관절염 환자의 관절 내 박테리아 >

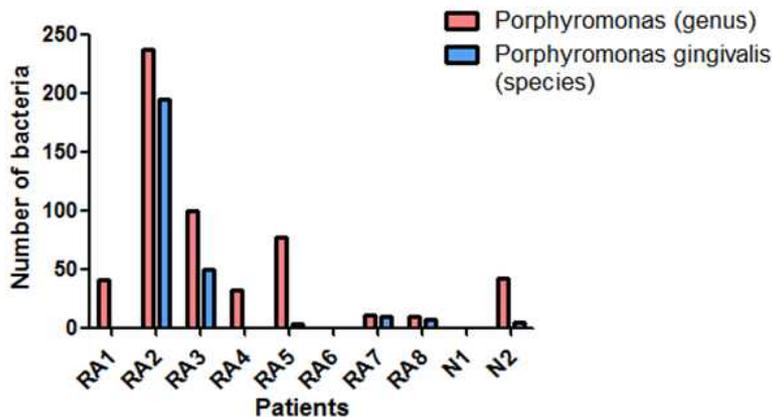
④ 구강 치석 내 상주 미생물군 분석

- 임상 연구를 위한 치석 분석을 위한 FimA 항체바디의 임상적 효능을 검증하기 위하여 지원한 8명의 류마티스 관절염 환자와 2명의 일반 환자의 치석을 본 연구병원의 치과에서 수집하여 상주 박테리아를 분석하였다 (그림 323-3-33).



< 그림 323-3-33. 관절염 환자의 치석 미생물군 분석 >

- *Porphyromonas* 속 (genus)의 박테리아와 *Porphyromonas gingivalis* 종 (species)을 분석하여 최종 일반인 포함 6명을 선별하였다 (그림 323-3-24). 선별 기준은 관련 박테리아가 치석 내에 존재하는 관절염 환자 2명 (RA2, RA3)과 *Porphyromonas gingivalis* 종이 발견되지 않은 관절염 환자 2명 (RA1, RA6), 그리고 일반인 2명 (N1, N2)이다. 치료적인 측면 외에 예방적 측면을 고려하여 특정 박테리아가 확인되지 않은 관절염 환자를 포함하였다.



< 그림 323-3-24. 특정 박테리아 종과 속 분석 >

(5) 적절한 anti-FimA 항체 투여형태 확립

(가) 연구개발 수행내용

① Gargle 형태의 anti-FimA 항체

- 구강염 유도 조건에서 FimA 항체를 PBS buffer와 혼합하여 처리하였으며 PG균 감염 및 FimA 항체 효과를 확인하기 위해 PG균과 PG에 FimA를 처리한 후 low jaw bone의 CEJ-ABC length를 측정하였다. 각 군에서 수집한 PG균을 sheep blood agar에서 배양하여 균의 양을 비교하고 McFarland turbidity standards 방법을 이용하여 각 군의 구강 혐기성 균의 수를 측정 함

② Intraperitoneal injection 투여형태의 anti-FimA 항체

- 관절염 유도를 통한 동물모델을 PG균을 intraperitoneal injection 투여 한 후 관절염 증상을 확인하였다. Anti-FimA 항체의 효과를 확인하기 위해 anti-FimA 항체를 균을 주입한 방법과 동일하게 intraperitoneal injection 투여 한 후 치조골 손실(alveolar bone loss) 측정하였다. 각 마우스 군의 치조골의 부식 정도를 측정하기 위하여, 해부된 마우스 아래턱 부분을 가압멸균장치 (autoclave)로 익힌 후 뼈를 발라내어, 3% hydrogen peroxide에 18시간 이상 처리하여 남은 조직을 제거하고 잘 말린 후, 1분간 0.1% methylene blue로 염색해 준다. 이 후 염색된 세멘토에나멜 접합점 (cemento enamel junction) 에서 치조골 라인 (alveolar bone crest) 까지 거리를 임의적으로 3곳을 상정하여 측정하였다.

③ 고형질의 anti-FimA 항체 등의 다양한 형태의 제형을 만들어 억제효과가 좋은 투여형태 결정

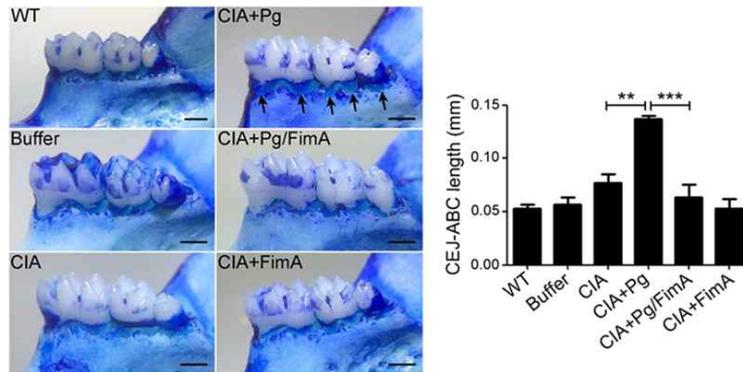
- 관절염 유도를 통한 동물모델에 anti-FimA 항체를 hydrogel 형태의 제형으로 만들어 밀착 및 지지 시간을 늘리고 anti-FimA 항체 구강염증 상태를 측정하여 anti-FimA 항체의 효과를 검증 함.

(나) 연구개발 및 고찰

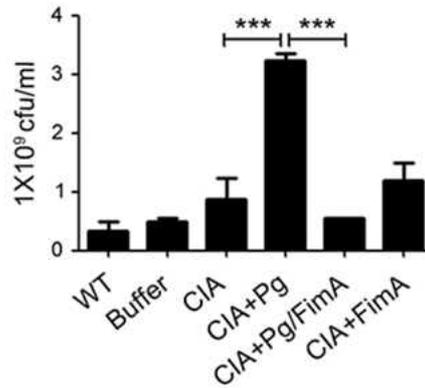
① Gargle 형태의 anti-FimA 항체

- 구강염 유도 조건에서 FimA 항체를 PBS buffer와 혼합하여 처리한 후 PG균 감염 및 FimA 항체 효과를 확인하기 위해 PG균과 PG에 FimA를 처리한 후 low jaw bone의 CEJ-ABC length를 측정함. CIA 생쥐의 시토 나이아나 접합부에서 치조골 뼈 (CEJ-ABC)에 이르기까지 길이로 Pg의 경구 접종이 치주 뼈 손실을 유발한다는 것을 시사하고 대조적으로, 배양 PG와 FimA Ab (Pg / FimA Ab)는 CEJ-ABC에서 유의하게 작은 증가를 보임. 따라서 PG에 의한 구강 감염이 FimA 항체에 의해 억제됨을 확인하였음 (그림 323-3-25). 또한 각 군에서 수집한 PG균을 sheep blood agar에서 배양하여 균의 양을 비교하고 McFarland turbidity standards 방법을 이용하여 그 수를 측정 한 결과 PG 감염 군에서 구강 혐기성 박테리아의 수가 증가한다는 것을

확인 하였고 PG / FimA Ab는 구강 혐기성 박테리아 수를 현저히 억제 시키는 것을 확인하였음 (그림 323-3-26).



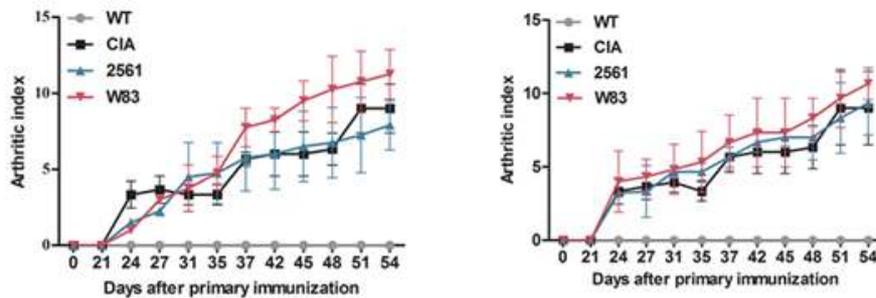
< 그림 323-3-25. low jaw bone의 CEJ-ABC length 측정 >



< 그림 323-3-26. 수집된 구강 혐기성균 수 측정 >

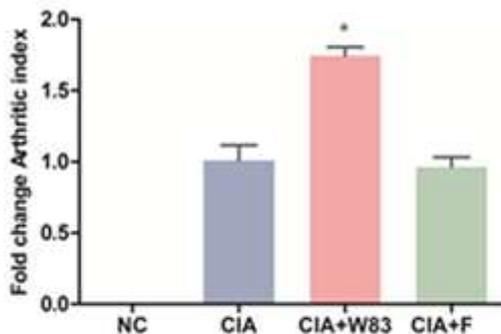
② intraperitoneal injection 투여형태의 anti-FimA 항체

○ 관절염 유도를 통한 동물모델을 PG균을 intraperitoneal injection 투여 한 후 관절염 증상을 확인한 결과 intraperitoneal injection으로도 관절염 지수가 증가된 것을 확인하였음 (그림 323-3-27).



< 그림 323-3-27. PG를 intraperitoneal injection으로 투여 후 관절염 증상 관찰 >

- Anti-FimA 항체의 효과를 확인하기 위해 anti-FimA 항체를 균을 주입한 방법과 동일하게 intraperitoneal injection 투여 한 후 관절염 지수를 측정한 결과 Anti-FimA에 의해 관절염 지수가 낮아진 것을 확인 함 (그림 323-3-28).



< 그림 323-3-28. 관절염 유도마우스에서 PG균 및 Anti-FimA에 의한 관절염 지수 >

- ③ 고품질의 anti-FimA 항체등의 다양한 형태의 제형을 만들어 억제효과가 좋은 투여형태 결정

- 관절염 유도를 통한 동물모델에 anti-FimA 항체를 hydrogel 형태의 제형으로 만들어 밀착 및 지지 시간을 늘리고 anti-FimA 항체 구강염증 상태를 측정하여 anti-FimA 항체의 효과를 검증을 시도 하였으나 젤 제형타입의 특이성으로 접착력이 떨어져 동물실험에 어려움이 있었음 (데이터 없음). 결론적으로 제형 타입의 취급성이나 효과를 기준으로 Gargle 형태의 anti-FimA 항체 타입이 효과 및 취급이 가장 용이함을 확인하였다.

(6) 유효성 평가방법 확립

(가) 연구개발 수행내용

- ① 구강염 유도 후 FimA 항체 처리 농도 확립 및 검증

- 구강염에 의한 관절염 악화에 대한 Anti-FimA의 처리농도에 대한 효과를 검증하기 위해 관절염 유도 조건에 5×10^9 CFU/ml의 PG균을 2% carboxymethyl-cellulose를 녹인 PBS 버퍼에 혼합하여 처리하고(CIA+PG), 관절염 유도 그룹에 FimA 항체를 섞은 PG균을 처리한 그룹(CIA+PG+FimA Ab)과 비교하여 관절염증상의 개선을 검증 하고자 함.

- ② 관절염 지수를 통한 Anti-FimA 처리농도에 따른 효과 검증

- 관절염 유도 후 동물모델에 Anti-FimA를 처리하여 마우스의 사지가 부어오르는 것을 육안으로 관찰함. 각 다리 당 0 내지 4점으로 붓기에 따른 점수를 부여한 후 환산하여 관절염 스코어를 측정하였음. 구체적인 기준으로, 0점은 다리가 전혀 붓지 않은 상태이며, 1점은 발가락이 하나 또는 두개가 부은 상태로 설정하였음. 2점은 1점을 포함하는 상태로 발바닥 혹은 발등이 부은 상태이다. 3점은 2점을 포함하여 발목이

부은 상태를 말하며, 4점은 앞에서 언급한 사항들을 포함하여 매우 심하게 부어 오른 상태를 의미함. 관절염 평가는 7일에 한번을 기준으로 44일 동안 주기적으로 수행 기록하였으며, 각 다리의 붓기를 합한 뒤 그에 따른 평균 수치를 계산하였음. 각 다리 별로 4점을 최고 점수로 하여 합하였을 때, 가장 붓기가 심한 경우가 16점이 되도록 하였음.

③ 세포염색을 통한 관절염 심화정도 측정

- 관절염의 심화정도를 측정하기 위하여 관절의 상태를 확인하기 위한 염색실험을 수행함. H&E 염색법(staining) 및 사프라닌 O 염색법을 이용하여 세포를 관찰하고자 함. 쥐의 뒷발을 파라핀으로 고정시킨 후 절단하여 조직 염색을 실시하는 방법으로 수행. H&E 염색법(staining)의 경우, 자일렌(xylene) I 과 자일렌(xylene) II 에서 15분간 탈파라핀(deparaffin)과정을 거쳐 에탄올 100%, 90%, 80%, 70% (hydration 함수) 순으로 각각 5분씩 담근 후, 수돗물에서 5분간 세척 함. 이 후 Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich HHS32)으로 10분간 염색한 후 수돗물로 충분히 세척한 뒤 1%HCl 에 2-3회 살짝 담근 후 0.2% 암모니아수에 2-3회 세척작업을 거침. 이후 Eosin(Sigma-Aldrich HT110132)으로 1분 30초간 염색 후 세척하였다. 70% 에탄올, 80% 에탄올, 90% 에탄올, 100% 에탄올 (dehydration 탈수) 순으로 통과시킨 후 자일린(xylene)에 담가 봉입(mounting)과정을 진행하여 관찰.

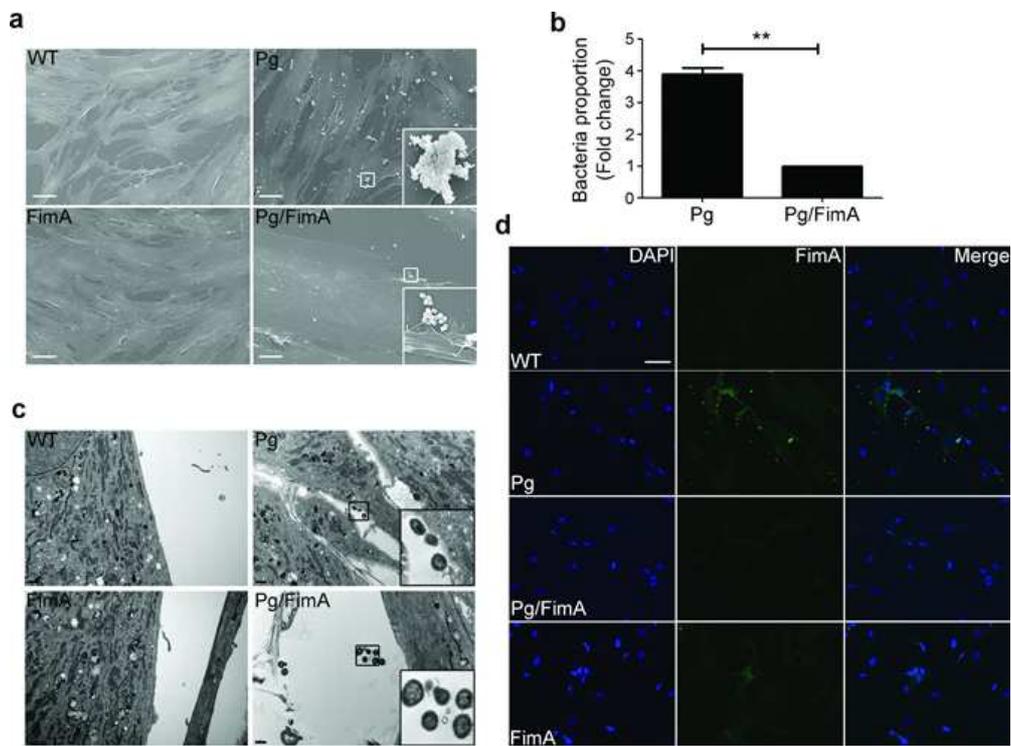
④ 컴퓨터 단층 촬영 (CT: Computerized Tomography)

- 각 마우스 군의 뼈 밀도 및 관절의 형태학적 변화를 확인하기 위해, 해부를 통해 마우스 뒷다리 부분을 절취하여 피부를 벗겨내고, 4% formaldehyde 보관한 후 컴퓨터 단층 촬영을 실시하였다. 본 실험은 서울 아산 병원 소동물 연구센터에 의뢰하여 진행하였다. 장비는 SkyScan 1172 라는 desktop X-ray Microtomography를 이용하여 촬영하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① IND 사전작업을 위해 유효성 평가를 위한 Anti-FimA 농도 선택 및 평가방법 확립

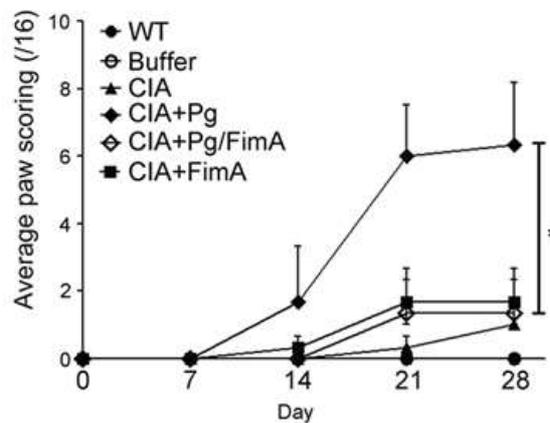
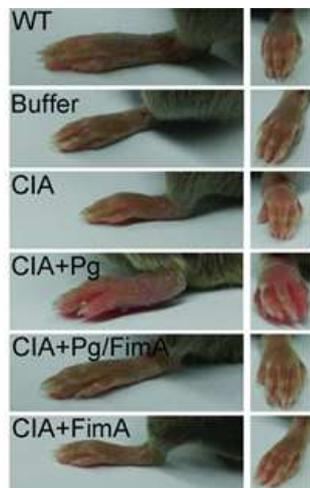
- 구강염에 의한 관절염 악화에 대한 Anti-FimA의 적정 농도에 대한 효과를 확인하기 위해 관절염 유도 조건에 5×10^9 CFU/ml의 PG균을 처리한 군(CIA+PG)과 관절염 유도 그룹에 FimA 항체를 섞은 PG균을 처리한 그룹(CIA+PG+FimA Ab)의 관절염 상태를 비교를 통해 Anti-Fim A의 효과를 검증 하였고 투여된 Anti-FimA를 Scanning electron microscopy (SEM)과 Transmission electron microscopy (TEM)을 이용하여 검출 하여 항체가 잘 투입되었음을 확인하였고 면역형광염색법을 이용해 확인한 결과 Anti-FimA 항체가 PG균의 접착능력을 억제하는 것을 확인하였음 (그림 323-3-29).



< 그림 323-3-29. Anti-FimA를 투여한 군의 조직에서 Scanning electron microscopy (a)과 Transmission electron microscopy (c)로 투여된 Anti-FimA 관찰 및 Anti-FimA에 의한 PG균의 attachment가 감소됨을 관찰 >

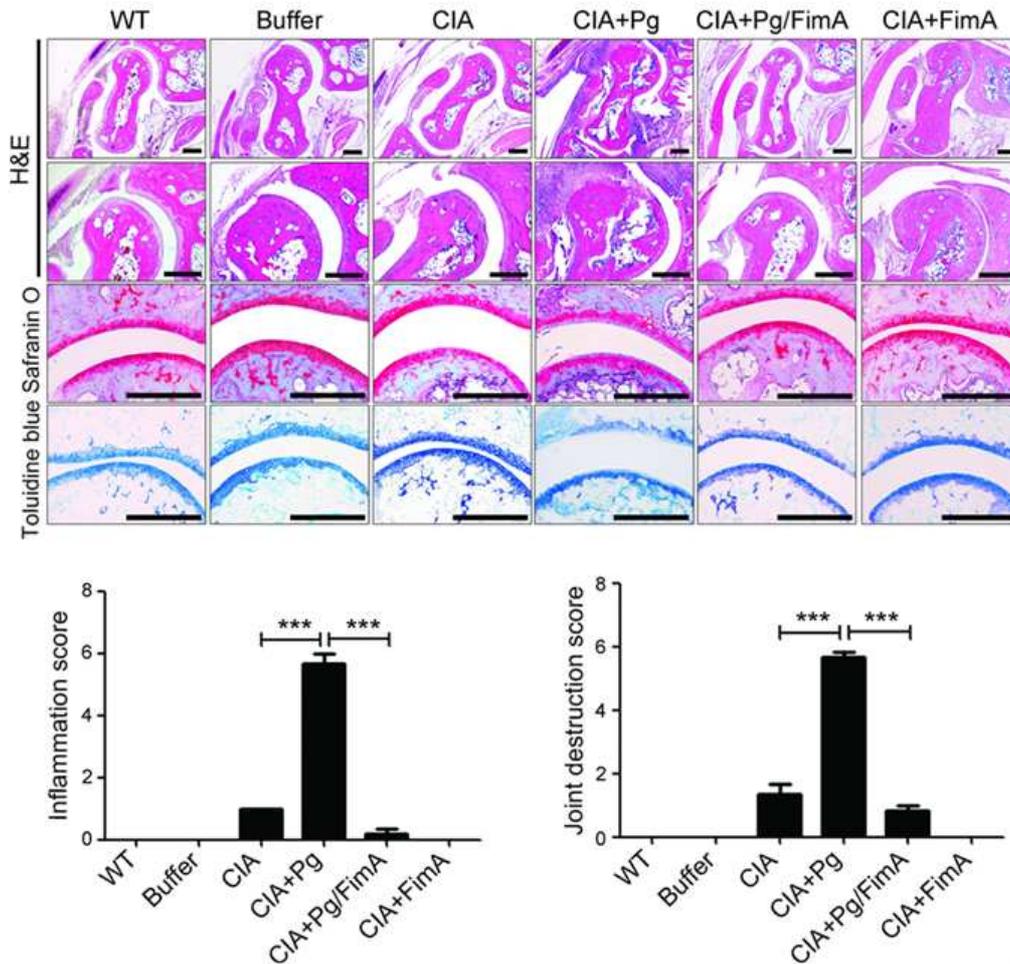
② Anti-FimA 처리 농도 확인

- 관절염 유도 후 동물모델에 Anti-FimA를 처리하여 마우스의 사지가 부어오르는 것을 육안으로 관찰하여 Anti-FimA에 의해 관절염 지수가 현저하게 감소하는 것으로 Anti-FimA 처리 농도가 적절하였음을 확인하였음 (그림 323-3-30).



< 그림 323-3-30. Anti-FimA 항체 처리에 따른 관절염의 형태학적 변화 및 관절염 지수 변화 관찰 >

- ③ 관절염의 심화정도를 측정하기 위하여 관절의 상태를 확인하기 위한 염색실험을 수행
- H&E 염색법(staining) 및 사프라닌 O 염색법을 이용하여 세포를 관찰하였음. 관절염 지수 결과와 일치하게 Anti-FimA 항체의 처리에 의해 염증이 감소됨이 확인되었고 세포염색 방법이 유효성 평가방법으로 적당함을 확인하였음 (그림 323-3-31).

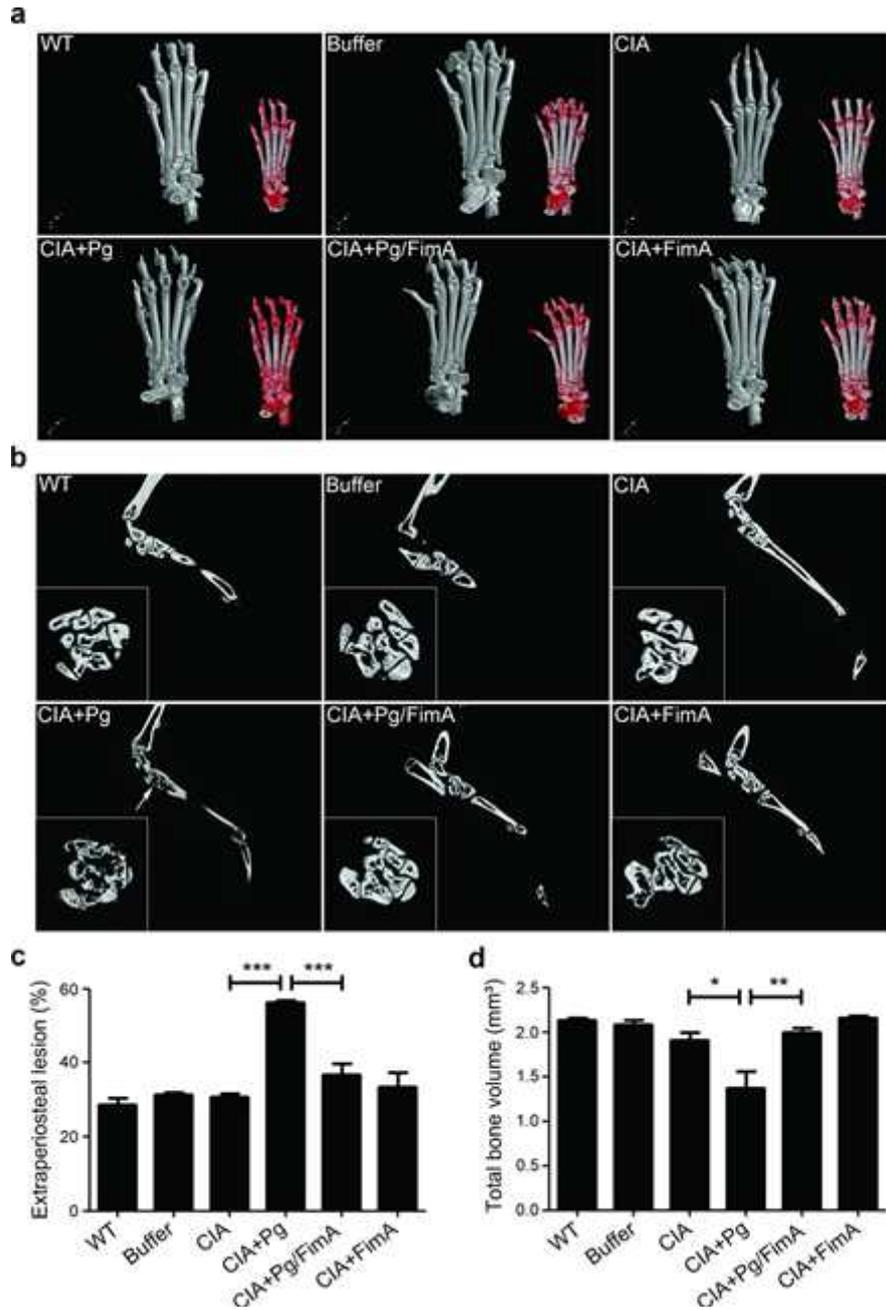


< 그림 323-3-31. Anti-FimA 항체 처리에 따른 관절의 염증 상태를 세포염색으로 관찰 >

④ 유효성 평가방법 확립

- 각 군의 뼈 밀도 및 관절의 형태학적 변화를 컴퓨터 단층 촬영 (CT: Computerized Tomography)으로 확인한 결과 Anti-FimA항체에 의한 뼈 손상정도가 감소되었음이 검증되었고, 컴퓨터 단층촬영결과가 유효성 평가 지표로 사용가능함을 검증하였음 (그림 323-3-32). 결론적으로, RA환자에게 anti-FimA항체를 국소 투여하여 관절염의 치료효과를 관찰하기 위한 임상연구 개시 준비단계로서 IND승인을 위한 유효성 평가의 평가방법을 확립하고자 하였음. 또한 anti-FimA항체의 처리 농도 검증 및 항체 효과 검증 방법을 확립하기 위해 관절염 지수와 세포염색을 통한 염증 정도, 컴퓨터단층촬영을 이용한 뼈 손실 정도를 비교한 결과 위 평가 방법이 anti-FimA의

유효성을 입증할 수 있다고 판단되어 유효성 평가방법으로 확립하였음. 앞서 확인된 농도와 평가방법을 이용하여 세포독성 검사 및 안전성 검사를 추가로 진행하여 임상연구를 위한 IND 승인준비 시험을 준비할 수 있을 것으로 사료된다.



< 그림 323-3-32. 각 군별 뒷발의 micro-CT images로 뼈 손실 관찰 >

3-2-4. 식물유래 human insulin 생산기술 확립

1. 고발현 핵 형질전환 시스템을 이용한 mini proinsulin 생산 GM작물 개발

○ 연구수행기관 : 순천대학교

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) mini proinsulin 재조합 단백질이 발현된 형질전환담배식물체에서 고발현 식물체 확립

○ 식물체 발현용 인간 mini proinsulin 재조합 단백질 construct 제작

○ 인간 mini proinsulin이 도입된 형질전환 담배세포와 식물체 제조 및 재조합 인슐린 발현 분석

(2) mini proinsulin 단백질의 proteolytic processing의 최적화 확립

(3) 인슐린 재조합단백질 형질전환 담배 식물체에서의 단백질 수율 및 활성 분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

○ 10대 단백질 의약품으로 분류되는 시장성이 큰 당뇨병 치료제

○ 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 많은 품목임

○ 우리나라 식약청에서도 바이오시밀러 가이드라인을 제정하여 바이오시밀러 또는 바이오베터의 개발을 장려하고 있는 품목으로 산업화 가능성이 높음

○ 본 연구는 고발현 식물 핵 형질전환 시스템을 이용하여 당뇨병 완화 및 치료에 널리 사용되어지고 있는 mini proinsulin을 생산하는 GM작물을 개발하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) 인간 mini proinsulin 재조합단백질 construct 재설계 및 형질전환 담배 식물체 제조

○ 식물체 발현용 인간 mini proinsulin 재조합 단백질 construct 제조

- 인간 mini proinsulin의 예비실험 과정에서 제조한 construct는 발현을 확인하기 위해 proinsulin의 N-말단에 RFP 단백질에 붙여서 실험하였다.

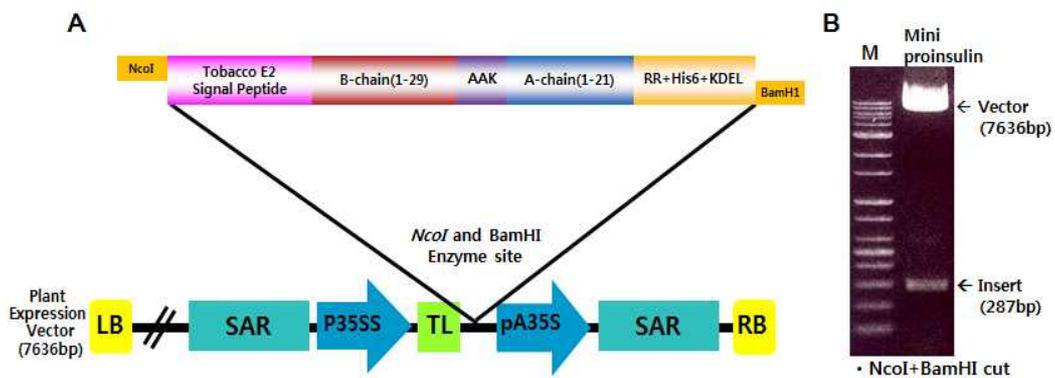
- 담배 현탁배양세포에서 mini proinsulin이 발현되고, proinsulin이 트립신에 의해 A 사슬과 B 사슬이 분리될 수 있다는 것을 확인하였다.

- 이후 형질전환 담배식물체 제조하여 의학적 활용가능성을 높이기 위해 proinsulin의 N-말단에 RFP가 결합되지 않은 재조합 construct를 제조하기로 했다.

- 재조합 인슐린 고발현 constructs 구조는 35S promoter에 유도되는 construct 로서 [N

말단 → 변형된 tobacco E2 signal peptide → B-peptide(1-29 AA) → AAK → A-peptide(1-21 AA) → RR → His6 → KDEL → C말단] 의 서열을 갖고 있도록 디자인 하였다 (그림 324-1-1A).

- 담배식물체에서 발현 효율을 높이기 위해서 E2 signal peptide의 아미노산 서열을 일부 변형하였고 변형된 E2 signal peptide의 probability를 SignalIP 3.0을 이용하여 조사한 결과 0.984가 나왔으며 이것은 original의 0.923 보다 더 높은 수치였으므로 변형된 염기서열을 사용하기로 결정하였다 (그림 324-1-1).



< 그림 324-1-1. 식물체 발현용 mini proinsulin 재조합 단백질의 construct (A) 및 PCR 확인 >

A Tobacco E2 signal peptide+MI[B(1-29) +AAK+ A(1-21)+RR+His6+KDEL]

E2(NcoI)-F
 →
 ccattggctatgaacttctcctcaaaagcttcccctttttgaccttcttggttttggccaatac
 M A M N F L K S F P F F A F L C F G Q Y
 ttgtagctgttactcatgcttttgtgaaccaacacctgtgcggtcacacctggtgaa
 F V A V T H A F V N Q H L C G S H L V E
 gctctctacctagtgtgctggggaacgaggttcttctacacaccaaggctgctaagggc
 A L Y L V C G E R G F F Y T P K A A K G
 attgtggaacaatgctgtaccagcatctgctcctctaccagctggagaactactgcaac
 I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N
 agaaga catcatcatcatcataaggatgaactttgaggatcc
 R R H H H H H H K D E L ← BamHI-R

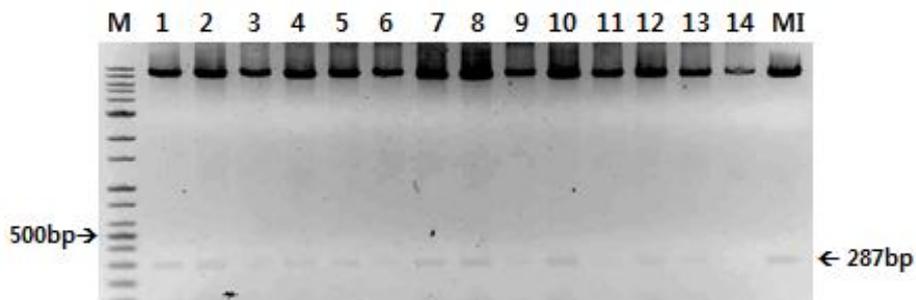
B

Sequence	Signal peptide probability	Signal anchor probability
Original sequence MNFLKSFPFYAFLCFGQYFVAVTHA	0.923	0.049
MAMNFLKSFPFFAFLCFGQYFVAVTHA	0.984	0.012

(signal IP 3.0)

< 그림 324-1-2. 35S::mini proinsulin 의 최종 염기서열과 아미노산서열 (A), 변형된 tobacco E2 signal peptide 의 Signal peptide probability (B) >

- 이후 *Agrobacterium GV3101*에 형질전환하여 배양한 colony에서 얻은 plasmid DNA를 분리한 후 제한효소로 절단하여 이 construct가 도입되어 있음을 확인하였다.
- PCR로 제조된 mini proinsulin 절편을 RFP 단백질이 제거된 식물발현용 pTRAKt vector에 ligation하여 전기영동을 통해 최종적으로 확인하였다 (그림 324-1-1B).
- 최종 완성된 재조합 construct는 *Agrobacterium GV3101*에 형질전환시킨 후 kanamycin에 선별된 colony를 배양하여 plasmid DNA를 분리하여 제한효소 *Nco I*과 *Bam HI*으로 절단하여 전기영동을 수행하여 확인하였다 (그림 324-1-3).



< 그림 324-1-3. *Agrobacterium*에 형질전환된 재조합 인슐린 construct 확인. (M, 1kb marker; lane1~14, *Agrobacterium* 에서 분리한 재조합 인슐린 plasmid DNA; MI, 재조합 인슐린의 plasmid DNA) >

(2) mini proinsulin 재조합 단백질이 발현된 형질전환담배식물체에서 고발현 식물체 확립

○ 형질전환 담배식물체의 제조

- 인간 *mini insulin* 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* 균주를 배양하여 담배 잎절편에 형질전환시켰다.
- 항생제 kanamycin(100mg/l)이 첨가된 배지에서 약 8주 정도 배양 후 shoot가 형성되는 것을 확인한 후 계속해서 4~6 주 동안 더 배양하여 형질전환체를 선별하였다 (그림 324-1-4).



< 그림 324-1-4. Kanamycin 항생제가 첨가된 배지에서 형질전환 담배 식물체의 배양 과정 >

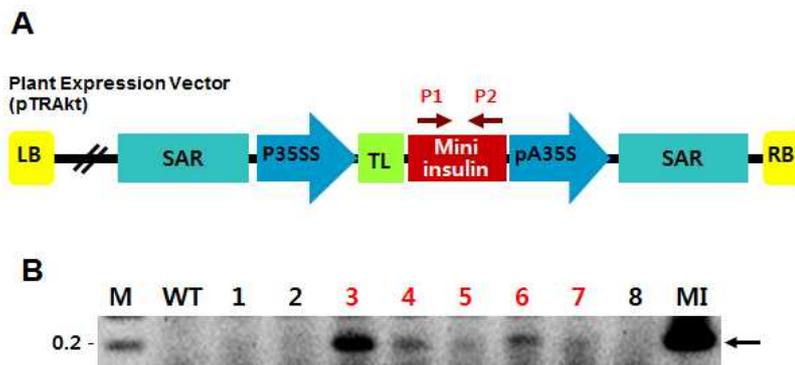
- 총 1,200개의 절편에서 뿌리형성 유도 배지에 옮겨 형질전환된 식물 개체 8개 라인을 획득하였으며, 이를 상토에 옮겨 약 1주간 안정적으로 순화시켰다 (그림 324-1-5).



< 그림 324-1-5. 인간 mini proinsulin 형질전환 담배 식물체 >

○ 형질전환 담배식물체에서 인간 mini proinsulin 유전자의 삽입 확인

- 형질전환 식물체로 선발된 8개의 라인의 잎 조직으로부터 genomic DNA를 분리하여 insulin 유전자의 염기서열 정보를 이용한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다.
- 증폭된 인간 mini proinsulin 유전자의 DNA 절편의 예상된 사이즈인 201 bp가 8개의 라인 중에서 5개의 라인에서만 정확한 사이즈가 확인되었다 (그림 324-1-6).
- 따라서 최종적으로 인간 mini proinsulin 유전자가 삽입된 형질전환 식물체로 선발된 라인은 3번, 4번, 5번, 6번, 7번으로 5개 라인으로 확정하였다 (그림 324-1-7).



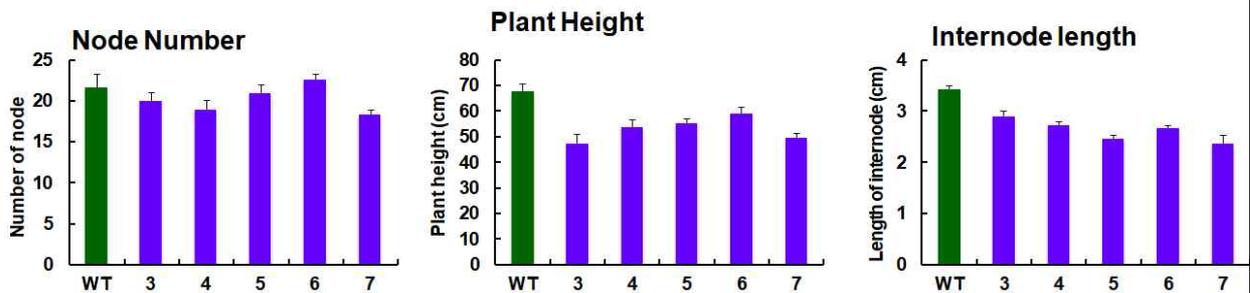
< 그림 324-1-6. 인간 mini proinsulin 유전자의 식물체 발현용 construct (A) 및 형질전환 담배 식물체에서 인간 mini proinsulin 유전자의 삽입 확인 (B) >



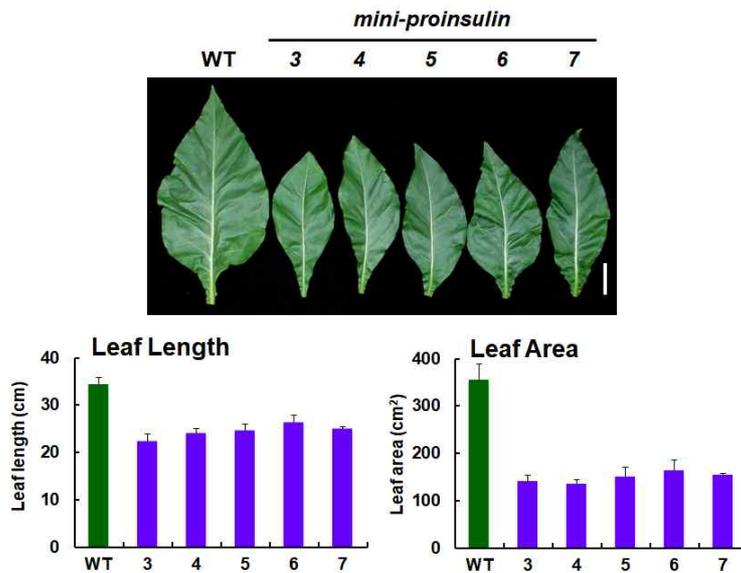
< 그림 324-1-7. 인간 mini proinsulin 유전자의 형질전환 담배 식물체 >

○ 재조합 인간 mini proinsulin 형질전환 식물체의 생육 조사

- 형질전환 식물체로 최종 선발된 5개의 라인의 생육을 조사하였는데 야생형과 비교하여 성장속도가 늦었으며 잎의 절간의 수, 식물체의 높이, 절간의 길이 등이 감소하였다 (그림 324-1- 8).
- 또한 잎의 면적 등이 적었으며, 인슐린 형질전환 식물체가 야생형 식물체보다 전반적으로 성장이 억제되었다 (그림 324-1- 9).



< 그림 324-1-8. 인간 mini proinsulin 형질전환 식물체의 생육 조사 >



< 그림 324-1-9. 인간 mini proinsulin 형질전환 식물체의 잎의 면적 측정 >

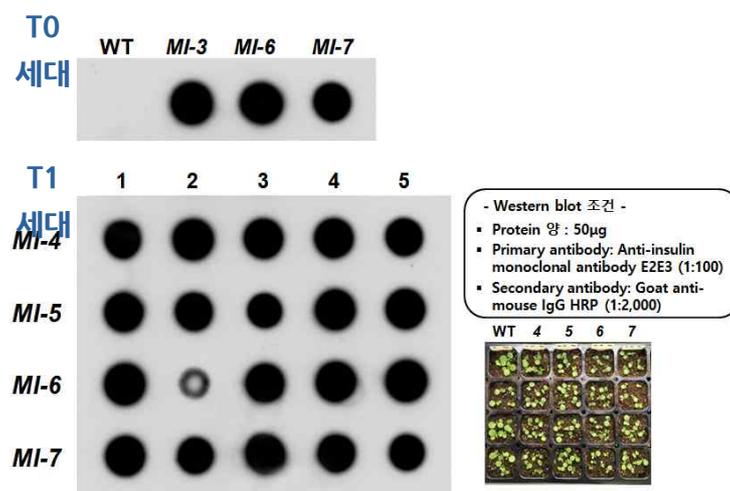
- 인슐린 형질전환 담배 식물체 T1 세대의 종자를 받아 개수 및 무게를 조사하였는데 종자가 야생형에 비해 MI-4를 제외한 모든 라인에서 종자 개수가 5~46% 수준으로 감소하였다. 또한 종자의 무게도 8.9~20.9% 수준으로 감소하였다 (표 324-1-1).
- 인슐린 단백질이 발현된 형질전환 식물체에서의 종자 생성에도 영향을 주어 종자의 개수 및 무게가 감소하는 것으로 보여졌다.

< 표 324-1-1. 재조합 인간 mini proinsulin 형질전환 식물체 T1세대의 종자 개수, 무게 >

Plant	Numbers of seeds	Weight per 100 seeds (mg)
WT	1115±178	6.8±1.1
MI-3	734±266	7.0±0.5
MI-4	1220±542	6.2±1.3
MI-5	1050±240	6.0±1.5
MI-6	906±356	6.8±1.3

○ 형질전환 식물체에서 인간 mini proinsulin 단백질의 발현 확인

- 재조합 인간 mini proinsulin 형질전환 담배식물체에서 인슐린 단백질 발현을 확인하기 위해 단백질을 정제하여 먼저 Human Anti-insulin을 이용하여 western blot를 수행했으나 수용액 내에서 hexamer를 이루고 있는 것으로 확인된 insulin이 항체를 이용하여 insulin 발현을 확인하기 어렵다는 보고가 있는데 역시 우리의 실험에서도 확인되지 않았으므로 우선 dot blot을 수행하였다.
- 형질전환 식물체 MI-3, MI-6, MI-7의 T0 세대에서 단백질을 추출한 후 Anti-insulin을 사용하여 dot blot을 확인한 결과 인슐린 모두에서 단백질이 발현을 분석하였다.
- 재조합 인간 mini proinsulin 도입을 확인한 형질전환 식물체 라인 5개 중 MI-4, MI-5, MI-6, MI-7의 4개 라인에서만 T1 세대를 얻을 수 있었다.

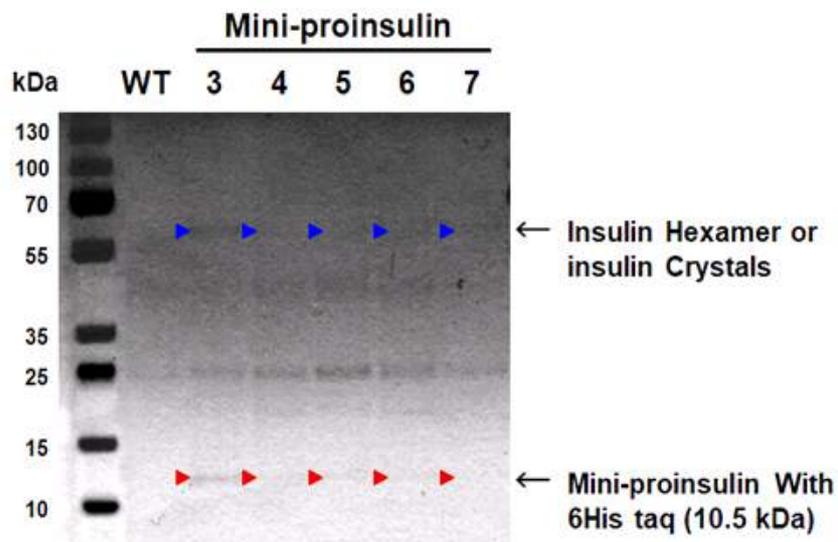


<그림 324-1-10. T1 형질전환식물체에서 인간 mini proinsulin 단백질의 발현 확인 >

- 카나마이신 배지를 이용하여 선발된 T1 세대의 형질전환 식물체를 성공적으로 얻었으며 이의 식물체 앞에서 총단백질을 추출하여 dot blot을 수행하였다 (그림

324-1-10).

- 확보된 재조합 인간 mini proinsulin 형질전환 식물체 라인 4개 모두에서 최종적으로 성공적으로 인슐린 단백질의 발현을 확인하였다.
- dot blot에서 발현이 확인된 재조합 인간 mini proinsulin 형질전환 식물체에서 단백질을 추출한 후 Ni-NTA agarose 컬럼를 이용하여 mini proinsulin을 정제를 수행한 후 His antibody를 사용하여 western blot 분석을 수행하였다.
- 그 결과 형질전환 식물체 *MI-3*, *MI-4*, *MI-5*, *MI-6*, *MI-7* 라인 모두에서 10.5 KDa 크기의 monomer 인슐린이 검출되었으며, 6개의 구조구성단위로 형성되어 저장형태의 인슐린이 되기 위한 hexamer형태인 63 KDa 크기도 확인되었다 (그림 324-1-11).
- 따라서 재조합 인간 mini proinsulin이 본 연구과제에서 설계한 담배 식물체 시스템에서 성공적으로 발현됨을 확인하였다.



< 그림 324-1-11 인간 mini proinsulin 단백질의 구조 확인 >

2. 식물 viral vector를 이용한 mini proinsulin 생산기술 개발

○ 연구수행기관 : 전북대학교, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) 식물 viral vector를 이용한 mini proinsulin 생산기술 개발

- ① 식물에서 mini proinsulin 고발현을 위한 유전자의 최적화 및 합성
- ② human mini proinsulin의 transient expression vector에 클로닝
- ③ Electroporation을 이용한 *Agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환
- ④ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환
- ⑤ 분자생물학적 분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 10대 단백질 의약품으로 분류되는 시장성이 큰 당뇨병 치료제
- 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 많은 품목임
- 우리나라 식약청에서도 바이오시밀러 가이드라인을 제정하여 바이오시밀러 또는 바이오베터의 개발을 장려하고 있는 품목으로 산업화 가능성이 높음
- 본 연구는 식물 viral vector를 이용하여 당뇨병 완화 및 치료에 널리 사용되어지고 있는 mini proinsulin의 생산기술을 개발하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행방법

(1) 식물 viral vector를 이용한 mini proinsulin 생산기술 개발

(가) 세부연구의 수행내용 (재료 및 방법)

- ① 식물에서 mini proinsulin 고발현을 위한 유전자의 최적화 및 합성
- 제 3협동과제에서 수행 중인 human mini proinsulin의 발현수율을 높이고자 주관기관과 제 4협동기관에서 사용하고 있는 벼 현탁세포 특이적 고발현 벡터와 제 2협동과제에서 사용하고 있는 transient expression system을 이용하여 human mini proinsulin을 발현시키고자 human mini proinsulin의 코돈을 식물에 적합하도록 최적화하였음. 벼에서 사용되는 codon usage는 <http://www.kazusa.or.jp/codon/> 의 database에서 제공하는 *Oryza sativa* 데이터를 참고하여 분석하였음.
- ② human mini proinsulin의 transient expression vector에 클로닝
 - TMV based vector인 pMYV150에 주관기관인 NBM으로부터 받은 human mini proinsulin+6his 유전자를 삽입하여 pMYD216으로 명명하였으며, human mini

proinsulin+6his의 3'말단에 KDEL sequence가 융합되어 있는 유전자를 삽입하여 pMYD217로 명명하였다.

③ Electroporation을 이용한 *Agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환

- Electrocompetent agrobacteria cell을 만들기 위하여 agrobacteria (strain GV3101)을 50 mg/L rifampicin이 첨가된 5 ml의 LB medium에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후 agrobacteria 만을 수거하여 항생제를 제거하기 위하여 차갑게 준비된 500ul의 10% glycerol을 이용하여 2번 washing 하였다. Pellet에 차갑게 준비된 100 ul의 10% glycerol로 resuspension 한 후 25 ul를 취하여 미리 차갑게 준비된 EP tube에 분주하여 electrocompetent cell을 준비하였다. 25 ul의 electrocompetent cell에 상기에서 준비된 1 ul의 plasmid DNA를 첨가한 후 미리 차갑게 준비된 cuvette에 mixture를 넣고 ice에서 5분간 방치하였다. GenePulser를 이용하여 1800 kV, 25 uF 그리고 200 Ω 조건하에서 형질전환을 수행하였다. 형질전환 된 electorcompetent cell을 EP tube에 옮긴 후 신선한 1ml의 LB 배지를 첨가한 후 28°C에서 2-3시간 암 상태에서 현탁배양 하였다. 형질전환 된 세포를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에 도말하여 28°C에서 2-3일 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 항생제가 첨가된 배지에서 형성된 단일 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출 한 후 제한 효소 처리로 상기의 유전자들이 성공적으로 도입된 것을 확인하였다.

④ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYD216과 pMYD217이 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재 현탁하였다. *Agrobacterium* 현탁액은 OD₆₀₀에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe를 이용하여 infiltration을 수행하였다. Syringe를 이용한 direction injection은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*의 잎의 뒷면에 박테리아 현탁액을 주사기 바늘없이 주사기로 주입함으로써 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 human mini proinsulin+6his와 human mini proinsulin+6his+KDEL의 각각의 박테리아 현탁액을 조건 당 2개 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 11동안 성장하였고, infiltration 후 5,8 그리고 11에 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리한다.

⑤ 분자생물학적 분석 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS-PAGE)과 Western blot analysis

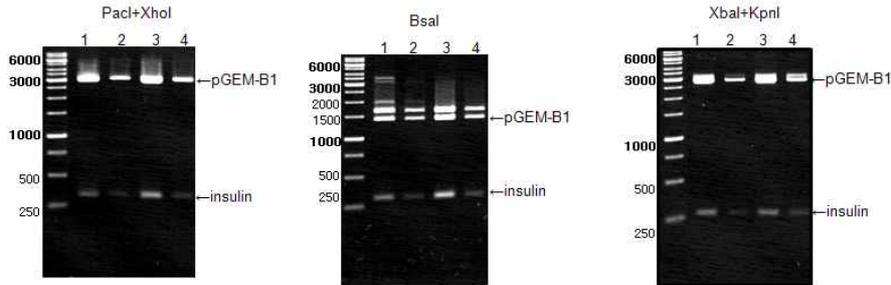
- pMYD 214와 pMYD 215의 발현을 확인하기 위하여 1,2,3,4 그리고 5일 날짜별로 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 μ g의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 reducing과 non-reducing condition에서의 15%의 acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다. Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 anti-human insulin antibody와 anti-his antibody를 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:500으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였으며 이차 항체로 anti-mouse IgG Ap conjugated을 1:7000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

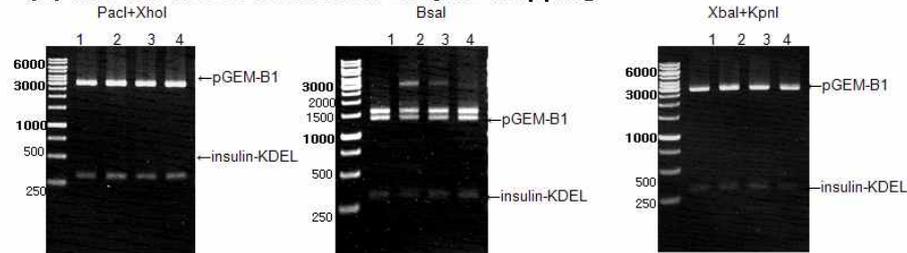
- ① 식물에서 mini proinsulin 고발현을 위한 유전자의 최적화 및 합성
 - 본 연구팀에 의하여 세포 배양시 목적단백질의 고분비 능력이 확인된 rice alpha-amylase 3D (RAmy3D) 유래 signal peptide (3Dsp)와 식물세포에서 단백질 고축적이 확인된 5'UTR Translational Enhancer 유전자를 insulin 유전자의 5'-region에 부착하여 5'UTR/3Dsp/insulin 융합 유전자를 디자인하였으며, C-말단에 His6 tag과 KDEL sequence를 첨가하여 Ni-NTA를 이용한 Affinity chromatography로 정제가 용이하게 하였다.
 - 특히 insulin과 His6-tag 사이에 Arg(R), Arg(R) dibasic processing site를 첨가함으로써 trypsin 처리 한번으로 C-말단의 KDEL 서열과 His6-tag 까지 잘라내어 간단하게 insulin 단백질을 정제할 수 있도록 디자인 하였다. 5-말단에 PacI-BsaI-XbaI 제한효소 자리를 순차적으로 배열하였고 3-말단에는 XhoI-BsaI-KpnI 제한효소자리를 3-말단쪽부터 배열시켰다. 이렇게 디자인된 유전자 서열은 overlap PCR 기술을 이용하여 합성하였음
 - 합성된 insulin과 insulin-KDEL 유전자를 *E. coli*에 형질 전환시켰고 Ampicillin이 포함된 LB 배지에서 자란 콜로니 4개씩을 취하여 제한효소 *PacI+XhoI*과 *BsaI*, 그리고 *XbaI+KpnI* 으로 처리하여 클로닝 여부를 확인하였다 (그림 324-1-8). 그 결과 각 유전자의 콜로니 1번, 2번, 3번, 4번 모두 디자인한 insulin과 insulin-KDEL에 해당하는

334bp와 346bp band 크기가 일치함을 확인하였고, insulin은 콜로니 3번을 선택하였고 insulin-KDEL은 콜로니 1번을 선택하였다. 염기서열을 확인하여 정확하게 합성되었음을 확인 하였으며 완성된 염기서열은 아래와 같음 (그림 324-1-9).

(A) insulin restriction enzyme mapping



(B) insulin-KDEL restriction enzyme mapping



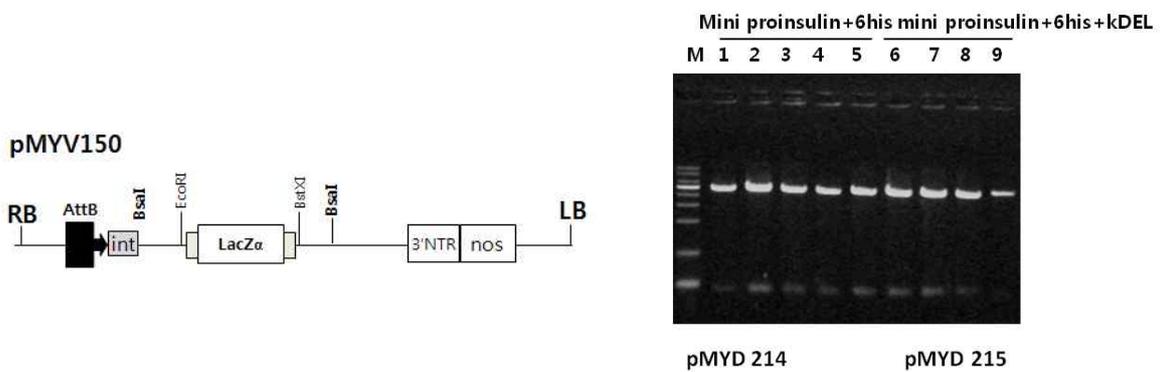
< 그림 324-1-8. 합성된 mini proinsulin의 유전자에 대한 제한효소 mapping >

```

1      10      20      30      40      50      60      70
GGTAAATTAAGGTCTCAAGGTTCTAGAATTATTACATCAAAACAAAAGATGAAGAATACCAGCTCGTTGT
71     80     90    100    110    120    130    140
GTTTGCTTCTCCTCGTGGTGCTTTGCTCACTAACATGCAATTCGGGACAAGCATTTCGTGAATCAGCACCT
141    150    160    170    180    190    200    210
CTGCGGCTCGCACCTGGTCGAGGCCCTCTACTTGGTTTGGGGGAGCGCGGATTCTTCTATACCCCGAAG
211    220    230    240    250    260    270    280
GCCGCTAAGGGTATTGTGGAGCAATGCTGCACAAGCATCTGTTCCCTCTATCAGCTCGAAAACACTACTGTA
281    290    300    310    320    330    334
ACCGCCGCATCACCATCACCACCACCTGATAGGTACCGCTTTGAGACCCCTCGAG 3`
      H H H H H H
    
```

< 그림 324-1-9 식물에 최적화된 proinsulin 염기서열 >

- ② human mini proinsulin+6his와 human mini proinsulin+6his+KDEL의 transient expression vector에 클로닝과 electroporation을 이용한 *Agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환
- TMV based vector인 pMYV150에 human mini proinsulin+6his와 human mini proinsulin+6his+KDEL을 *Bsa* I site를 이용하여 삽입하여 pMYD214과 pMYD215로 명명하였고 infiltration을 위해 *agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환 하였다 (그림 324-1-10).



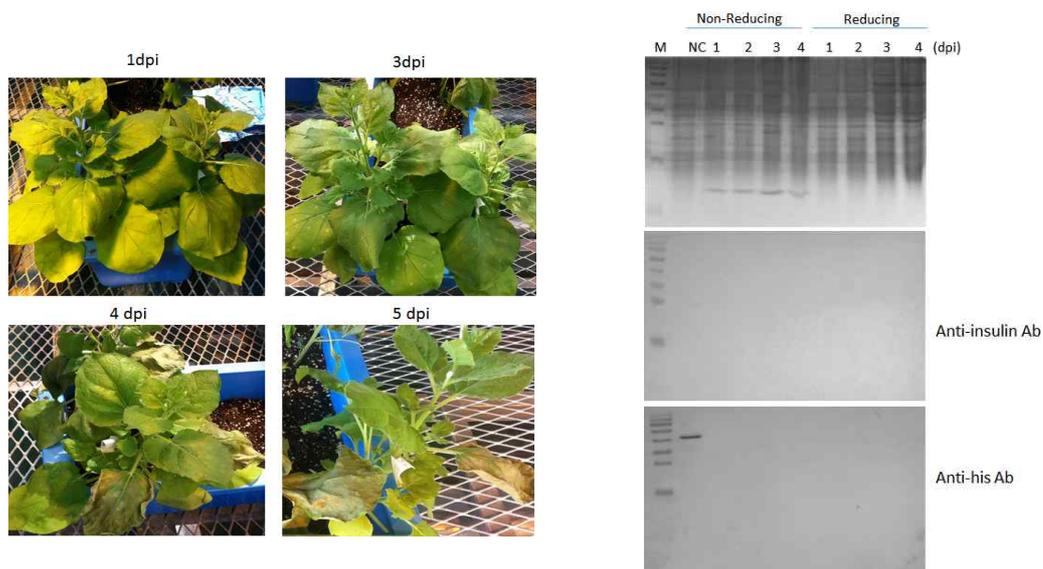
< 그림 324-1-10. TMV based vector인 pMYV150를 이용한 mini proinsulin 발현벡터 pMYD214와 pMYD215 구축 >

③ Mini proinsulin의 고 발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축

- Agroinfiltration 법을 이용한 human mini proinsulin+6his와 human mini proinsulin+6his+KDEL의 발현을 알아보기 위하여 syringe를 이용하여 상기에서 기술한 바와 같은 방법을 이용하여 infiltration 하였으며 5, 8 그리고 11일 째 잎을 수확하였다.

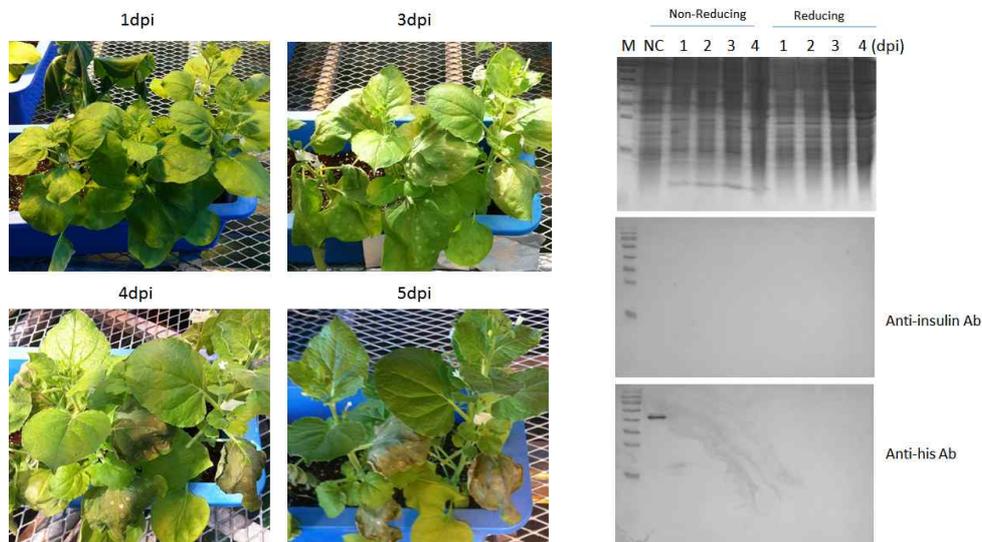
④ 분자생물학적 분석

- Agroinfiltration 법을 이용한 human mini proinsulin+6his (pMYD214)와 human mini proinsulin+6his+KDEL (pMYD215)의 발현을 알아보기 위하여 syringe를 이용하여 상기에서 기술한 바와 같은 방법을 이용하여 infiltration 하였으며 1,2,3,4 그리고 5일 째 잎을 수확하였다.



< 그림 324-1-11. pMYD214가 삽입된 아그로박테리아로 infiltration된 *N.benthamiana*의 상태와 pMYD214의 발현 확인을 위한 SDS-PAGE와 Western blot analysis >

○ 전체 잎 단백질을 추출한 후 proinsulin과 6 histidine에 대한 특이적인 항체들을 이용하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다. Human mini proinsulin+6his이 삽입되어 있는 pMYD214와 pMYD215의 경우 agroinfiltration 후 4일째부터 syringe로 injection된 잎들만 마르는 현상이 관찰되었으며 5일째에는 완전히 말라서 단백질을 추출하는 것이 어려웠다. 이는 insuline이 발현됨에 따라 담배 잎 세포에 독성을 보이는 것으로 사료된다. 추출한 잎 전체 단백질을 이용하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다. 그 결과 pMYD214와 pMYD215 모두에서 reducing 과 non-reducing 조건에서 인슐린 특이적인 항체와 히스티딘 특이적인 항체를 이용한 Western blot analysis에서 단백질의 발현이 확인되지 않았다 (그림 324-1-11, 그림 324-1-12).



< 그림 324-1-12. pMYD215가 삽입된 아그로박테리아로 infiltration된 *N.benthamiana*의 상태와 pMYD215의 발현 확인을 위한 SDS-PAGE와 Western blot analysis >

3. 벼 현탁세포를 이용한 mini proinsulin 생산기술 개발

○ 연구수행기관 : 전북대학교, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- (1) 벼 현탁세포 특이적 고발현 프로모터를 이용한 mini proinsulin 생산기술 개발
 - ① Proinsulin 유전자 확보 및 발현 벡터 제작
 - ② Electroporation을 이용한 *Agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환
 - ③ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환
 - ④ 분자생물학적 분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

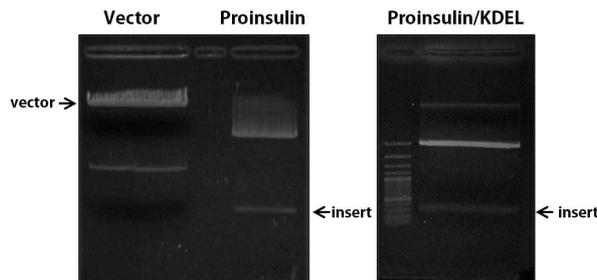
- 10대 단백질 의약품으로 분류되는 시장성이 큰 당뇨병 치료제
- 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 많은 품목임
- 우리나라 식약청에서도 바이오시밀러 가이드라인을 제정하여 바이오시밀러 또는 바이오베터의 개발을 장려하고 있는 품목으로 산업화 가능성이 높음
- 본 연구는 식물 viral vector를 이용하여 당뇨병 완화 및 치료에 널리 사용되어지고 있는 mini proinsulin의 생산기술을 개발하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행방법 및 결과

(1) 유전자 발현벡터 제작

(가) Proinsulin 유전자 확보 및 발현 벡터 제작

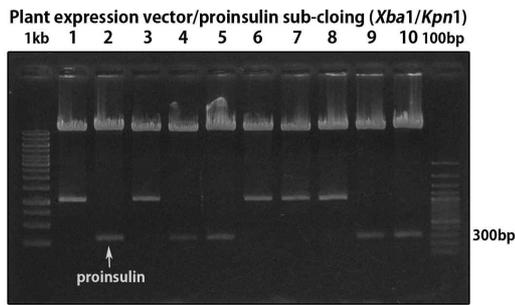
- ① 단자엽 특이적 고발현 시스템을 활용한 proinsulin 유전자의 발현벡터 제작: 주관기관인 NBM으로부터 받은 human mini proinsulin과 proinsulin/KDEL 유전자의 벡터 발현을 위하여, RAmy3D promoter 와 3'-UTR terminator가 포함되어 있는 식물 발현벡터에 클로닝 하였다 (그림 324-1-13). 그 후 vector DNA와 insert로 사용할 proinsulin 과 proinsulin/KDEL DNA 조각을 elution 하고, T4 DNA ligase를 이용하여 15°C에서 12시간 ligation 시킨 후 competent cell에 형질전환 하였다.



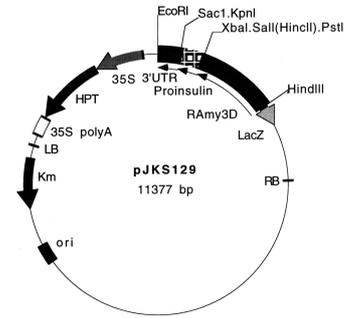
< 그림 324-1-13. 유전자 클로닝을 위한 plasmid DNA 제한 효소반응 >

- ② 50ug/ml의 카나마이신 항생제가 포함된 배지에서 자란 콜로니를 proinsulin의 경우 10개, proinsulin/KDEL의 경우 3개를 각각 취하여 5ml 배지에서 키운 뒤, plasmid DNA를 추출하여 각각 효소 반응을 통하여 유전자 삽입 여부를 확인하였고 (그림 324-14-A), 콜로니 2번을 pJKS129라 명명하였다 (그림 324-1-14). Proinsulin/KDEL의 경우, 3개의 콜로니를 취하여 *Xba* I과 *Kpn* I을 처리하였는데, 콜로니 1-3번 모두 약 300bp의 proinsulin/KDEL 유전자가 삽입되었음을 확인하였고 (그림 324-1-15), 콜로니 1번을 pJKS130 (그림 324-1-15)이라 명명하였다.

(A) Restriction enzyme mapping

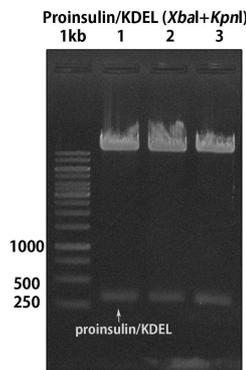


(B) pJKS129 plasmid map

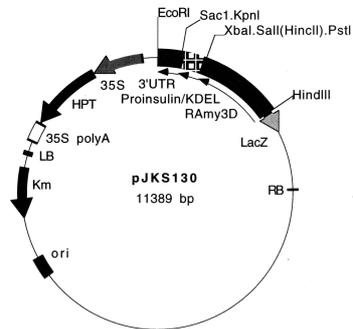


< 그림 324-1-14. Proinsulin 유전자의 식물 발현벡터 클로닝 >

(A) Restriction enzyme mapping



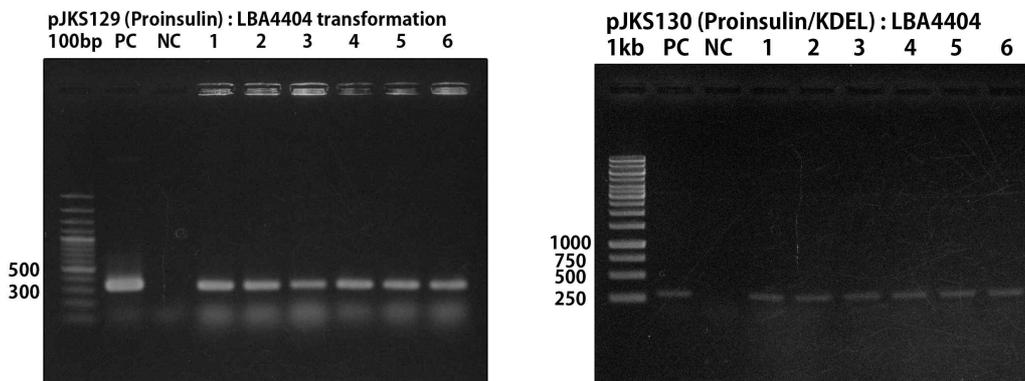
(B) pJKS130 plasmid map



< 그림 324-1-15. Proinsulin/KDEL 유전자를 삽입한 식물발현벡터 >

(나) 식물 형질전환

① pJKS129와 pJKS130 식물 발현벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 tri-parental mating 방법을 사용하여 형질전환 한 콜로니 1번을 pJKS130/LBA4404라 명명 하였다 (그림 324-1-16).



< 그림 324-1-16. Proinsulin 식물 발현벡터의 LBA4404 형질전환 >

(2) Proinsulin 발현 형질전환 cell line 선발

(가) 식물 (벼 캘러스) 형질전환

- 벼 형질전환을 위한 준비과정으로써의 캘러스 유도 과정은 다음과 같다. 먼저 종피를 제거한 종자를 70% 에탄올로 표면소독을 하고, 2% 락스에 20분간 소독하여 30g의 sucrose, 4.4g의 CHU medium (N6; Chu et al., 1975), 1g의 casamino acid와 2,4-D가 포함된 N6CI 배지에 약 16개씩 치상하였다. 지름 3-4mm 정도 크기의 유백색 캘러스가 유도되었고 (Tran et al., 2015; Yang et al., 2013), 3주 후 캘러스를 분리하였다. 분리된 캘러스를 새로운 N6CI 배지로 옮겨주고, 동시에 식물발현벡터가 포함된 LBA4404 균을 AAM배지를 이용하여 [pJKS129(LBA4404), pJKS130(LBA4404)] 배양한다 (Hiei et al., 1994). 3일 후, 벼 캘러스를 LBA4404에 감염시켜, 100 μ M acetosyringone이 포함된 N6CO 배지에 3일간, 25 $^{\circ}$ C에서 암배양 한다. 그 후, 벼 캘러스를 취해 물로 세척하여 여분의 LBA4404를 제거하고, N6S 배지에 (N6CI 배지에 50ug/ml의 Hygromycin B와 500ug/ml cefotaxime이 포함) 치상하여 3-4주 정도 배양하고, 항생제 저항성을 보이며 새로 자라난 캘러스만을 분리하여 30g/L sucrose, 2mg/L, 2,4-D, 0.2mg/L kinetin, 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 배지(N6SE)로 옮겨주었다.

(나) RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/proinsulin/3'UTR (pJKS129) 형질전환체 확보 및 분석

① Total RNA extraction & cDNA synthesis

- *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환 하여 hygromycin B의 저항성을 가지는 총 22개의 캘러스로부터 total RNA를 추출하였다. 액체질소와 Tri-regent를 이용하여 RNA를 추출 한 뒤 최종 RNA pellet을 150ul의 DEPC water에 녹인 후 nanodrop으로 농도를 측정 하였다. 그리고 25ug의 RNA에 DNase I을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 50분간 처리한 후, 350ul DEPC water를 첨가해 total volume을 400ul로 맞춘 뒤 phenol extraction & CHCl₃ treatment 방법으로 RNA purification을 수행 하였다. EtOH 1ml과 40ul 3M NaOAc를 첨가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리 한 후 RNA pellet을 32ul DEPC water에 녹이고 nanodrop으로 농도를 측정하였다.
- 각각의 1ul purified RNA를 Promega의 1st strand cDNA synthesis kit를 이용해서 1ul oligo-dT를 첨가하고 annealing temp: 25 $^{\circ}$ C에서 5min, synthesis temp: 42 $^{\circ}$ C 1hr, 그리고 RTase inactivation temp: 70 $^{\circ}$ C 15min의 조건으로 cDNA를 합성하였다.

② Quantitative real-time PCR

- 각각의 합성된 1ul의 cDNA를 사용하여 normalized expression level을 확인하기 위한 reference gene으로는 house keeping gene인 ubiquitin을 증폭하였고, target gene인 proinsulin을 증폭하여 상대적인 발현량을 분석 수행하였다. Ubiquitin은 forward: 5'-TGA CTA CAA CAT CCA GAA GGA GTC CA-3', reverse: 5'-CAG ATC ATC TTG TCC TGG TTG TAC TTG-3'primer를 사용하였고, proinsulin은 Proins(RT) F:

5'-TTC GTG AAT CAG CAC CTC TG-3', Proins(RT) R: 5'-GCG GCG GTT ACA GTA GTT TT-3' primer를 사용하여 pre denaturation: 95°C 10min, denaturation: 95°C 10s, annealing: 60°C 10s, synthesis: 72°C 20s 40cycle 의 조건으로 real-time PCR을 수행하였다.

(다) RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/proinsulin/KDEL/3'UTR (pJKS130) 형질전환체 확보 및 분석

① Total RNA extraction & cDNA synthesis

- hygromycin B 저항성을 가지는 총 18개의 캘러스로부터 total RNA를 추출하였다. 액체질소와 Tri-reagent를 이용하여 RNA를 추출 한 뒤 최종 RNA pellet을 100ul의 DEPC water에 녹인 후 nanodrop으로 농도를 측정 하였다. 그리고 30ug의 RNA에 DNase I을 첨가하여 37°C에서 50분간 처리한 후, phenol extraction & EtOH precipitation으로 RNA 정제 후 RNA pellet을 40ul DEPC water에 녹이고 nanodrop으로 농도를 측정하였다.
- 각각의 1ul purified RNA를 Promega의 1st strand cDNA synthesis kit를 이용해서 annealing temp: 25°C에서 5min, synthesis temp: 42°C 1hr, 그리고 RTase inactivation temp: 70°C 15min의 조건으로 cDNA를 합성하였다.

② Quantitative real-time PCR

- 각각의 합성된 1ul의 cDNA를 사용하여 언급된 pJKS129의 동일한 real-time PCR 조건으로 reference gene인 ubiquitin과 target gene인 proinsulin을 증폭하여 proinsulin/KDEL mRNA 상대적인 발현량을 분석하였다.

(3) Homo line확보를 위한 재분화식물체의 종자확보

(가) 식물체 재분화

- ① 캘러스로부터 벼 재분화 형질전환체 확보를 위한 준비과정은 다음과 같다. N6SE 배지에 치상된 캘러스 중에서 유백색의 캘러스만을 선별하여 30g/L sucrose, 0.5g/L glutamine, 0.5g/L proline, 0.3g/L casein hydrolysate, 8g/L phytagel, 0.5mg/L NAA, 3mg/L BAP, 250mg/L cefotaxime, 50mg/L hygromycin이 포함된 N6(MSRE)고체배지에 치상하고 25°C, 16/8 (day/night) 시간 일장 조건에서 배양하였다.
- ② 약 2~3달 후, 캘러스로부터 shooting된 개체를 선별하여 1% hyponex 용액에서 1주일간 순화시킨 후 수도용 상토에 심어서 재분화 된 벼를 약 8개월간 생육시켰다.

(4) Proinsulin 발현 형질전환 cell line 선발

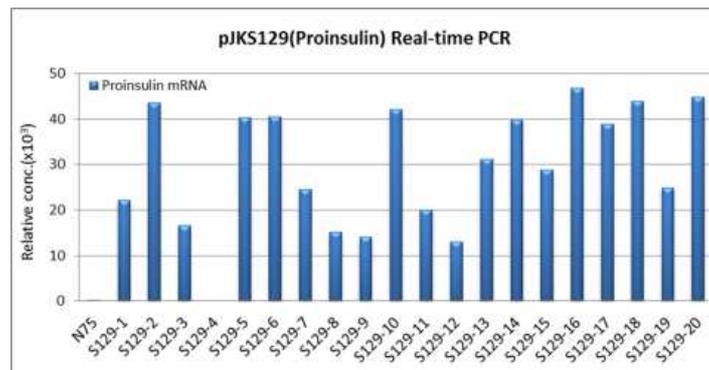
(가) 식물 (벼 캘러스) 형질전환

- ① 1차년도에 제작되었던 pJKS129(RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/proinsulin/3'UTR)과

pJKS130(RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/proinsulin/KDEL/3'UTR) 벡터를 이용하여 벼에 형질전환을 수행 하였다. *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 이용하여 pJKS107(LBA4404), pJKS117(LBA4404)균을 형질 전환 하여 hygromycin B가 포함되어있는 배지에서 저항성을 가지는 캘러스를 선별 한 결과, pJKS129는 총 20개의 항생제 저항성 캘러스를 선발하였고 pJKS130은 총 18개의 캘러스를 선발하여 N6SE 배지로 옮겨 배양 하였다.

(나) RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/proinsulin/3'UTR (pJKS129) 형질전환체 확보 및 분석

① 항생제 저항성을 가진 총 20개의 pJKS129 캘러스로부터 proinsulin의 transcription level을 비교하기 위해 cDNA를 합성하여 real-time PCR을 수행 하였다. Vector control인 N75를 negative control로 설정하고 ubiquitin-based proinsulin mRNA 발현량을 비교한 결과, S129 #4번 캘러스는 transcription이 일어나지 않았고 S129 #16 캘러스가 상대적으로 가장 proinsulin 발현률이 높은 결과를 확인하였다 (그림 324-1-17). 이 중에서 mRNA 발현율이 높은 상위 8개의 캘러스 (S129 #2, #5, #6, #10, #14, #16, #18, #20)을 선발하였고 향후 단백질 분석을 위해 suspension culture를 수행하였다.



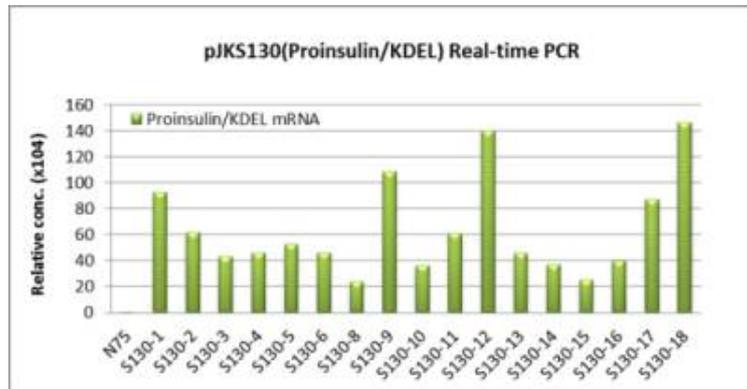
< 그림 324-1-17. Ramy3Dpro/5'UTR/3Dsp/proinsulin(pJKS129) mRNA expression level >

(다) RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/proinsulin/KDEL/3'UTR (pJKS130) 형질전환체 확보 및 분석

① Hygromycin B 항생제의 저항성을 가지는 18개의 pJKS130 캘러스로부터 cDNA를 합성하여 proinsulin/KDEL의 mRNA 발현량을 비교하기 위해 real-time PCR을 수행하였다 (그림 324-1-18). S130 #7번 캘러스에서는 RNA 농도측정 결과 RNA가 추출되지 않은 것으로 확인되어 제외하였다. Negative control은 vector만 형질전환된 N75 캘러스를 사용하였고 ubiquitin의 발현량을 바탕으로 proinsulin/KDEL mRNA 발현량을 분석한 결과, S130 #18 캘러스가 가장 mRNA 발현 비율이 높았다 (그림 324-1-19). 상대적으로 높은 S130 #1, #9, #12, #18 캘러스를 선발하였고 suspension culture를 수행하였다.

Sample ID	ng/ul	260/280	Sample ID	ng/ul	260/280	Sample ID	ng/ul	260/280	Sample ID	ng/ul	260/280
S130-1	1331.65	1.98	S130-10	1263.30	1.97	S130-1 (DNase I)	321.89	1.76	S130-10 (DNase I)	278.10	1.92
S130-2	1127.91	1.99	S130-11	1420.63	1.94	S130-2 (DNase I)	320.64	1.83	S130-11 (DNase I)	269.19	1.82
S130-3	1357.92	1.97	S130-12	1392.73	1.97	S130-3 (DNase I)	291.57	1.84	S130-12 (DNase I)	299.48	1.85
S130-4	1105.32	1.92	S130-13	1392.53	1.93	S130-4 (DNase I)	238.63	1.92	S130-13 (DNase I)	276.61	1.76
S130-5	1077.05	1.94	S130-14	1506.87	1.95	S130-5 (DNase I)	292.16	1.75	S130-14 (DNase I)	249.18	1.93
S130-6	1089.53	1.95	S130-15	465.09	1.85	S130-6 (DNase I)	260.11	1.88	S130-15 (DNase I)	202.80	1.86
S130-7	295.53	1.86	S130-16	1873.23	1.96	S130-7 (DNase I)	-14.64	0.93	S130-16 (DNase I)	120.72	2.05
S130-8	1455.66	1.97	S130-17	1859.56	1.96	S130-8 (DNase I)	307.59	1.79	S130-17 (DNase I)	301.06	1.79
S130-9	1157.60	1.93	S130-18	735.78	1.96	S130-9 (DNase I)	251.42	1.89	S130-18 (DNase I)	341.26	1.64

< 그림 324-1-18. pJKS130 RNA 농도 측정 & DNase 1 처리 후 정량 측정 >



< 그림 324-1-19. Ramy3Dpro/5'UTR/3Dsp/proinsulin/KDEL(pJKS130) mRNA expression level >

3-2-5. 식물유래 hG-CSF 생산기술 확립 및 산업화

1. 벼 현탁세포를 이용한 hG-CSF 생산기술 개발

- 연구수행기관 : (주)엔비엠, (재)전주생물소재연구소, 한국생명공학연구원

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- (1) 벼 현탁세포를 이용한 hG-CSF 생산기술 개발
- (2) RAmy3D promoter를 이용한 hG-CSF 발현 벡터 제작
- (3) shG-CSF 발현벡터의 형질전환
- (4) shG-CSF 고발현 형질전환체 선발

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- hG-CSF는 세계시장 연 40억\$(약 5조원)로 시장성이 매우 큼
- 2006년 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 가장 많은 품목임
- 현재 대장균에서 G-CSF 생산기술이 일본 기업에 의하여 독점되어 있어 현재 시약으로도 구입이 어려움(식물에서 발현된 것은 해당 없으므로 생산단계에서 즉시 연구용(연구용 만 500억 시장)으로 사업화가 가능함)
- 우리나라 식약청에서도 바이오시밀러 가이드라인을 제정하여 바이오시밀러 또는 바이오베터의 개발을 장려하고 있는 품목으로 산업화 가능성이 높음
- 상기와 같이 hG-CSF의 다량생산이 가능할 경우 산업화 가능성이 매우 높다고 판단되어 벼 현탁세포를 이용한 hG-CSF의 생산기술을 확립하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) 벼 현탁세포를 이용한 hG-CSF 생산기술 개발

- 인간 유래의 granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) 유전자를 단자엽 고발현 시스템인 벼에서 발현하기 위하여 유전자 분석을 수행하였다. 본 연구에서 목적으로하는 G-CSF 유전자는 인간 유래이며, 단백질 발현 시스템으로는 단자엽 식물인 벼를 사용하고 있다. 일반적으로 이와 같은 경우에, 인간과 벼에서 사용하는 codon usage의 차이에 의해, 벼 에서 낮은 빈도로 사용되는 codon usage가 목적 유전자에 사용되었을 경우, 그 유전자의 단백질 발현 효율 또는 정밀도가 낮아진다고 보고되어 있으므로, hG-CSF의 codon usage를 확인해보았다. 벼에서 사용되어지는 codon usage는 <http://www.kazusa.or.jp/codon/> 의 database에서 제공하는 *Oryza sativa*

데이터를 참고하여 분석하였다.

- 그림 325-1-1에서 볼 수 있듯이, native hG-CSF (hG-CSF) 염기서열을 위쪽에, 벼에서 효율적으로 작용 가능한 코돈으로 최적화하여 설계한 hG-CSF (shG-CSF) 염기서열을 아래쪽에 나열하였으며, 치환되어야 하는 염기서열은 붉은색 소문자로 표시하였다. 그 결과, 낮은 사용빈도의 codon은 전체 codon 178개중 48 로, 이는 전체 codon의 27%에 해당되며, 전체 534개의 염기서열 중에서 49개의 염기서열이 치환되어야 하는 것으로 확인되었다. 또한 shG-CSF의 경우, 분리-정제를 용이하게 하기 위하여 polyhistidin-tag (6xHis) 을 3'-말단에 부착하였다 (그림 325-1-1, 파란색 소문자표기). hG-CSF 유전자 염기 사용빈도 분석결과는 표 325-1-1에, codon 사용 빈도 분석결과를 표 325-1-2에 나타내었다.

< 표 325-1-1. G-CSF 유전자 염기 사용빈도 분석 >

Base	hG-CSF	shG-CSF
	count (%)	count (%)
A	86 (16.10)	91 (17.04)
C	192 (35.95)	192 (35.95)
G	157 (29.40)	158 (29.58)
T(U)	99 (18.53)	93 (17.41)

```

1      10      20      30      40      50      60      70
hG-CSF: ACCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCGAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGA
          * * * * *
shG-CSF: ACaCCaCTGGGCCCTGCCAGCTcCTGCCaCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTgGAGCaGtGAGGAAGA

71      80      90      100     110     120     130     140
TCCAGGCGATGGCGCAGCCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCC
          * * * * *
TCCAGGCGATGGCGCcGGCCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGcGAGTGcGCCACCTACAAGCTGTGCCACCC

141     150     160     170     180     190     200     210
CGAGGAGCTGGTGTCTCGGACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCGAGCCAG
          * * * * *
aGAGGAGCTGGTGTCTCGGcCACTCTCTGGGCATCCCaTGGGcCCaCTGAGCAGCTGCCaAGCCAG

211     220     230     240     250     260     270     280
GCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCCATAGCGGCCTTTTCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGG
          * * * * *
GCCCTGCAGCTGGCcGGCTGCTTGAGCCAgCTCCATAGCGGCCTcTTCCTCTACCaAGGcCTCCTGCAaG

281     290     300     310     320     330     340     350
CCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACTGCAGCTGGACGTGCGCGACTTTGC
          * * * * *
CtCTGGAgGGcATCTCCCCaGAGTTGGGcCCaACCTTGGACACTGCAGCTGGACGTGCGCGACTTcGC

351     360     370     380     390     400     410     420
CACCACCATCTGCAGCAGATGGAAGAAGTGGGAATGGCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATG
          * * * * *
CACaACaATCTGCAGCAGATGGAgGAGCTGGGAATGGCCCTGCTCTGCAGCCaACaCAGGGcGCCATG

421     430     440     450     460     470     480     490
CCGGCTTCGCCTCTGCTTCCAGCGCCGGCAGGAGGGTCTGGTTCCTCCATCTGCAGAGCTTCC
          * * * * *
CCaGcTTCGCCTCTGcCTTCCAGCGCCGGCcGGcGGcGTCTGGTcGGCTcTcATCTGCAGAGCTTCC

491     500     510     520     530
TGGAGGTGTCGTACCGGTTTCTACGCCACCTTGCCAGCCCTGA 3'
          * * * * *
TGGAGGTGTCtTACCGGTcCTgCGCCACCTcGCCAGCCacatcaccatcaccatcacTGA 3'
                                     H H H H H H
    
```

< 그림 325-1-.1 shG-CSF 코돈 최적화 염기서열 >

< 표 325-1-2. G-CSF 유전자 코돈 사용빈도 분석 >

Codon	hG-CSF count (%)	shG-CSF count (%)	Codon	hG-CSF count (%)	shG-CSF count (%)
TTT-Phe	1 (0.56)	0 (0.00)	TAT-Tyr	0 (0.00)	0 (0.00)
TTC-Phe	5 (2.80)	6 (3.37)	TAC-Tyr	3 (1.68)	3 (1.68)
TTA-Leu	1 (0.56)	0 (0.00)	TAA-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TTG-Leu	3 (1.68)	4 (2.24)	TAG-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TCT-Ser	2 (1.12)	5 (2.80)	TGT-Cys	1 (0.56)	0 (0.00)
TCC-Ser	3 (1.68)	1 (0.56)	TGC-Cys	4 (2.24)	5 (2.80)
TCA-Ser	0 (0.00)	0 (0.00)	TGA-***	1 (0.56)	1 (0.56)
TCG-Ser	1 (0.56)	0 (0.00)	TGG-Trp	2 (1.12)	2 (1.12)
CTT-Leu	2 (1.12)	0 (0.00)	CAT-His	2 (1.12)	2 (1.12)
CTC-Leu	6 (3.37)	8 (4.49)	CAC-His	3 (1.68)	3 (1.68)
CTA-Leu	1 (0.56)	0 (0.00)	CAA-Gln	2 (1.12)	2 (1.12)
CTG-Leu	20 (11.23)	21 (11.79)	CAG-Gln	15 (8.42)	15 (8.42)
CCT-Pro	2 (1.12)	2 (1.12)	CGT-Arg	0 (0.00)	0 (0.00)
CCC-Pro	10 (5.61)	0 (0.00)	CGC-Arg	3 (1.68)	3 (1.68)
CCA-Pro	0 (0.00)	11 (6.17)	CGA-Arg	0 (0.00)	0 (0.00)
CCG-Pro	1 (0.56)	0 (0.00)	CGG-Arg	1 (0.56)	1 (0.56)
ATT-Ile	0 (0.00)	0 (0.00)	AAT-Asn	0 (0.00)	0 (0.00)
ATC-Ile	4 (2.24)	4 (2.24)	AAC-Asn	0 (0.00)	0 (0.00)
ATA-Ile	0 (0.00)	0 (0.00)	AAA-Lys	0 (0.00)	0 (0.00)
ATG-Met	3 (1.68)	3 (1.68)	AAG-Lys	4 (2.24)	4 (2.24)
ACT-Thr	0 (0.00)	0 (0.00)	AGT-Ser	1 (0.56)	0 (0.00)
ACC-Thr	6 (3.37)	2 (1.12)	AGC-Ser	8 (4.49)	9 (5.05)
ACA-Thr	1 (0.56)	5 (2.80)	AGA-Arg	0 (0.00)	0 (0.00)
ACG-Thr	0 (0.00)	0 (0.00)	AGG-Arg	1 (0.56)	1 (0.56)
GTT-Val	2 (1.12)	0 (0.00)	GAT-Asp	1 (0.56)	1 (0.56)
GTC-Val	2 (1.12)	4 (2.24)	GAC-Asp	3 (1.68)	3 (1.68)
GTA-Val	0 (0.00)	0 (0.00)	GAA-Glu	3 (1.68)	0 (0.00)
GTG-Val	4 (2.24)	4 (2.24)	GAG-Glu	7 (3.39)	10 (5.61)
GCT-Ala	2 (1.12)	2 (1.12)	GGT-Gly	2 (1.12)	0 (0.00)
GCC-Ala	13 (7.30)	15 (8.42)	GGC-Gly	6 (3.37)	13 (7.30)
GCA-Ala	3 (1.68)	0 (0.00)	GGA-Gly	3 (1.68)	1 (1.56)
GCG-Ala	1 (0.56)	2 (1.12)	GGG-Gly	3 (1.68)	0 (0.00)

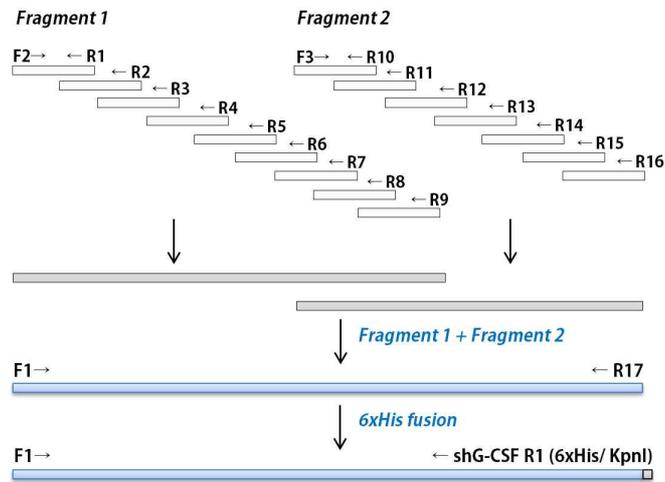
○ 상기의 코돈 분석 결과를 바탕으로 최적화된 염기서열을 이용하여 shG-CSF에 대한 primer를 설계하였으며, overlap extension PCR 방법으로 shG-CSF 유전자를 합성하였다. 본 실험에 사용한 primer는 다음과 같다.

- 아래의 primer로 overlap extension PCR 방법을 이용하여 벼의 코돈으로 최적화된 shG-CSF(His6) 단편을 그림 325-1-2에 도식화한 과정을 통하여 합성하였다. PCR 결과 합성한 최종 산물을 pGEM-T-easy vector에 클로닝 하여 염기서열을 확인한 결과, 당초의 설계대로 정확하게 합성되었음을 확인 하였고, 이를 pMYO304라 명명하였다 (그림 325-1-3).
- shG-CSF(His6) 유전자를 포함하는 pMYO304는 당초 계획에 의거하여 식물발현벡터에 도입한 후 벼에 형질전환을 하기위하여 제 4협동기관에 제공하였다

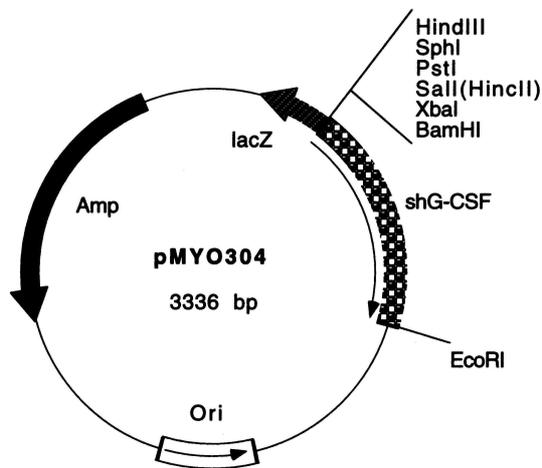
```

shG-F1 : TTGGATCCATGGCCGGACCTGCCACAC
shG-F2 : TTGGATCCATGGCCGGACCTGCCACACAGAGCCCAATGAAGCTGATG
shG-F3 : GCATCCCATGGGCCCCACTGAGCAGCTGCCAAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCCG
GCTGCT
shG-R1 : TGTGCCACAGCAGCAGCTGCAGGGCCATCAGCTTCATTGGGCTCT
shG-R2 : CTCCTGCACTGTCCAGAGGGCGCTGTGCCACAGCAGCAG
shG-R3 : GAGCTGGCAGGGCCCCAGTGGTGTGGCCTCCTGCACTGTCCAGAGG
shG-R4 : CTTCTCACCTGCTCCAAGCACTTGAGCAGGAAGCTCTGTGGCAGAGAGCTGGC
AGGGCCCAGTGGTG
shG-R5 : CCAGCTTCTCCTGGAGCGCGGCCATCGCCCTGGATCTTCTCACCTGCTCCA
AGCACT
shG-R6 : TCTGGGTGGCACAGCTTGTAGGTGGCGCACTCGCTCACCAGCTTCTCCTGGAGC
GCGGCG
shG-R7 : AGAGAGTGGCCGAGCAGCACCAGCTCCTCTGGGTGGCACAGCTTGTAGG
shG-R8 : CAGTGGGGCCCATGGGATGCCAGAGAGTGGCCGAGCAGC
shG-R9 : CCGGCCAGCTGCAGGGCCTGGCTTGGGCAGCTGCTCAGTGGGGCCCATGGGAT
GC
shG-R10 : AGGAGGCCCTGGTAGAGGAAGAGGCCGCTATGGAGCTGGCTCAAGCAGCCGGC
CAGCTGCAGGGCCTG
shG-R11 : TGGGCCAACTCTGGGGAGATGCCCTCCAGAGCTTGCAGGAGGCCTTGGTAGA
GGAAGAG
shG-R12 : GGGCCATGCCAGCTCCTCCATCTGCTGCCAGATTGTTGTGGCGAAGTCGGCGA
CTCCA
shG-R13 : CGAACGCTGGCATTGCGCCCTGTGTTGGCTGCAGAGCAGGGGCCATCCCAGCT
CCT
shG-R14 : ACGCCGCCGCCCCGGCGCTGGAAGGCAGAGGCGAACGCTGGCATGGCGCCCTG
shG-R15 : AGACACCTCCAGGAAGCTCTGCAGATGAGAGGCGACCAGGACGCCCGGCC
GGCGCTG
shG-R16 : TCATGGCTGGGCGAGGTGGCGCAGGACGCGGTAAGACACCTCCAGGAAGCTCT
GCA
shG-R17 : TTGGTACCTTCATGGCTGGGCGAGGTG
shG-CSF R1 : GGTACCTCAGTGATGGTGATGGTGATGTGGCTGGGCGAGGTG

```



< 그림 325-1-2. Overlap extension PCR을 이용한 shG-CSF 합성과정 >



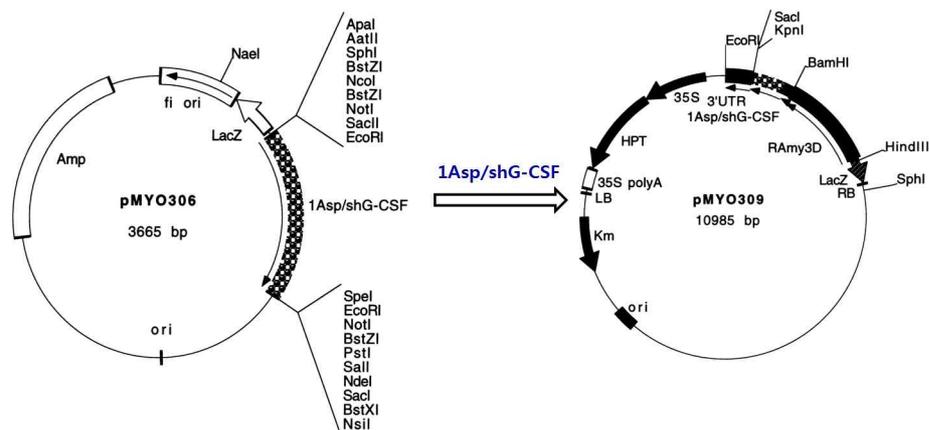
< 그림 325-1-3. shG-CSF 유전자가 삽입된 플라스미드 >

(2) RAmy3D promoter를 이용한 hG-CSF 발현 벡터 제작

(가) RAmy1A signal peptide (1Asp)를 포함한 shG-CSF 발현 벡터 제작

- ① 본 연구에서는 벼 현탁세포 배양을 통하여 hG-CSF 단백질을 배지내로 분비시켜 고발현 시키고자 하였으며, 본 연구팀에 의하여 세포 배양시 목적단백질의 고분비 능력이 확인된 rice alpha-amylase 1A (RAmy1A) 유래 signal peptide (1Asp)를 hG-CSF 유전자의 5'-region에 부착하여 1Asp/hG-CSF 융합 유전자를 확보하였으며, pMYO306 플라스미드에 클로닝 하였다. 이를 rice alpha-amylase 3D promoter (RAmy3D promoter) 와 3'-UTR terminator가 포함되어 있는 식물 발현벡터에 클로닝 하였고, 최종적으로 만들어진 플라스미드를 pMYO309라 명명하였다 (그림 325-1-4). RAmy3D promoter는 벼 현탁세포

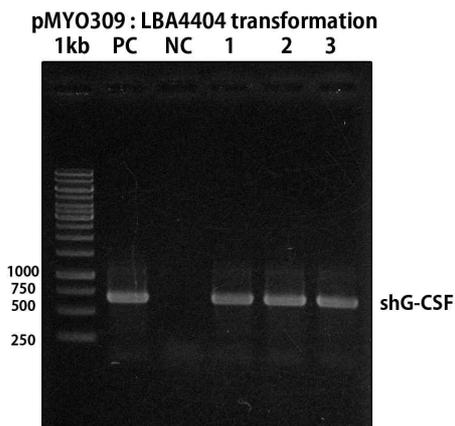
배양시 당 결핍 조건에서 목적 단백질의 고발현과 고분비를 유도하는 비 특이적 프로모터이며, 3'-UTR은 당 결핍 환경에서 만들어진 mRNA의 분해를 억제하여 목적 단백질의 안정화에 기여하여 결과적으로 고발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.



< 그림 325-1-4. 1Asp/shG-CSF 유전자가 삽입된 식물 발현벡터 제작 >

(나) 식물발현벡터의 *Agrobacterium* 형질전환

① 콜로니 1번을 pMYO309/LBA4404 (그림 325-1-5)라 명명하였으며 이를 식물 형질전환에 사용하였다.

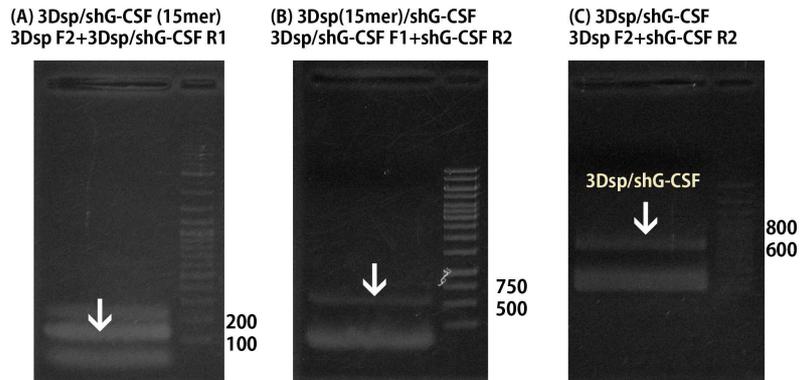


< 그림 325-1-5. 1Asp/shG-CSF(pMYO309)의 LBA4404 형질전환 >

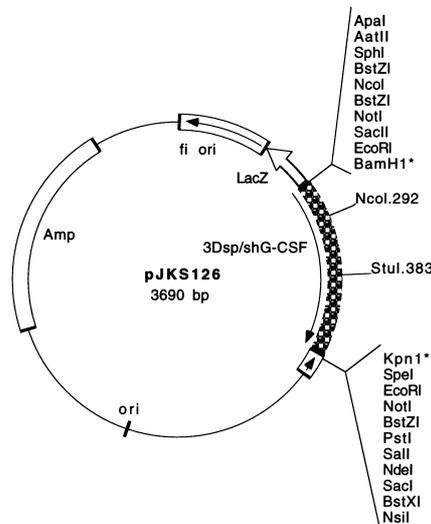
(다) RAmY3D signal peptide (3Dsp)를 포함한 shG-CSF 발현 벡터 제작

① 상기 언급하였듯, 본 연구에서는 목적 유전자의 고발현 유도를 위하여 RAmY3D promoter를 사용하였으므로 목적단백질의 분비 효율을 더 높이기 위하여, shG-CSF의 구조를 제작하였다. 증폭된 shG-CSF 단편과 (572 bp, 그림 325-1-6-B) 이 두 개의 단편을 섞어 3Dsp F2와 shG-CSF R2 프라이머를 사용하여 최종 목표 단편인

3Dsp/shG-CSF (617 bp, 그림 325-1-6-C) 융합 유전자를 확보하였으며 이를 pJKS126이라 명명하였다 (그림 325-1-7).



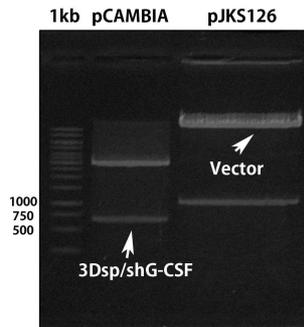
< 그림 325-1-6. 3Dsp/shG-CSF 단편 확보를 위한 PCR >



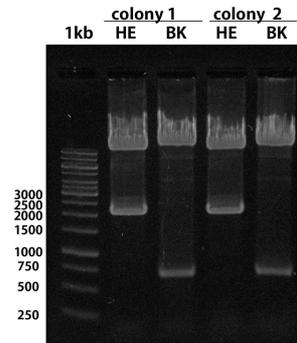
< 그림 325-1-7. 3Dsp/shG-CSF 유전자가 삽입된 plasmid >

② pJKS126 plasmid의 3Dsp/shG-CSF fragment를 RAmy3D promoter 와 3'-UTR이 포함되어 있는 식물 발현벡터에 클로닝하기 위하여, pCAMBIA1300-based plasmid 와 pJKS126 plasmid DNA를 제한효소 *BamH* 1과 *Kpn* 1으로 처리하였다. Agarose gel로부터 각각의 vector와 3Dsp/shG-CSF 부분의 DNA를 elution 하고 (그림 325-1-8-A), ligation을 수행한 후 TOP10에 형질전환 하였다. 항생제가 포함된 배지에서 자란 콜로니 2개를 취하여 *Hind* III+*EcoR* 1 (RAmy3D promoter /3Dsp/shG-CSF/3'-UTR 유전자 배열 확인)과 *BamH* 1+*Kpn* 1 (3Dsp/shG-CSF 유전자 삽입 확인)의 2가지 방법으로 제한효소를 처리 하여 클로닝 여부를 확인하였다. 그 결과 콜로니 1번, 2번 모두 나타난 band 크기가 일치함을 확인하였고 (그림 325-1-7-B), 콜로니 1번을 pJKS127이라 명명하였다 (그림 325-1-9).

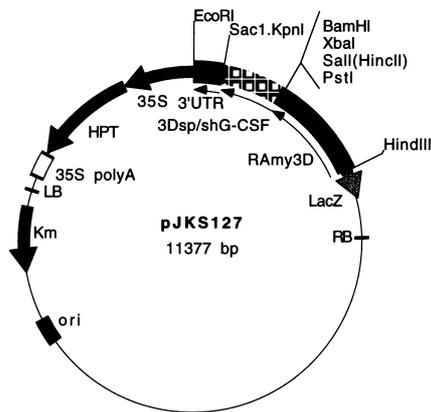
(A) Enzyme reaction for sub-cloning



(B) pJKS127 restriction enzyme mapping



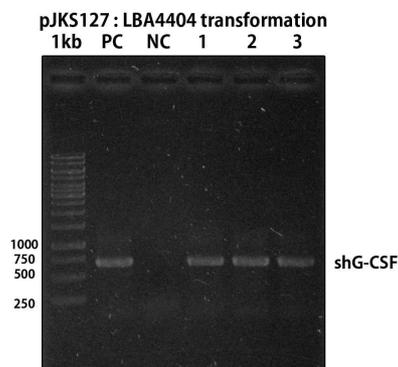
< 그림 325-1-8. 3Dsp/shG-CSF의 식물 발현벡터 클로닝 >



< 그림 325-1-9. 3Dsp/shG-CSF 유전자가 삽입된 식물 발현벡터 제작 >

(라) 식물발현벡터의 *Agrobacterium* 형질전환

① 상기 확보한 pJKS127 식물발현벡터를 tri-parental mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 형질전환한 콜로니 1-3모두 shG-CSF 유전자의 증폭이 확인되었으며 콜로니 1을 pJKS127(LBA4404)라 명명하였다 (그림 325-1-10).

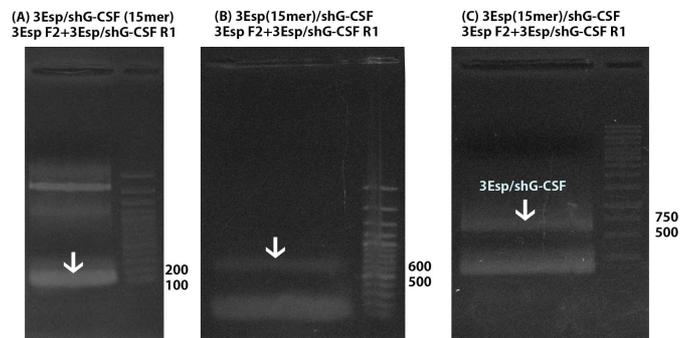


< 그림 325-1-10. 3Dsp/shG-CSF(pJKS127)의 LBA4404 형질전환 >

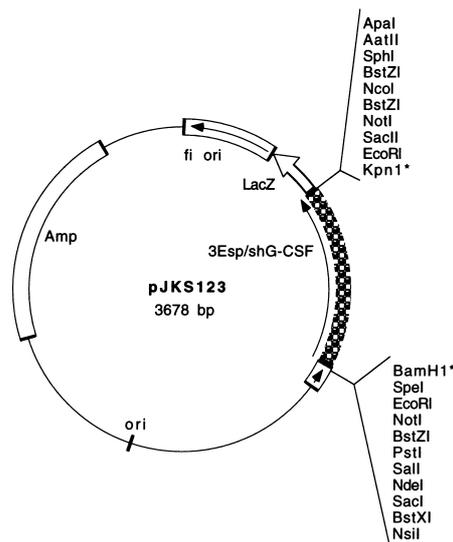
(마) RAmy3E promoter를 이용한 hG-CSF (3Esp/shG-CSF) 발현 벡터 제작

① 3Esp/ShG-CSF 유전자 확보

㉔ 본 연구팀에는 RAmy3D promoter를 이용한 단자엽 고발현 시스템 이외에도, rice alpha-amylase 유래의 3E promoter (RAmy3E promoter)를 보유하고 있다. 이 RAmy3E 시스템 역시 RAmy3D promoter와 같이, 현탁세포 배양에서 당 결핍시 목적 단백질의 고발현을 유도하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 RAmy3E promoter system을 이용하여 shG-CSF를 발현을 확인하고자 하였으며, 이를 위하여 RAmy3E signal peptide (3Esp)를 shG-CSF 유전자에 융합하여 3Esp/shG-CSF 유전자를 확보하였다. shG-CSF 단편을 증폭하였다 (576 bp, 그림 325-1-11-B). 이 두 개의 단편을 섞어 3Dsp F2와 shG-CSF R2 프라이머를 사용하여 최종 목표 단편인 3Dsp/shG-CSF (663 bp, 그림 325-1-11-C) 융합 유전자를 확보하였으며, 이를 pJKS123이라 명명하였다 (그림 325-1-12).

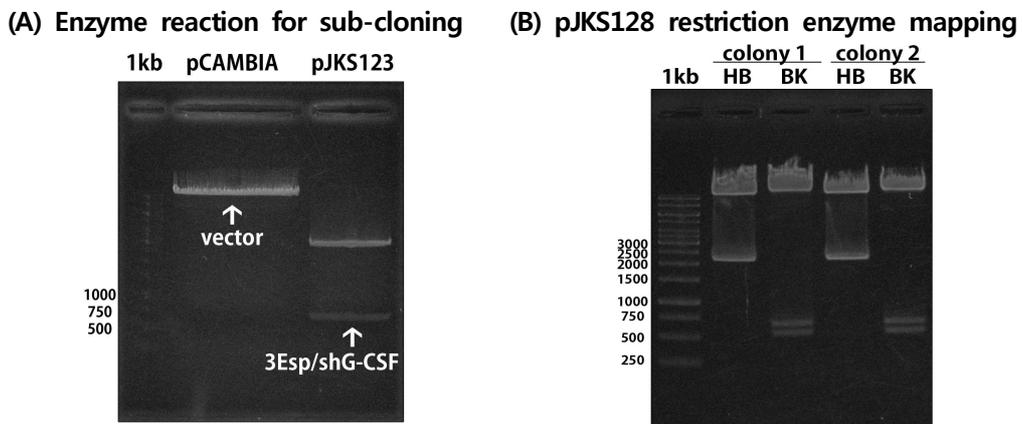


< 그림 325-1-11. 3Esp/shG-CSF 유전자 식물 발현벡터 제작 >

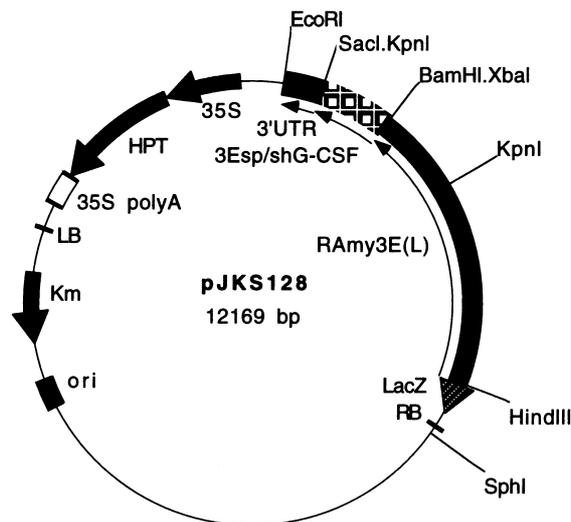


< 그림 325-1-12. 3Esp/shG-CSF 유전자가 삽입된 plasmid >

⊕ pJKS123 plasmid의 3Esp/shG-CSF fragment를 RAmy3E promoter 와 3'-UTR이 포함되어 있는 식물 발현벡터에 클로닝하기 위하여, pCAMBIA1300-based plasmid 와 pJKS123 plasmid DNA를 제한효소 *BamH* 1과 *Kpn* 1으로 처리하였다. Agarose gel로부터 각각의 vector와 3Esp/shG-CSF 부분의 DNA를 elution 하고 (그림 325-1-13-A), ligation을 수행한 후 TOP10에 형질전환 하였다. 항생제가 포함된 배지에서 자란 콜로니 2개를 취하여 *Hind* III+*Bam*H 1 (RAmy3E promoter확인)과 *Bam*H 1+*Kpn* 1 (RAmy3E promoter/shG-CSF 유전자 삽입 확인)의 2가지 방법으로 제한효소를 처리 하여 클로닝 여부를 확인하였다. 그 결과 콜로니 1번, 2번 모두 나타난 band 크기가 일치함을 확인하였고 (그림 325-1-13-B), 콜로니 1번을 pJKS128이라 명명하였다 (그림 325-1-14).



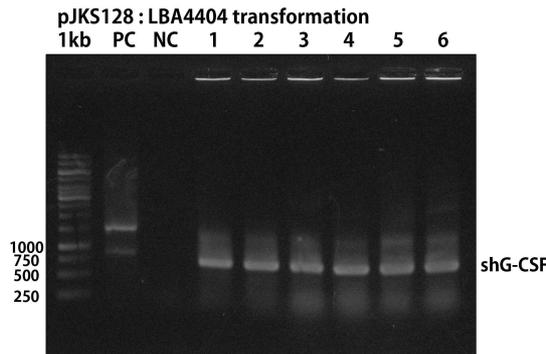
< 그림 325-1-13. 3Esp/shG-CSF의 식물 발현벡터 클로닝 >



< 그림 325-1-14. 3Esp/shG-CSF가 삽입된 식물 발현벡터 제작 >

② 식물발현벡터의 *Agrobacterium* 형질전환

- ㉞ 상기 확보한 pJKS128 식물발현벡터를 tri-parental mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 형질전환 한 콜로니 1을 pJKS128(LBA4404)라 명명하였다 (그림 325-1-15).



< 그림 325-1-15. 3Esp/shG-CSF(pJKS128)의 LBA4404 형질전환 >

(3) shG-CSF 발현벡터의 형질전환

(가) 식물 형질전환

- ① *Agrobacterium*-mediated Biolistic-mediated and plant transformation plant transformation 위의 재료 및 방법에 의하여 수행하였다.

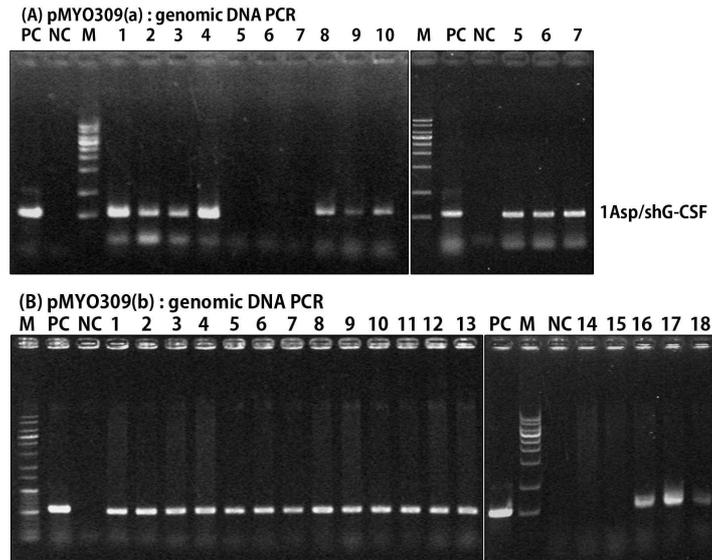
(나) 형질전환 식물체 분석

- ① 1Asp/shG-CSF (pMYO309) 형질전환체 확보 및 분석

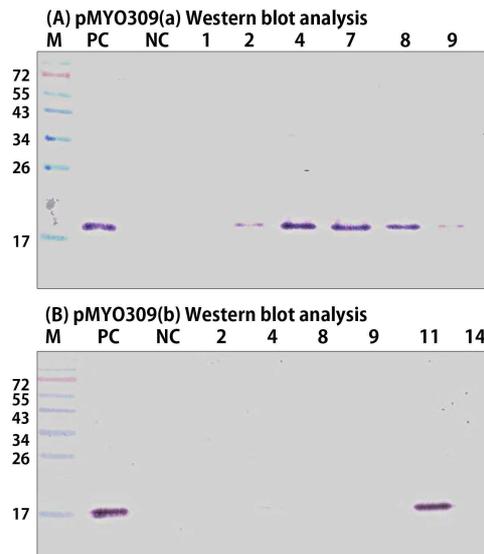
- ㉞ pMYO309의 경우 *Agrobacterium*-mediated 방법과, Biolistic-mediated의 2가지 방법을 사용하여 형질전환을 수행하였다. *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환 된 경우, 10개의 캘러스를 (pMYO309a), bombardment를 이용하여 형질전환 된 경우 총 18개의 캘러스를 (pMYO309b)가 항생제를 포함하는 선택배지에서 증식함을 확인하였다. 본 실험에 사용한 PC로는 pMYO309 plasmid DNA를, NC로는 형질전환 시키지 않은 벼 캘러스로부터 추출한 genomic DNA를 사용하였으며, 1Asp/shG-CSF에 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 pMYO309(a)에서는 캘러스 1-10번 모두에서 1Asp/shG-CSF가 증폭되었음을 확인하였다 (그림 325-1-16-A). 또한 pMYO309(b)에서는 14번과 15번을 제외한 16개의 캘러스에서 1Asp/shG-CSF 유전자의 삽입을 확인 할 수 있었다 (그림 325-1-16-B).

- ㉞ Genomic DNA PCR에서 1Asp/shG-CSF 유전자 삽입을 확인한 세포주로부터 일정량의 캘러스를 취하여 벼 현탁세포 배양을 확립하였다. Western blot analysis를 수행한 결과, pMYO309(a)의 경우, 4, 7, 8번 세포주에서 가장 강한 hG-CSF 발현을 (그림 325-1-17-A),

pMYO309(b)의 경우 11번 세포주에서 가장 강한 발현을 나타내는 것으로 확인되었다 (그림 325-1-17-B).



< 그림 325-1-16. pMYO309 genomic DNA PCR >



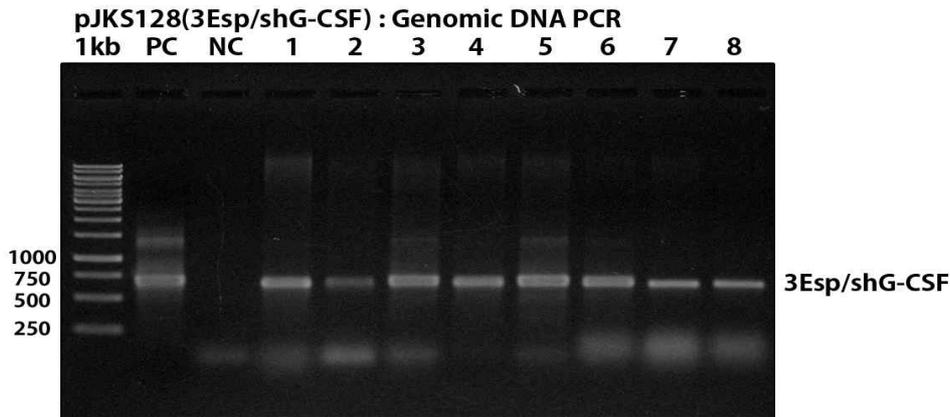
< 그림 325-1-17. hG-CSF 단백질 발현 확인 >

② 3Dsp/shG-CSF 형질전환체 확보

㉞ pJKS127의 경우, *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 형질전환을 수행하였으며, 현재 항생제 저항성을 보이는 캘러스를 약 20여개 확보하였다.

③ 3Esp/shG-CSF (pJKS128) 형질전환체 확보 및 분석

㉞ pJKS128은 *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 총 8개의 항생제 저항성을 보이는 캘러스를 확보하였다. 각각의 캘러스로부터 genomic DNA를 추출하고, 각각의 DNA 50ng을 이용하여, PCR을 수행하였다. PC로는 pJKS128 plasmid DNA를, NC로는 형질전환 시키지 않은 벼 캘러스로부터 추출한 genomic DNA를 사용하였다. 3Esp/shG-CSF에 특이적인 RAm3E sp F/shG-CSF R2 프라이머 세트를 이용하여 PCR 수행한 결과, 1-8 모든 세포주에서 3Esp/shG-CSF 가 증폭되었음을 확인하였다 (그림 325-1-18).



< 그림 325-1-18. pJKS128 Genomic DNA PCR >

(4) hG-CSF 고발현 형질전환체 선발

(가) 연구수행 방법

① Total RNA extraction & cDNA synthesis

- *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환 하여 hygromycin B의 저항성을 가지는 총 8개의 cell line을 선별하여 각각의 캘러스로부터 Tri-regent와 액체질소를 이용하여 total RNA를 추출하였다. RNA pellet을 150ul DEPC water에 녹인 후 nanodrop으로 농도를 측정 하였다. 측정된 RNA 농도를 근거로 하여 30ug의 RNA에 DNase I을 첨가하여 37°C에서 40분간 처리한 후, 400ul DEPC water를 첨가해 total volume을 500ul로 맞추고 phenol extraction & EtOH precipitation을 수행하였다. Purified RNA pellet을 40ul DEPC water에 녹이고 nanodrop으로 농도를 측정하였다.
- 각각의 1ul purified RNA를 template로 하여 1ul oligo-dT를 첨가해 70°C에서 5분간 denaturation을 실시하고 ice에 5분간 fixing 하였다. 그리고 Promega의 1st strand cDNA synthesis kit를 이용해서 annealing temp: 25°C 5min, synthesis temp: 42°C 1hr, RTase inactivation temp: 70°C 15min의 조건으로 cDNA를 합성하였다.

② Northern blot analysis

- 각각의 캘러스로부터 Tri-reagent를 이용하여 추출한 total RNA를 사용하여 RNA level에서 고발현 shG-CSF elite line을 선별하기 위해 Northern blot analysis를 수행하였다. 각각의 total RNA를 20ug씩 사용하여 formaldehyde gel에 40 volt로 3시간정도 loading하여 gel 1ea는 18S, 28S RNA를 확인하기 위해 EtBr staining을 수행하였고 다른 1ea gel은 positive charged nylon membrane에 transfer를 수행하였다. Transfer 된 membrane은 shG-CSF probe를 사용하여 hybridization을 수행한 후, 2일과 7일의 exposure time 조건으로 shG-CSF mRNA의 발현을 분석 하였다.

③ Quantitative real-time PCR

- *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 획득한 캘러스 중에서 RNA level에서 고 발현 shG-CSF elite line을 선별하기 위해 real-time PCR (qPCR) 방법을 수행하였다. 각각의 합성된 cDNA 1ul를 template로 사용하였고, normalized expression level을 확인하기 위한 reference gene으로는 ubiquitin을 사용하였다. Ubiquitin은 forward: 5'-TGA CTA CAA CAT CCA GAA GGA GTC CA-3', reverse: 5'-CAG ATC ATC TTG TCC TGG TTG TAC TTG-3' primer를 이용하여 증폭하였고 shG-CSF는 shG(RT)F: 5'-CTC CAG GAG AAG CTG GTG AG-3', shG(RT)R: 5'-AGG AGG CCT TGG TAG AGG AA-3'을 이용하여 증폭하였다. Real-time PCR 조건은 Pre-denaturation은 95°C 10min이며 denaturation 95°C 10sec, annealing 60°C 15sec, synthesis 72°C 20sec를 총 40cycle로 하여 분석을 하였다.

④ Suspension culture

- Real-time PCR을 통해 선별된 pJKS127 #5, #6, #8, #11, #12, #13 총 6개 callus line을 각각의 callus로부터 분비되는 shG-CSF 단백질을 확인하기 위하여 cell suspension culture system을 이용하여 실험을 수행하였다 (Shin YJ et al., 2011). 30g/L sucrose, 2mg/L, 2,4-D, 0.2mg/L kinetin, 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지 (N6SE)에 pJKS127 line callus를 넣고 28°C에서 150rpm으로 암배양을 수행하였다. 1주일 후 어느 정도 자란 callus를 mesh망을 이용하여 잘게 sieving을 하여 새로운 N6SE배지에 액체 배양을 하였다. 1주일 간격으로 위의 단계를 2~3번씩 반복 하였다. 잘게 배양된 callus를 무균상태에서 진공펌프를 이용해 배양액을 제거하고 5g의 현탁세포를 N6SE 배지에서 sucrose가 제거된 N6-S배지에 10ml/g 비율로 접종하여 당 결핍 상태로 28°C에서 150rpm으로 암배양을 수행하였다. 당 결핍 7일째, 배지내로 분비된 shG-CSF 단백질을 분석하기 위하여 각각의 배양액을 취하여 12,000rpm에서 30분간 원심분리를 하여 상등액을 취한 뒤 단백질 분석을 실시하였다. 이후 분비 시스템은 이 방법을 이용하여 진행하였다.

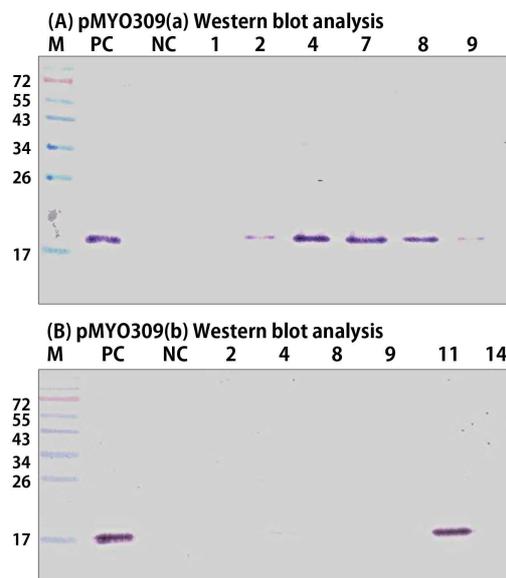
⑤ SDS-PAGE & western blot analysis

- 당 결핍 배양에서 취한 배양액을 SDS-PAGE & western blot analysis를 위한 재료로 사용하였다. 28ul의 배양액을 10-20% gradient PAGE-Gel (ATTO)에 20mA/gel로 전기영동을 실시하였다. 전기영동 한 gel 1개는 coomassie blue 염색약을 넣어서 SDS-PAGE analysis 실시하였고, 나머지 gel은 PVDF western blotting membrane (03 010 040 001, roche)에 200mA로 90분간 transfer 하였다. 이후 PVDF membrane을 5% skim milk로 RT에서 30분간 3회 blocking 하고 0.1% tween 20이 첨가된 TBS buffer (TBST)로 15분간 3회 세척 한 후 biotinylated anti-human G-CSF (R&D systems, BAF214)를 1차 항체로 사용하여 4°C에서 O/N 하였다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, anti-goat IgG AP (Santacruz)를 2차 항체로 사용하여 4°C에서 2시간동안 반응시켰다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, NBT/BCIP (Roche)용액으로 PVDF membrane을 detection하여 G-CSF 단백질을 확인 하였다.

(나) 연구 결과

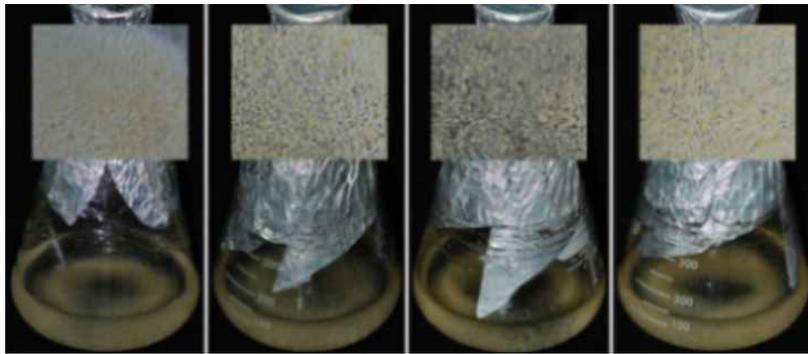
① RAmy3D promoter에 의한 hG-CSF 고발현 cell line 선발 및 배양 유지

- RAmy3D promoter/1Asp/hG-CSF/3'UTR terminator 발현하는 pMYO309백터를 *Agrobacterium* -mediated transformation을 통하여 얻어진 캘러스 라인 pMYO309(a), Biolistic-mediated transformation을 통하여 얻어진 캘러스 라인 pMYO309(b)의 웨스턴 분석 결과, pMYO309(a)- 2, 4, 7, 8, 및 9, 그리고 pMYO309(b)- 11을 확보하였다 (그림 325-1-19, 1차년도 초과 달성 결과로 제시한 바 있음).

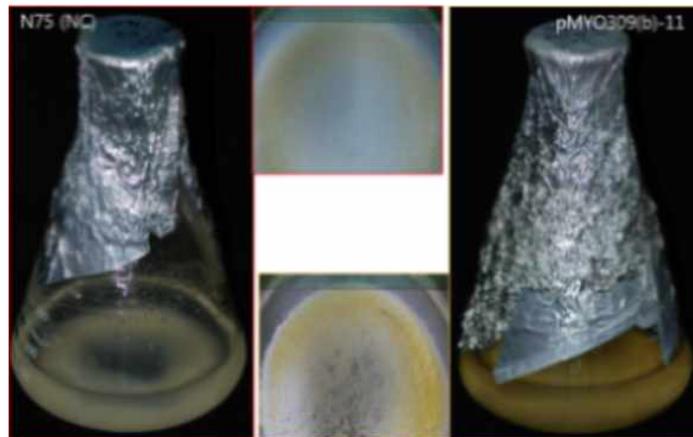


< 그림 325-1-19. pMYO309 캘러스 라인들의 hG-CSF 단백질 발현 확인 >

- 웨스턴 블롯을 통하여 hG-CSF 단백질 발현이 확인된 켈러스 라인들 중 켈러스 상태가 덩어리지지 않고 미세 입자로 곱게 발달하며 생육이 가장 우수한 것을 최종 선별하고자 하였다. 켈러스는 suspension culture가 진행되는 동안 cell들이 엉겨서 덩어리지는 것을 많이 볼 수 있는데 그러할 경우 대량배양시 불리하며 더욱이 secretion시스템을 적용하는 본 연구의 경우 곱고 미세하게 자라는 cell line 선별은 중요한 선별 요인 중의 하나이다 (그림 325-1-20). 매우 미세하고 균일한 형태로 자라고 있는 담배 켈러스 (대조구;NC)와 비교하여 최종 선별한 pMYO309(b)-11의 켈러스 자람을 비교하였다 (그림 325-1-21).



< 그림 325-1-20. 다양한 형태로 자라고 있는 켈러스 >

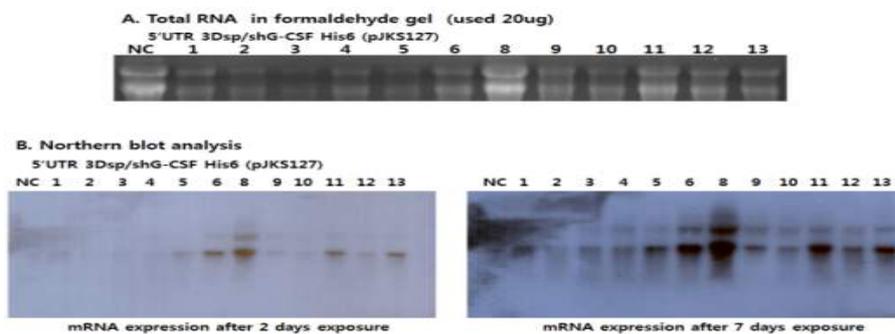


< 그림 325-1-21. 우수한 cell line 선발을 위한 켈러스 배양 확인. 좌측(빨간색 테두리)는 대조구 (NC), 우측(노란색 테두리)는 pMYO309(b)-11 선별 라인의 켈러스 배양 모습 >

- 위의 선별 요인을 고려하여 최종적으로 pMYO309(b)-11번을 hG-CSF 발현 cell line으로 선별하였으며, 현재 대량배양을 위하여 제1세부과제 (주)엔비엠에 전달하여 배양 중에 있다.

② 5'UTR 3Dsp/shG-CSF His6 (pJKS127) 고발현 형질전환체 선별

- 1차년도에서 *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 확보된 항생제 저항성 캘러스를 이용하여 mRNA에서 shG-CSF 유전자가 발현하는지 확인하기 위한 Northern blot 분석을 수행하기 위하여 총 12개의 5'UTR 3Dsp/shG-CSF His6 (pJKS127) line에서 total RNA를 추출하였다. 추출한 각각의 total RNA를 nano drop으로 농도를 측정 하였다
- 각각의 20ug total RNA를 이용하여 Northern blot 분석을 수행하였다. Negative control(NC)는 vector만 형질전환 된 N75 개체를 사용하였고 formaldehyde gel에 loading하여 EtBr에 염색한 결과, 모두 18S, 28S에 해당하는 band가 확인되어 RNA가 잘 추출된 것을 확인하였다(그림 325-1-22-A). Membrane에 transfer하여 northern blot 분석 결과, 2일, 7일의 exposure time에서 pJKS127 #5, 6, 8, 11, 12, 13번 개체에서 band가 확인 되었고 (그림 325-1-22-B), 단백질 분석을 수행하기 위하여 cell suspension culture를 실시하였다.



< 그림 325-1-22. 5'UTR 3Dsp/shG-CSF/His6 (pJKS127) northern blot analysis. (A) Total RNA in formaldehyde gel, (B) Northern blot analysis of pJKS127 callus cell lines >

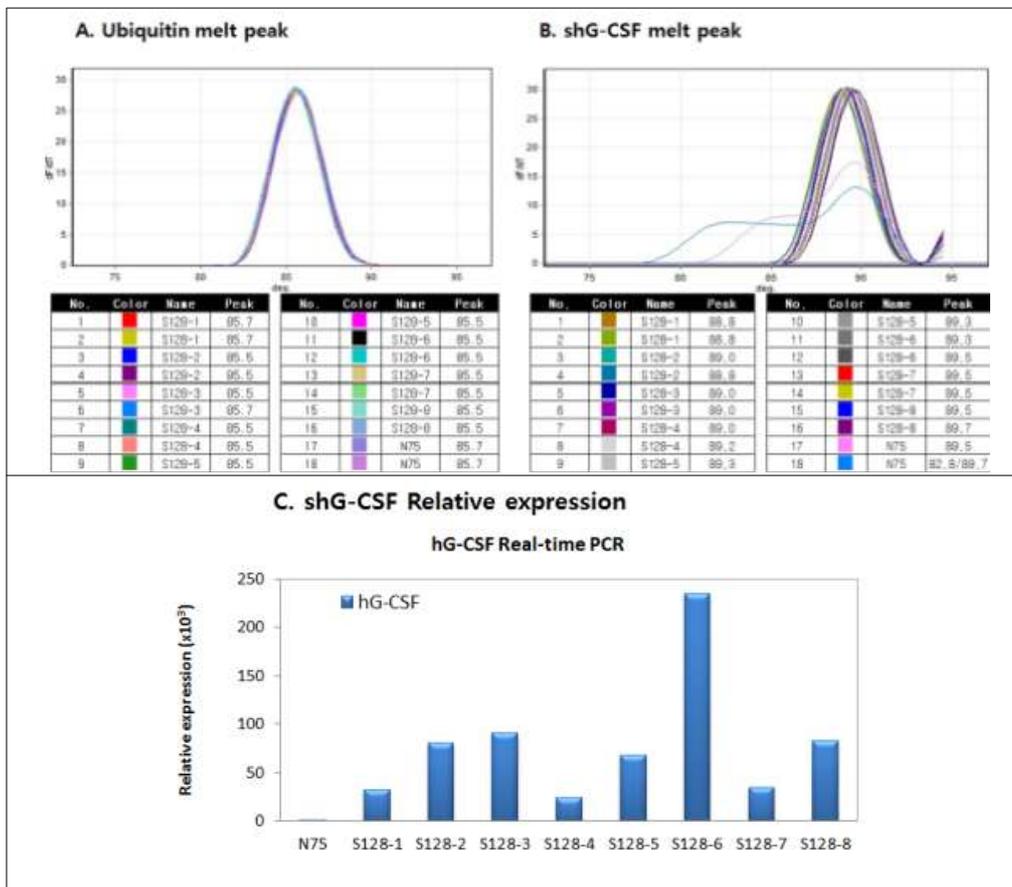
③ 3Esp/shG-CSF His6 (pJKS128) 고발현 형질전환체 선별

- 1차년도에서 genomic DNA PCR을 수행하여 1차적으로 확인된 총 8개의 캘러스로부터 Tri-regent/ LN2 grinding해서 total RNA를 추출 한 후 DNaseI을 처리한 후 RNA를 purification하여 nano drop으로 농도를 측정 하였다 (그림 325-1-23).

Sample ID	ng/ul	260/280	Sample ID	ng/ul	260/280
N75	419.67	1.79	N75 (DNase 1)	446.99	1.85
S128-1	876.77	1.95	S128-1 (DNase 1)	448.52	1.90
S128-2	762.67	1.90	S128-2 (DNase 1)	420.10	2.00
S128-3	737.42	1.88	S128-3 (DNase 1)	372.68	1.94
S128-4	1004.36	1.94	S128-4 (DNase 1)	416.98	1.90
S128-5	959.20	1.92	S128-5 (DNase 1)	408.73	1.92
S128-6	1156.74	1.93	S128-6 (DNase 1)	371.89	1.93
S128-7	966.70	1.96	S128-7 (DNase 1)	414.70	1.93
S128-8	1392.62	1.98	S128-8 (DNase 1)	539.11	2.01

< 그림 325-1-23. RNA 농도 측정 & DNase 1 처리 후 정량 측정 >

○ 각각의 sample에 대하여 1ug의 RNA를 이용해 cDNA를 합성 하였고 RNA level에서 hG-CSF의 발현율을 알아보기 위하여 real-time PCR을 수행 하였다. Reference gene인 ubiquitin melt peak는 N75 (negative control)을 포함한 모든 샘플에서 85.5~7°C의 one peak가 형성되어 단편 증폭을 확인하였고 (그림 325-1-24-A), shG-CSF primer를 사용하여 증폭한 melt peak 결과는 88.8~89.5°C의 one peak가 형성되었지만 negative control인 N75에서는 제대로 증폭이 되지 않은 결과를 얻었다 (그림 325-1-24-B). 이 결과를 바탕으로 normalized expression level을 측정한 결과, pJKS128 cell line에서 shG-CSF의 mRNA 발현량이 가장 높은 line은 pJKS128-#6 개체였다 (그림 325-1-24-C). 이 real-time PCR 데이터를 바탕으로 #3, 6, 8번 cell line을 선발하였다.



< 그림 325-1-24. shG-CSF mRNA expression level of pJKS128 cell line >

2. 식물 viral vector를 이용한 hG-CSF 생산기술 개발

○ 연구수행기관 : 전북대학교, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- (1) hG-CSF의 transient expression vector에 클로닝
- (2) Electroporation을 이용한 *Agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환
- (3) Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환
- (4) 분자생물학적 분석 (SDS-PAGE와 Western blot analysis)
- (5) hG-CSF의 정량분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- hG-CSF는 세계시장 연 40억\$(약 5조원)로 시장성이 매우크고 2006년 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 가장 많은 품목임
- 우리나라 식약청에서도 바이오시밀러 가이드라인을 제정하여 바이오시밀러 또는 바이오베터의 개발을 장려하고 있는 품목으로 산업화 가능성이 높음
- 상기와 같이 hG-CSF의 다량생산이 가능할 경우 산업화 가능성이 매우 높다고 판단되어 식물 고발현 viral vector를 이용한 hG-CSF의 생산기술을 확립하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용

(1) 벼 현탁세포를 이용한 hG-CSF 생산기술 개발

(가) 연구개발 수행방법

① hG-CSF의 transient expression vector에 클로닝

- TMV based vector인 pMYV150에 선행연구결과 확보된 native hG-CSF 유전자를 삽입하여 pMYO88으로 명명하였으며, rice amylase 3D signal peptide가 융합된 3Dsp+hG-CSF 유전자를 삽입하여 pMYO90으로 명명하였다. 주관기관인 NBM으로부터 받은 식물의 codon으로 최적화 된 synthetic hG-CSF 유전자를 pMYV150에 삽입하여 pMYD408로 명명하였으며, 3'말단에 정제를 용이하게 하기 위하여 6 his tag을 융합한 유전자를 pMYV150 삽입하여 pMYD409로 명명하였다.

② Electroporation을 이용한 *Agrobacterium* (strain GV3101)에 형질전환

- Electrocompetent agrobacteria cell을 만들기 위하여 agrobacteria (strain GV3101)을 50 mg/L rifampicin이 첨가된 5 ml의 LB medium에 접종하여 28°C, 암상태의

현탁배양기에서 하루 동안 배양하였다.

- 원심분리기를 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후 *agrobacteria* 만을 수거하여 항생제를 제거하기 위하여 차갑게 준비된 500ul의 10% glycerol을 이용하여 2번 washing 하였다. Pellet에 차갑게 준비된 100 ul의 10% glycerol로 resuspension 한 후 25 ul를 취하여 미리 차갑게 준비된 EP tube에 분주하여 electrocompetent cell을 준비하였다. 25 ul의 electrocompetent cell에 상기에서 준비된 1 ul의 plasmid DNA를 첨가한 후 미리 차갑게 준비된 cuvette에 mixture를 넣고 ice에서 5분간 방치하였다. GenePulser를 이용하여 1800 kV, 25 uF 그리고 200 Ω 조건하에서 형질전환을 수행하였다.
- 형질전환 된 electorcompetent cell을 EP tube에 옮긴 후 신선한 1ml의 LB 배지를 첨가한 후 28°C에서 2-3시간 암 상태에서 현탁배양 하였다. 형질전환 된 세포를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에 도말하여 28°C에서 2-3일 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 항생제가 첨가된 배지에서 형성된 단일 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출 한 후 제한 효소 처리로 상기의 유전자들이 성공적으로 도입된 것을 확인하였다.

③ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYV160과 pMYV161이 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재 현탁하였다. *Agrobacterium* 현탁액은 OD₆₀₀에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe를 이용하여 Kim 등 (2012)이 수행한 것과 같이 infiltration을 수행하였다.
- Syringe를 이용한 direction injection은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*의 잎의 뒷면에 박테리아 현탁액을 주사기 바늘없이 주사기로 주입함으로써 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 native hG-CSF와 synthetic hG-CSF의 각각의 박테리아 현탁액을 조건 당 2개 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 11동안 성장하였고, infiltration 후 5,8 그리고 11일에 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리하였다.

④ 분자생물학적 분석 (SDS-PAGE와 Western blot analysis)

- Native hG-CSF와 synthetic hG-CSF의 발현을 확인하기 위하여 시간별로 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 μg의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의

방법에 기초하여 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다.

- Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 biotinylated anti-human G-CSF antibody (R&D systems, BAF214)을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:500으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였으며 이차 항체로 anti-Goat IgG Ap conjugated (Sigma, A4187)을 1:7000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

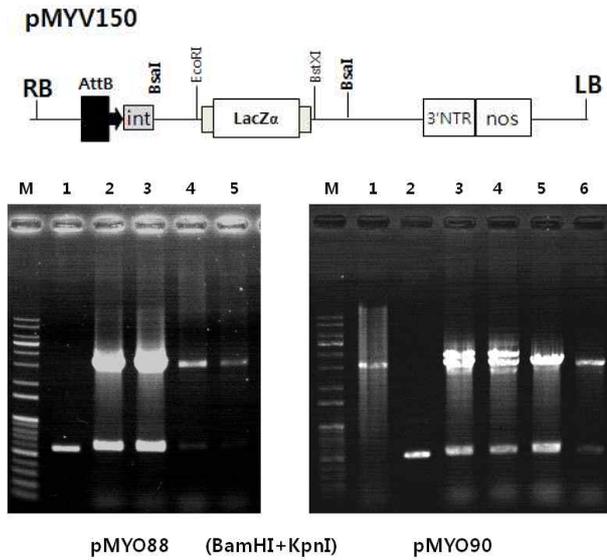
⑤ hG-CSF의 정량분석

- Agroinfiltration된 담배 잎으로부터 hG-CSF의 발현량을 정량하기 위하여 hG-CSF에 특이적인 ELISA kit (Endogene, Woburn, MA)의 사용방법을 이용하였다. ELISA용 96웰 플레이트에 웰 당 2 ug/ml의 capture antibody 가 포함된 50 µl coating buffer를 분주하고 4 °C에서 하루 밤 방치한 다음 PBST 세척완충액 (PBS 완충액 1 L + 0.5 ml 트윈20)로 4차례 세척하였다. 웰 당 200 µl의 분석 희석액 (assay diluent; 10 % FBS을 포함하는 PBS 완충액)을 분주하고, 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBST 세척완충액으로 3회 세척하였다. Standard protein 과 연속적으로 희석된 sample 들을 각 웰당 100 µl 분주한 후 4 °C에서 하루 밤 방치한 다음 PBST 세척완충액 (PBS 완충액 1 L + 0.5 ml 트윈20)로 4차례 세척하였다. Detection antibody를 웰 당 100µl 씩 분주한 다음 상온에서 2시간 방치하였고, PBST 세척완충액으로 4회 세척하였다. 이후 분석 희석액에 1:1000비율로 희석한 HRP (Avidin-Horseradish Peroxidase)를 웰당 100 µl씩 분주하고 상온의 암 상태에서 방치한 다음 100 µl의 기질을 주입하여 상온에서 20분간 반응시켜 O.D. 430 nm에서 흡광도를 확인하여 정량하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

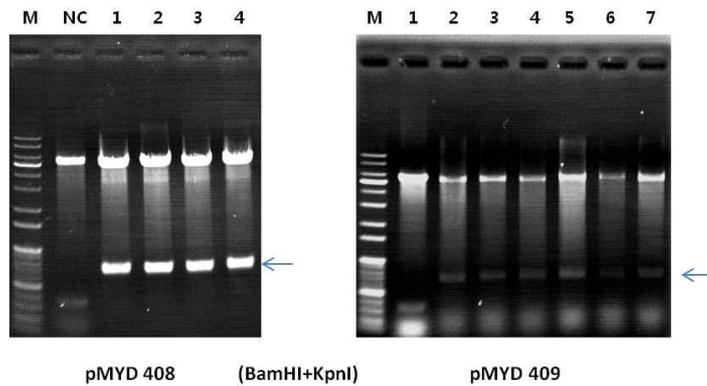
① Native hG-CSF와 synthetic hG-CSF의 transient expression vector에 클로닝

- TMV based vector인 pMYV150에 native mature hG-CSF와 rice amylase 3D signal peptide가 융합된 native hG-CSF를 삽입하여 pMYO88과 pMYO90으로 명명하였고 infiltration을 위해 agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환 하였다 (그림 325-2-1).



< 그림 325-2-1. Native hG-CSF의 TMV based vector (pMYV150)로의 클로닝 >

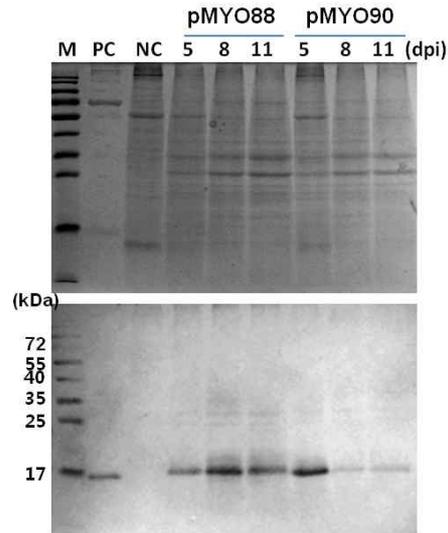
- 또한 주관기관인 NBM으로부터 받은 synthetic hG-CSF와 synthetic hG-CSF의 3'-말단에 정제를 용이하게 하기 위하여 6his tag이 융합된 유전자를 삽입하여 pMYD408과 pMYD409로 명명하였고 infiltration을 위해 agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환하였다 (그림 325-2-2).



< 그림 325-2-2. Synthetic hG-CSF의 TMV based vector로의 클로닝 >

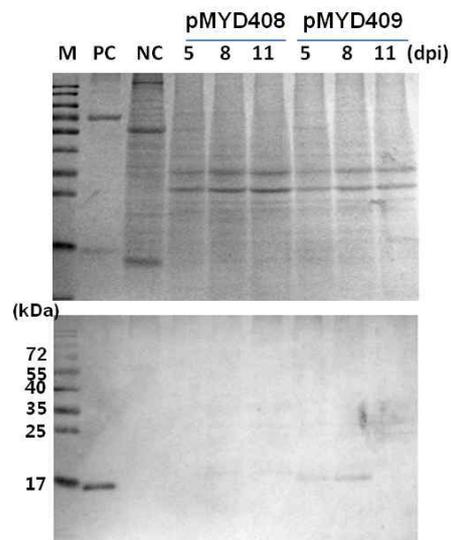
- ② hG-CSF의 고 발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축
 - Agroinfiltration 법을 이용한 hG-CSF와 synthetic hG-CSF의 발현을 알아보기 위하여 syringe를 이용하여 상기에서 기술한 바와 같은 방법을 이용하여 infiltration 하였으며 5, 8 그리고 11일 째 잎을 수확하여 단백질을 추출하여 SDS-PAGE, Western blot

analysis를 수행하였다. Native hG-CSF의 mature form 형태로 발현된 pMYO88의 경우 infiltration 후 8일 째 대략 19 kDa의 hG-CSF의 발현이 가장 높게 나타났으며 kg 생체 중량당 약 20mg의 hG-CSF가 생산됨을 확인하였으며, 3Dsp+hG-CSF의 pMYO90의 경우 5일째 샘플에서 hG-CSF의 발현이 높게 나타남을 확인하였다 (그림 325-2-3).



< 그림 325-2-3. Syringe를 이용한 infiltration에 의한 native shG-CSF의 발현 >

○ 반면 synthetic hG-CSF의 경우 3'말단에 6his tag이 융합된 pMYD409의 경우 infiltration 후 5일과 8일 샘플에서 hG-CSF로 추정되는 대략 19 kDa에서 약하게 확인되었다 (그림 325-2-4).



< 그림 325-2-4. Syringe를 이용한 infiltration에 의한 synthetic shG-CSF의 발현 >

3. 식물유래 hG-CSF 고순도 분리정제 및 특성 분석

○ 연구수행기관 : (주)엔비엠, 한국생명공학연구원

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) hG-CSF 고발현 세포주 대량배양 체계구축

① hG-CSF 고발현 세포주 대량배양 체계구축 (0.5 ton 이상)

(2) (2) 베타현탁세포 유래 hG-CSF의 산업화 규모 분리정제 공정 확립

① 식물유래 human G-CSF 단백질 추출, 분리, 정제 프로세스 확립(100 mg/batch, 0.5 ton 이상)

(3) 베타 현탁배양 유래 hG-CSF의 저장성 분석

① 저장조건(저장온도, pH, 저장기간)에 따른 저장성 분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

○ hG-CSF는 세계시장 연 40억\$(약 5조원)로 시장성이 매우 크고 2006년 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 가장 많은 품목임

○ 본 연구를 통하여 구축한 hG-CSF 고생산 세포주를 이용하여 산업화 수준의 대량배양 조건과 고순도 분리정제 조건을 확립하고, 이의 저장성을 확인하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) hG-CSF의 산업화가 가능한 규모 (100 mg/batch)의 단백질 분리정제 공정 확립

① hG-CSF 고발현 세포주 대량 배양 (0.5 ton 이상)

㉠ seed culture

○ 연구개발 수행내용

- hG-CSF 고발현 cell line O85#5 callus를 500 mL 삼각 플라스크에 N6 배지, 80mL을 넣고 접종한 후 현탁배양을 실시하였음

N6 media 제조 (1L 기준)	
N6 salt	4g
sucrose	30g
2,4-D (500ppm)	4ml
Kinetin	400ul
Hygromycin 50mg/ml	1ml
PH	5.8

○ 연구결과

- Northern blot과 western blot을 통해 hG-CSF 고발현 cell line으로 선발된 O85#5 callus를 고체배지에서 계대 유지함
- hG-CSF 고발현 cell line O85#5 callus를 대량 배양하기 위해 500 mL 삼각 플라스크에 N6 배지, 80mL을 넣고 접종함.



< 그림 325-3-1. hG-CSF 고발현 세포주 (O85#5) callus >

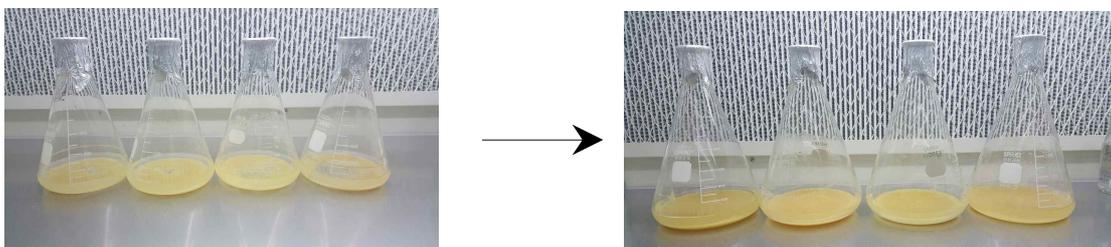
㉔ hG-CSF 고발현 세포주의 mass culture (삼각플라스크)

○ 연구개발 수행내용

- 500L 삼각 플라스크에 hG-CSF 고발현 세포주 접종 2주 후 callus의 mass량 확인 후 sieving 한 callus는 1L 삼각플라스크에 접종
- sieving 후 3~5일 동안 오염 여부 확인 후 플라스크 용량을 2L로 늘림

○ 연구결과

- hG-CSF 대량배양을 위해 1L 삼각플라스크에서 2L 삼각플라스크로 seed culture 량을 늘림.



1L 삼각플라스크

2L 삼각플라스크

< 그림 325-3-2. hG-CSF 고발현 세포주의 mass culture (삼각플라스크) >

㉕ hG-CSF 고발현 세포주의 mass culture (10L round reactor)

○ 연구개발 수행내용

- hG-GCS 고발현 세포주 O85#5의 2L 삼각 플라스크에서 배양 7일 후 10L round

reactor에 N6 배지 1.5L를 넣고 2L 삼각 플라스크에서 배양한 callus를 접종한 후 10일 배양 함.

- 배양 10일 후 배지를 1.5L에서 3L까지 증가 시켜 7일 배양한 후 총 2개의 10L round reactor로 각각 1.5L씩 옮긴 후 7일 배양.

○ 연구결과

- 2L 삼각 플라스크에서 10L round reactor로 cell mass를 늘리면서 오염이 되지 않고 잘 자람.
- N6 배지, 1.5L에서 3L가 되게 더 넣어주고 7일 배양하여 cell mass 확보 함.

㉔ hG-CSF 고발현 세포주의 large culture (80L reactor x 5기)

○ 연구개발 수행내용

- hG-GCS 고발현 세포주 O85#5의 2L 삼각 플라스크에 배양 7일 후 5기의 10L round reactor에 N6 배지 1.5L를 넣고 2L 삼각 플라스크에서 배양한 callus를 접종한 후 10일 배양 함.
- 배양 10일 후 배지를 1.5L에서 3L까지 증가 시켜 7일 배양한 후 5기의 80L reactor로 각각 3L씩 옮긴 후 N6 배지, 20L를 각각의 80L reactor에 넣고 7일간 배양함.
- 7일 간격으로 N6 배지를 점차 20L씩 더 넣어주고 60L가 되면 40L씩 교체해 주며 1개월간 cell mass를 확보함.

○ 연구결과

- 80L 리액터 5기에 각각 20L의 N6,3% sucrose를 넣고 3주간 배양한 현탁세포 3L를 접종하여 cell mass를 증가시킴. 배양 초기에는 리액터에 적응하는 시간이 있어서 천천히 성장을 하다 2일 후부터 정상적으로 잘 성장함.
- 리액터 1기에 약 5kg의 cell mass를 확보함.



10L reactor에 1.5L 접종



10L reactor에 3L 접종

< 그림 325-3-3. hG-CSF 고발현 세포주의 mass culture (10L reactor 배양) >

Seed Culture 1



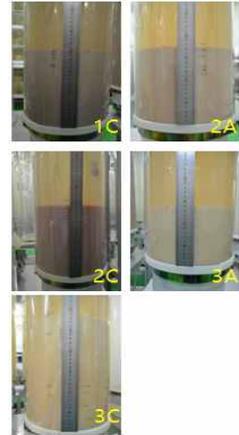
1L 플라스마크에 30g의 cell mass 와 N6, 3% sucrose 배지, 30ml을 넣고 7일간 suspension culture.

Seed culture 2 (Scale up)



10L 바이오 리액터에서 3주간 배양한 후 약 3L 를 80L 리액터에 각각 접종하고 N6, 3% scurose 배지 20L를 첨가하여 7일간 배양→7일 간격으로 N6, 3% sucrose 배지를 점차 20L 씩 늘려 가며 교체 해 주고 60L가 되면 40L 씩 교체해 주며 총 2개월 배양

After 2 months



Seed culture 2 하고 2개월 후 확보한 cell mass (약 5kg/reactor)

< 그림 325-3-4. hG-CSF 고발현 세포주의 large culture (80L reactor x 5기) >

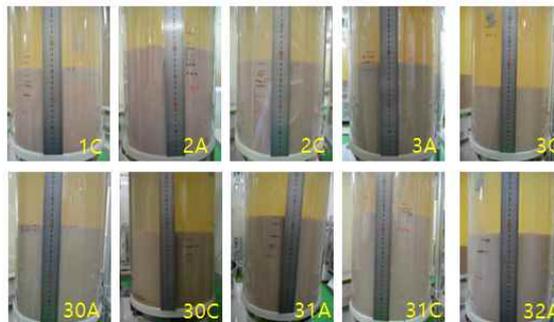
㉞ hG-CSF 고발현 세포주의 대량배양 (0.5 ton 이상): 최종적으로 약 0.5 ton 이상을 대량 배양하여 G-CSF를 생산하기 위해 10기의 리액터로 만들고자 새로운 리액터에 분주하여 배양.

○ 연구개발 수행내용

- 2개월간 배양한 5기의 리액터(cell mass 약 5kg/리액터)를 1회에 약 0.5t 이상 대량배양하기 위해 분주함.
- 각각의 리액터에서 30L 씩 현탁세포 배양액을 뽑아내서 5기의 새로운 리액터에 분주하고, 10기의 전체에 약 40L의 N6, 3% sucrose 배지를 넣고 7일간 배양하여 cell mass 약 50kg/리액터로 배양.

○ 연구 결과

- 2개월간 배양하여 cell mass, 약 50kg/reactor를 확보한 5기의 reactor에서 각각 20L씩 현탁세포 배양액을 뽑아 새로운 5기의 reactor에 cell mass를 옮기고 10기 전체에 40L의 N6, 3% sucrose 배지를 넣고 7일간 배양한 결과 cell mass 약 50kg/ reactor를 확보 함.



< 그림 325-3-5. Main culture 후 cell mass 약 50kg/reactor 확보 >

㉔ hG-CSF 고발현 세포주의 0.5 ton 이상 대량 배양 및 발현(50L x 10기=500L): 국내·외 최초로 벼 캘러스를 이용하여 0.5 ton 이상의 대용량 배양기에서 재조합 인간 G-CSF를 생산 함.

○ 연구개발 수행내용

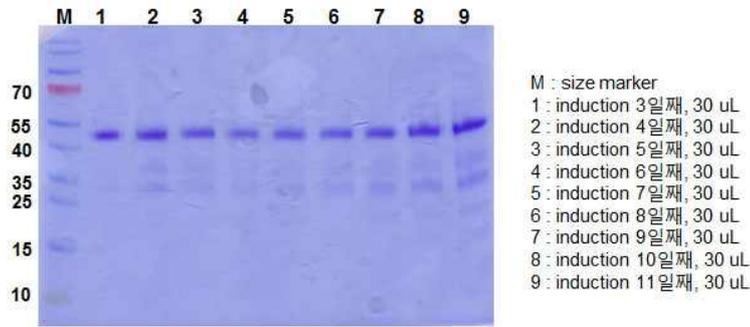
- 10기의 reactor(cell mass 약 50kg/reactor)를 정치시켜 cell mass를 가라앉힌 후 7일간 배양한 배양액을 조심스럽게 뽑아냄. 모두 동일한 길이의 tube가 reactor 내에 장착되어 있어서 40L의 배지를 뽑아내면 Induction을 위한 기준선까지 모든 cell mass와 배지가 압력차에 의해 배양기 밖으로 빠져 나옴.
- 10기의 reactor에 미리 준비 해둔 N6,sucrose(-) Induction 배지를 각각 40씩 넣고 11일간 배양 함.
- 11일간 Induction 한 후 10기의 reactor를 정지 시켜 cell mass를 가라앉히고 배양액 약50L 씩 4℃, 1ton harvest tank 로 harvest 함.
- 약 500L의 배양액을 모아 0.5 ton/회의 대량 정제를 수행 함.

○ 연구 결과

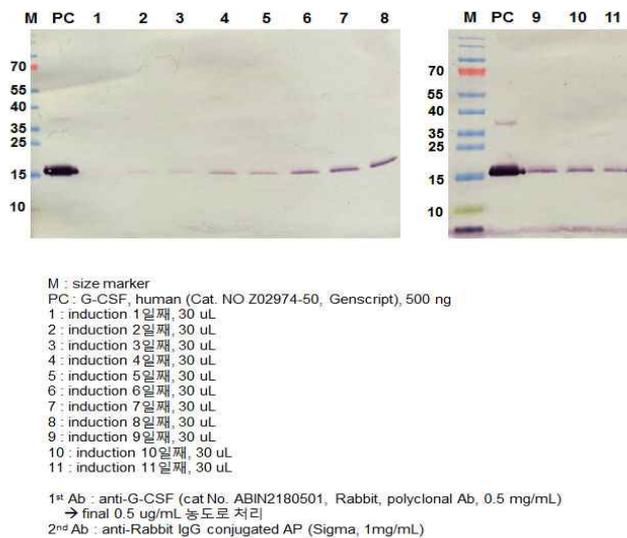
- hG-CSF 세포주를 11일 배양하면서 24시간마다 샘플을 취하여 SDS-PAGE와 western bot을 한 결과 induction 2일째부터 G-CSF가 발현 되기 시작하였고 8일 이후 발현량이 최대가 되었음.
- 약 500L의 배양액을 95% 이상 고순도 분리 정제를 수행함.



< 그림 325-3-6. hG-CSF 고발현 세포주의 대량 배양 (0.5 ton 이상) >



< 그림 325-3-7. SDS-PAGE를 이용한 배양시간에 따른 hG-CSF의 발현량 확인 >



< 그림 325-3-8. Western blot analysis를 이용한 배양시간에 따른 hG-CSF 발현량 확인 >

(2) 비현탁세포 유래 hG-CSF의 산업화 규모 분리정제 공정 확립

① 식물유래 human G-CSF 단백질 추출, 분리, 정제 프로세스 확립(100 mg/batch, 0.5 ton 이상)

② 재조합 human G-CSF 단백질을 정제하기 위한 sequence 분석

○ 연구개발 수행내용

- 정제하기 위한 타겟 단백질인 human G-CSF의 분자량과 pI값을 결정하기 위해 수행함.
- 정제하고자 하는 타겟 단백질인 human GM-CSF의 분자량과 pI값을 분석하기 위해 http://web.expasy.org/compute_pi/ 사이트에 human GM-CSF의 아미노산 서열을 입력하고 pI/MW를 분석하였음.

○ 연구결과

- 분리정제하기 위한 타겟 단백질인 human G-CSF의 분자량은 약 18.6kDa이고 pI값은 약 5.65임을 확인 함. 따라서 ion-exchange chromatography를 수행하여 고순도로 분리정제 할 수 있음.



Compute pI/Mw

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```

10      20      30      40      50      60
TPILGPASSLP QSFLLKCLEQ VRKIQGDGAA LQEKLCATYK LCHPEELVLL GHSLGIPWAP

70      80      90      100     110     120
LSSCPSQALQ LAGCLSQLHS GLFLYQGLLQ ALEGISPELG PTLDTLQLDV ADFATTIWQQ

130     140     150     160     170
MEELGMAPAL QPTQGAMPAF ASAFQRRAGG VLVASHLQSF LEVSYRVLRH LAQP

```

Theoretical pI/Mw: 5.65 / 18671.65

< 그림 325-3-9. human G-CSF의 pI값과 분자량 분석 결과 >

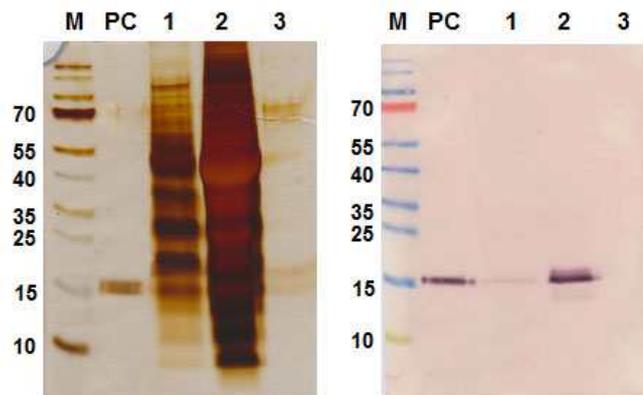
- ㉔ hG-CSF 대량 배양액 harvest (0.5 ton 이상): 10기의 80L reactor로부터 human G-CSF 배양액을 배양기내 압을 이용하여 harvest.
 - 연구개발 수행내용
 - hG-CSF 고발현 cell line O85#5 callus를 10기의 80L reactor에서 50L씩 배양한 후 11일간 induction한 후 배양액을 회수함.
 - 연구결과
 - 10기의 reactor를 harvest tank로 연결해서 배양액 회수함.

- ㉕ hG-CSF 대량 배양액의 필터 및 농축 (0.5 ton 이상/회): 2차년도에 기 확립한 여과 및 농축 시스템을 이용하여 회당 0.5 ton의 배양액을 처리
 - 연구개발 수행내용
 - 미국 WaterSep 사의 hollow fiber cartridge, Maximizer 24 (BA 945 10MAX24 SH, Lot# 14082001C, 0.45 um)를 사용하여 0.5 ton의 배양액을 필터 수행 함.
 - 약 500L의 배양액에 1.58kg의 Na₂HPO₄와 0.63 kg의 Citric acid를 넣고 잘 혼합 한 후 pH 4.0으로 보정
 - 0.45 um 필터와 동시에 미국 WaterSep사의 hollow fiber cartridge, Maximizer41(BA 030 10MAX41 SH, Lot # 140819001C, 30K dalton)를 사용하여 배양액을 10배 농축 함.
 - 배양액 농축 후 hG-CSF를 확인하기 위해 12% SDS-PAGE와 western blot을 수행함.
 - 연구결과
 - 10기의 reactor로부터 회수한 배양액 약 0.5 ton을 0.45 um 필터 하는데 약 1시간이 소요되었고, 배양액을 100배 농축하는데 약 1시간이 소요됨.

- target 단백질이 발현 시스템 상에서 amylase가 과발현 되는데 pH 4.0에서 alpha amylase가 일부 침전이 되어 배양액의 바닥에 하얗게 쌓이고 조심스럽게 윗부분 상층액을 pump를 사용하여 여과함.
- 최종 50L로 농축한 후 hG-CSF를 확인하기 위해 12% SDS-PAGE와 western blot을 수행한 결과 30kDa의 농축 액 약 50L에 존재하는 것을 확인 함. Flow through에는 타겟 단백질이 존재 하지 않음.



< 그림 325-3-10. 2차년도에 기확립한 Pilot-scale의 필터 및 농축시스템 >



M : size marker
 PC : G-CSF, human (Cat. NO Z02974-50, Genscript), 100 ng
 1 : Culture sup., 30 uL
 2 : 30kDa conc., 30 uL
 3 : 30kDa FT, 30 uL
 1st Ab : anti-G-CSF (cat No. ABIN2180501, Rabbit, polyclonal Ab, 0.5 mg/mL)
 → final 0.5 ug/mL 농도로 처리
 2nd Ab : anti-Rabbit IgG conjugated AP (Sigma, 1mg/mL)

< 그림 325-3-11. 0.5 ton의 hG-CSF 배양액 필터 및 농축 후 silver staining과 western blot으로 확인 >

라) Ion-exchange chromatography 수행 (0.5 ton 이상/회)

○ 연구개발 수행내용

- human G-CSF를 분리정제하기 위해 cation-exchange chromatography를 위한 resin인 CM sepharose를 사용하여 1차로 타겟 단백질 fraction을 회수 함. 약 500L의 배양액을 정제하기 위해 pilot scale의 CM sepharose 10L가 packing 되어 있는 BPX 300 column을 사용함. pilot scale의 대용량 컬럼을 사용하기 위해서는 pilot scale의 pump system과 monitoring system이 필요한데 자체 제작한 Gear pump system과 AKTA prime plus를 연결하여 monitoring 하여 정제함. 이하 상세한 수행내용을 기술하였음

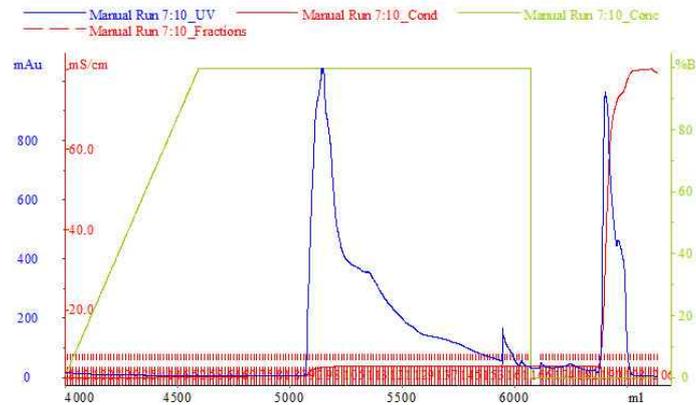
- human G-CSF 배양액을 pH 4.0으로 보정하고 농축한 시료 약 50L 준비
- Buffer 제조

buffer A	Citric acid, 315.2g과 Na ₂ HPO ₄ , 90.6g, 10mM NaCl, pH 4.0, 100L
buffer B	Citric acid, 10.5g과 Na ₂ HPO ₄ , 552.2g, 10mM NaCl, pH 8.0, 100L
buffer C	Citric acid, 10.5 g과 Na ₂ HPO ₄ , 552.2 g, 1M NaCl, pH 8.0, 100L

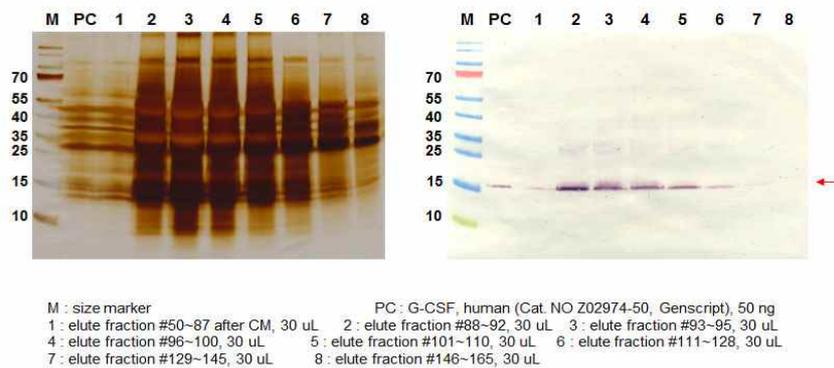
- 10L의 CM sepharose가 packing 되어 있는 BPX 300 column을 pump system에 장착하고 AKTA prime plus에 장착한 후 Buffer A로 equilibration.
- 배양액 약 50L을 column에 loading: Gear pump의 flow rate는 100 rpm (400 mL/min)으로 하고 UV monitoring을 위한 AKTA prime plus의 flow rate는 3 mL/min으로 세팅해서 약 50L의 농축샘플을 loading 함.
- 약 100L의 buffer A를 사용하여 wash.
- Buffer A와 B를 사용하여 gradient로 elution 수행.
- Buffer C로 elution 수행.
- AKTA prime plus를 사용하여 각각의 fraction을 13 mL씩 모았고 매뉴얼 방법으로 각각의 peak를 모음.
- 각각의 fraction을 SDS-PAGE 수행 후 타겟 단백질의 purity와 band 확인

○ 연구결과

- pilot scale의 ion-exchange chromatography 수행 후 약 2L의 elute fraction 을 회수 함.
 - 각각의 fraction을 SDS-PAGE 후 silver staining과 western blot을 수행하여 human G-CSF를 확인 함.
 - human G-CSF의 positive control은 Genescript사의 G-CSF, human (Cat. No. Z02974-50, source :*E.coli*)를 사용하였고, primary antibody는 ACRO Biosystems사의 Rabbit anti-human G-CSF polyclonal antibody (Cat. No.GCF-PR74, 250 ug)을 사용하여 정제한 타겟 단백질을 분석함.



< 그림 325-3-12. Pilot scale의 Ion-exchange chromatography 수행 후 chromatogram >



< 그림 325-3-13. Pilot scale Ion-exchange chromatography 수행 후 fraction collector 시료의 SDS-PAGE 후 silver staining과 western blot >

㉞ Gel filtration 수행 (0.5 ton 이상/회)

○ 연구개발 수행내용

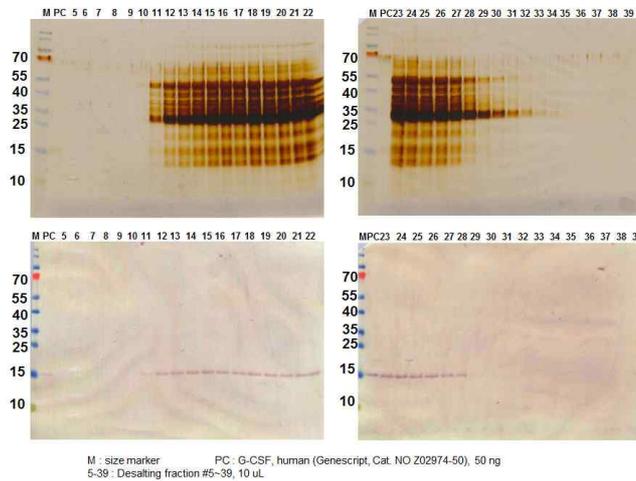
- human G-CSF를 분리정제하기 위해 cation-exchange chromatography 이후 elute fraction을 모아 약 2L를 desalting 수행. Anion-exchange chromatography를 수행하기 위해 pilot scale의 sephadex G-25, 10L가 packing 되어 있는 BPX 300 column을 사용하여 desalting 수행 함. pilot scale의 대용량 컬럼을 사용하기 위해서는 pilot scale의 pump system과 monitoring system이 필요한데 자체 제작한 Gear pump system과 AKTA prime plus를 연결하여 monitoring 하여 정제함. 이하 상세한 수행내용을 기술 하였음

- human G-CSF elute fraction, 약 2L를 준비
- Desalting에 사용하는 buffer는 RO수를 사용 함.
- BPX 300/500 column (뵘스바이오)에 sephadex G25 약 10L가 packing 되어 있는 column을 RO수로 equilibration.

- human G-CSF elute fraction, 약 1L을 column에 loading하고 Gear pump의 flow rate는 100 rpm (400 mL/min)으로 하고 UV monitoring을 위한 AKTA prime plus의 flow rate는 10 mL/min으로 수행 함. (2번 반복)
- 각각의 fraction을 SDS-PAGE수행 후 silver staining과 western blot을 통해 human G-CSF fraction을 확인 함.

○ 연구결과

- 12% acrylamide gel run하여 silver staining으로 확인한 결과 fraction #10~31에서 human G-CSF band를 확인함.
- #10~31을 모아 anion-exchange chromatography 수행.



< 그림 325-3-14. Pilot scale의 Gel filtration 수행 후 silver staining과 western blot 수행 >

㉞ Anion-exchange chromatography 수행

○ 연구개발 수행내용

- Gel filtration 수행 후 elute fraction #10~31, 약 4L에 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 8.0으로 보정하여 DEAE sepharose 수행 함. 이하 상세한 수행내용을 기술하였음
- Gel filtration 수행 후 fraction #10~31, 약 4L을 모두 모아 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 8.0으로 맞춤
- anion-exchange chromatography를 수행하기 위한 buffer 제조

buffer A	20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 8.0, 50L
buffer B	20 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 8.0, 50L

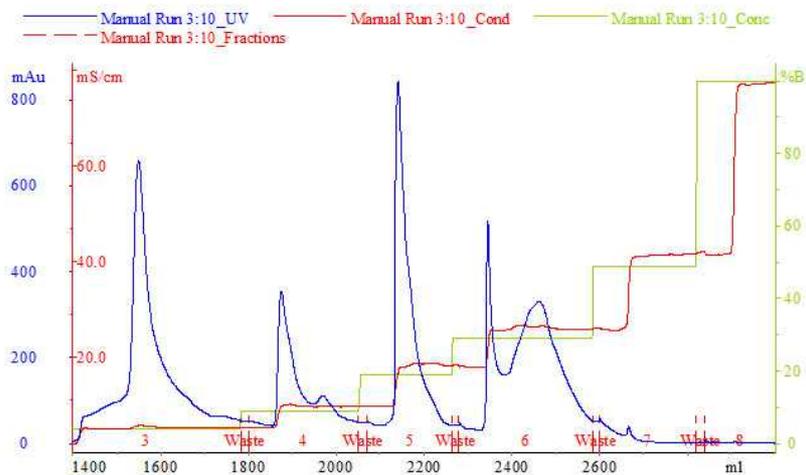
- DEAE가 packing 되어 있는 BPG 100/500 column을 gear pump에 장착하고 UV를 확인하기 위해 AKTA prime plus에 장착함. Gear pump의 flow rate는 50 rpm (40

mL/min)으로 하고 UV monitoring을 위한 AKTA prime plus의 flow rate는 5 mL/min으로 수행 함.

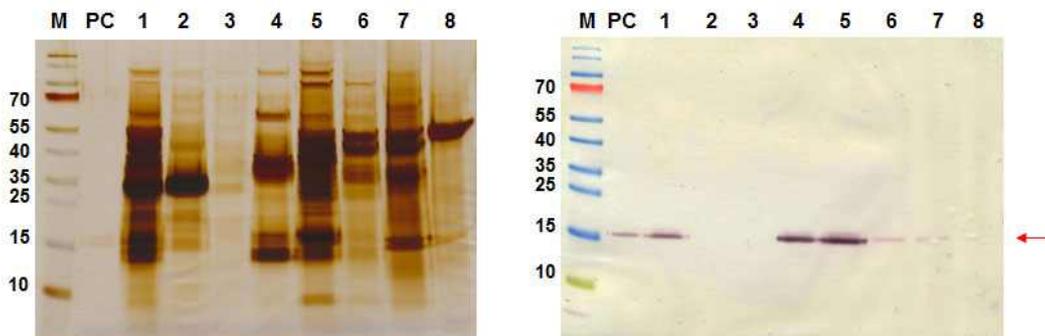
- pH 보정한 sample을 column에 loading 하고 Buffer A, 10L로 wash.
- Buffer A와 B의 step gradient를 사용하여 elution을 수행하고 각각의 fraction을 모은 후 gel run으로 target protein의 band 확인 함.

○ 연구결과

- anion-exchange chromatography를 수행한 결과 target 단백질 hG-CSF 대부분이 column의 resin에 결합하고 salt strength에 의해서 elution 됨
- human G-CSF의 elution은 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM과 1M NaCl로 step gradient로 elution 한 결과 100 mM 이내에서 human G-CSF 대부분이 확인 됨.
- 12% acrylamide gel run하여 silver staining으로 human G-CSF band를 확인함.



< 그림 325-3-15. Anion-exchange chromatography 수행 >



M : size marker
 PC : G-CSF, human (Cat. NO Z02974-50, Genscript), 50 ng
 1 : DEAE loading 전 sample : 30 uL 2 : Flow through after DEAE, 30 uL 3 : Wash after DEAE, 30 uL
 4 : elute I(50 mM NaCl) after DEAE, 30 uL 5 : elute II (100 mM NaCl) after DEAE, 30 uL
 6 : elute III (200 mM NaCl) after DEAE, 30 uL 7 : elute IV (300 mM NaCl) after DEAE, 30 uL
 8 : elute V (500 mM NaCl) after DEAE, 30 uL

< 그림 325-3-16. Anion-exchange chromatography 수행 후 Silver staining과 western blot 수행 >

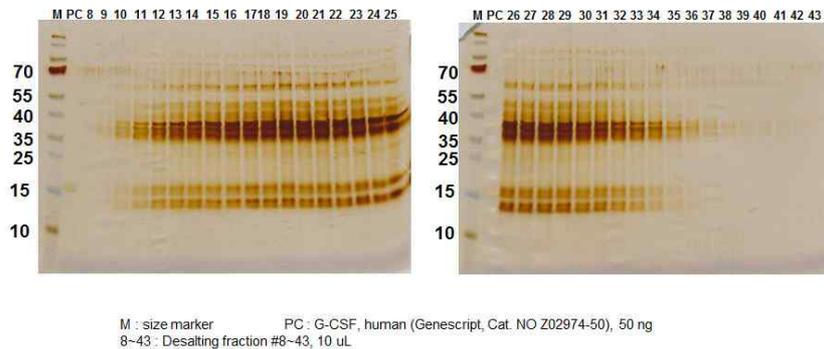
㉔ Gel filtration

○ 연구개발 수행내용

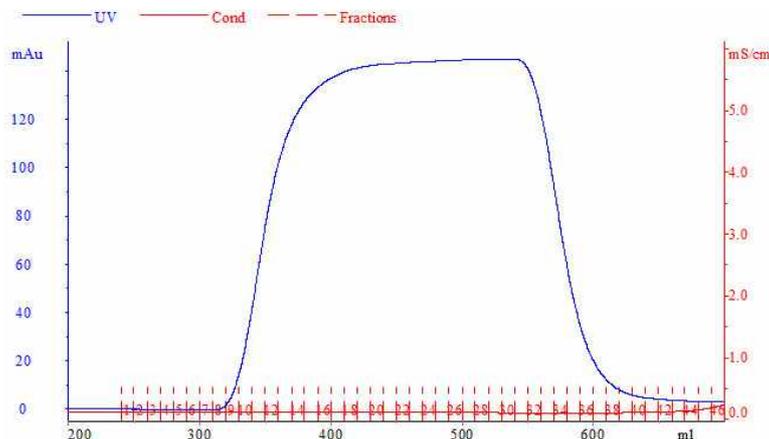
- DEAE sepharose 수행 후 fraction #1과 2를 모두 모아 약 500 mL을 desalting 수행하였으며, 아래에 상세내용을 기술하였음
- DEAE sepharose 이후 fraction #1,2를 모음.
- BPX 50/500 column (빔스바이오)에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column을 RO수로 equilibration.
- sample, 약 250 mL을 column에 loading하고 flow rate는 10 mL/min, fraction size는 12 mL 로 수행함 (2번 반복).

○ 연구결과

- 12% acrylamide gel run하여 silver staining으로 확인한 결과 fraction #10~36에서 human G-CSF band를 확인함.
- #10~36을 모아 동결건조 수행.



< 그림 325-3-17. human G-CSF의 Gel filtration 수행 후 silver staining >



< 그림 325-3-18. human G-CSF의 Gel filtration 수행 후 chromatogram >

㉠ Size-exclusion chromatography

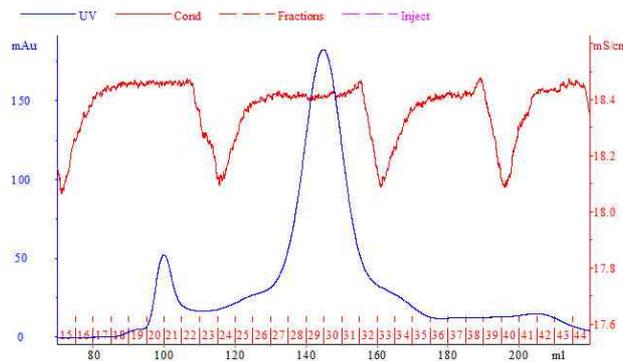
○ 연구개발 수행내용

- 95% 이상 고순도의 human G-CSF를 정제하기 위해 size-exclusion chromatography를 수행하였으며, 아래에 상세내용을 기술하였음

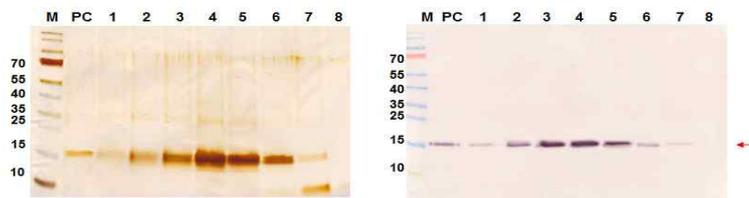
- 동결건조한 시료에 약 50 mL의 RO수를 넣고 녹인 후 0.45 um syringe filter를 사용하여 filtration
- Hiprep 26/60 sephacryl S-100 HR (GE healthcare)를 AKTA prime plus에 장착하고 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.3으로 equilibration
- Flow rate는 1.3 mL/min, fraction size 5 mL로 size-exclusion chromatography 수행

○ 연구결과

- SEC 수행한 결과 95%이상 고순도의 hG-CSF 정제 확인
- 12% acrylamide gel run하여 silver staining으로 확인한 결과 fraction #23~34에서 human G-CSF band를 확인함.
- Size-exclusion chromatography를 수행 후 #23~34를 모아 final gel filtration 수행하고 제품 포장



< 그림 325-3-19. 95% 이상 고순도의 human G-CSF를 정제하기 위한 size-exclusion chromatography 수행 >



M : size marker
 PC : G-CSF, human (Cat. NO Z02974-50, Genscript), 50 ng
 1 : size exclusion chromatography 幸 fraction #23-24, 10 uL
 2 : size exclusion chromatography 幸 fraction #25-26, 10 uL
 3 : size exclusion chromatography 幸 fraction #27-28, 10 uL
 4 : size exclusion chromatography 幸 fraction #29-30, 10 uL
 5 : size exclusion chromatography 幸 fraction #31-32, 10 uL
 6 : size exclusion chromatography 幸 fraction #33-34, 10 uL
 7 : size exclusion chromatography 幸 fraction #35-36, 10 uL
 8 : size exclusion chromatography 幸 fraction #37-38, 10 uL

< 그림 325-3-20. Size exclusion chromatography 수행 후 Silver staining과 western blot 수행 >

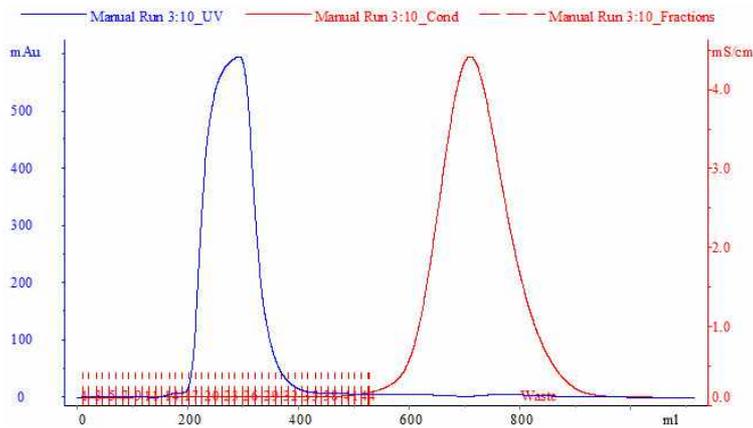
㉔ Gel filtration

○ 연구개발 수행내용

- SEC 수행 후 fraction #23~34를 모두 모아 약 480 mL을 농축 후 desalting 수행하였으며, 아래에 상세내용을 기술하였음
- SEC 이후 fraction #23-34를 모두 모아 약 480 mL 회수한 후 농축
- BPX 50/500 column (빔스바이오)에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column 을 RO수로 equilibration.
- sample, 약 150 mL을 column에 loading하고 flow rate는 10 mL/min, fraction size는 12 mL 로 수행함.

○ 연구결과

- 12% acrylamide gel run하여 silver staining으로 확인한 결과 fraction #16~30에서 human G-CSF band를 확인함.
- #16~30을 모아 동결건조 수행 한 후 정량하고 제품 포장함.



< 그림 325-3-21. Size exclusion chromatography 수행 후 gel filtration >

㉕ 재조합 human G-CSF의 정제 단계별 단백질 정량

○ 연구개발 수행내용

- 재조합 human G-CSF의 분리정제 단계별 단백질의 양을 계산하기 위해 BCA 정량을 수행 하였음. 정제 단계의 모든 step을 정량하여 전체 단백질에서 human G-CSF가 얼마나 존재하고 또한 최종 정제후 95% 이상 human G-CSF를 얼마나 생산할 수 있는지 확인 함.
- 각각의 시료를 96 well plate에 각각 5, 10 uL씩 넣고 농도가 진한 경우에는 2배, 5배, 10배 희석하여 5, 10 uL를 첨가하였음. standard BSA, 1mg/mL 0, 4, 8, 12, 16, 20 uL를 사용하여 standard curve를 구하였음. 각각의 시료가 들어있는 well에 D.W를 15 또는 10 uL를 넣고 발색시약 Bicinchonic acid와 4% CuSO4 mixture를 180 uL를 넣고 30분 동안 37°C에서 반응시킨 후 562nm에서 흡광도를 측정하였음. 흡광도 측정 후 Graphpad prism 4.0 프로그램을 사용하여 단백질의 농도를

분석하였음.

○ 연구결과

- 정제단계별 단백질량을 정량한 결과 총단백질 약 700g이 존재하는 culture sup. 500L로부터 농축 및 단백질 커팅을 해서 690g을 회수 하였고, cation-exchange chromatography를 수행하여 약 30g의 단백질을 회수함. 이후 anion-exchange chromatography를 수행하여 약 3g의 단백질을 회수하고 최종적으로 size-exclusion chromatography를 수행해서 순도 95% 이상의 human G-CSF를 약 870 mg 생산 함.

< 표 325-3-1. 정제 단계별 분리 정제된 단백질 량 >

Purification step	Protein	Total protein	Total volume
	mg/mL	g	mL
Cultuer sup.	1.4 ±0.12	700 ±12.1	500,000
Concentration step	13.8±0.8	690±11	50,000
Cation-exchange chromatography	7.5±0.32	30.0±1.1	4,000
Anion-exchange chromatography	6.3± 0.6	3.15±0.13	500
Desalting after size-exclusion chromatography	1.95±0.15	0.87±0.24	450



< 그림 325-3-22. 재조합 human G-CSF, 100 mg 포장 (8개, 800 mg) >

(3) 벼 현탁배양 유래 G-CSF의 저장성 분석

(가) 연구개발 내용

① 생화학적 분석을 위한 단백질 preparation

- Suspension culture: western blot analysis를 이용하여 선별된 G-CSF 고발현 pMYO309 벼 캘러스로부터 생화학적 분석을 위한 단백질을 추출하였다. 무균상태에서 30g/L sucrose, 2mg/L, 2,4-D, 0.2mg/L kinetin, 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지 (N6SE)를 이용하여 Suspension culture를 28°C에서 150rpm으로 암배양을 수행하였다.
- Secretion 유도: 잘게 배양된 pMYO309 callus를 진공펌프를 이용하여 기존 배양액을 제거하고 sucrose가 제거되고 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지 (N6-S)에 10ml/g 비율로 접종하여 7일간 배양 하였다. 당 결핍 상태에서 G-CSF 단백질의 분비를 유도하였고 배양액을 취하여 12,000 rpm, 4°C, 30분간 원심분리를 하여 상등액을 취한 뒤 생화학적 분석을 진행 하였다. 벼 유래 재조합 분비 단백질 G-CSF 의 열처리에 따른 안정성을 조사하기 위해 현재 판매되고 있는 Sigma 사의 대장균으로부터 발현된 재조합 G-CSF와 비교하였다.

(나) 조장조건에 따른 저장성 분석

- 온도별 저장조건: 앞서 secretion 유도를 통해 분비된 단백질이 포함된 배양액을 이용하여 4°C, 23°C, 40°C, 60°C 각각에서 48h 동안 반응 시켰다. 각 반응은 3반복으로 실시하였다(그림 325-3-23).

온도	4°C		23°C		40°C		60°C		단위
	P.C	pMYO309	P.C	pMYO309	P.C	pMYO309	P.C	pMYO309	
P.C	2	-	2	-	2	-	2	-	ul
pMYO309	-	18	-	18	-	18	-	18	ul
10X phosphate buffer	4	4	4	4	4	4	4	4	ul
D.W	34	18	34	18	34	18	34	18	ul
Total vol.	40	40	40	40	40	40	40	40	ul

- 10x phosphate buffer: phosphate buffer saline (Sigma P5368) + 10mM DTT
- P.C: positive control, G-CSF from E.coli (Sigma G0407)
- Incubation time: 48h
- Triplicate

< 그림 325-3-23. G-CSF의 Thermal dependence 분석을 위한 reaction mixture >

- pH별 저장조건: secretion 유도를 통해 분비된 단백질이 포함된 배양액을 그림 325-3-24와 같이 pH reaction mixture를 만든 후 37°C에서 48h 동안 반응 시켰다. 각 반응은 3반복으로 실시하였다.

온도	pH 6.0		pH 7.0		pH 8.0		pH 9.0		단위
	P.C	pMYO309	P.C	pMYO309	P.C	pMYO309	P.C	pMYO309	
P.C	2	-	2	-	2	-	2	-	ul
pMYO309	-	18	-	18	-	18	-	18	ul
10X phosphate buffer	4	4	4	4	4	4	4	4	ul
D.W	34	18	34	18	34	18	34	18	ul
Total vol.	40	40	40	40	40	40	40	40	ul

- 10x phosphate buffer
phosphate buffer saline pH 6.0 (Sigma P5368) + 10mM DTT
phosphate buffer saline pH 7.0 (Sigma P5368) + 10mM DTT
phosphate buffer saline pH 8.0 (Sigma P5368) + 10mM DTT
phosphate buffer saline pH 9.0 (Sigma P5368) + 10mM DTT
- P.C: positive control, G-CSF from E.coli (Sigma G0407)
- Incubation: 37°C 48h
- Triplicate

< 그림 325-3-24. G-CSF의 pH dependence 분석을 위한 reaction mixture >

○ 사용 버퍼별 저장조건: 재조합 G-CSF의 분주 및 보관: 형질전환 벡터로부터 secretion된 재조합 G-CSF가 포함된 배지를 18ul씩 aliquot하여 Tris-HCl buffer와 phosphate buffered saline에 각각 Room-temperature, 4°C, -20°C, -75°C에 보관하였고, freeze-thaw recycle(F/T 라 표기)에 따른 안정성을 측정하기 위하여 1회 녹인 후 온도별(4°C, -20°C, -70°C)로 보관하였다. 비교군으로 대장균 유래 재조합 G-CSF 단백질도 위와 같은 조건으로 동일하게 보관 하였다. 각각의 보관된 G-CSF 단백질은 7일부터 6개월까지 보관하면서 단백질 안정성을 측정 하였다 (그림 325-3-25).

Storage temperature	보관온도												Freeze-thaw recycle															
	RT 23°C				4°C				-20°C				-75°C				4°C				-20°C				-75°C			
	Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos	
PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	PC	309	
P.C	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-
pMYO309	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18	-	18
10x Tris buffer	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-
10x Phosphate buffer	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2
D.W	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-	16	-
Final vol.	20 ul																											

- 10x Tris buffer : 250mM Tris-HCl(pH7.5) + 10mM DTT
- 10x Phosphate buffer : 100mM Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 + 10mM DTT
- P.C: positive control, G-CSF from E.coli (Sigma G0407)
- pMYO309 : 벡터 유래 G-CSF 분비 단백질
- 보관 기간 : 0day, 7day, 1month, 3month, 5month, 6month
- Triplicate

< 그림 325-3-25. G-CSF의 보관버퍼, 온도, 기간에 따른 안정성 분석을 위한 reaction mixture >

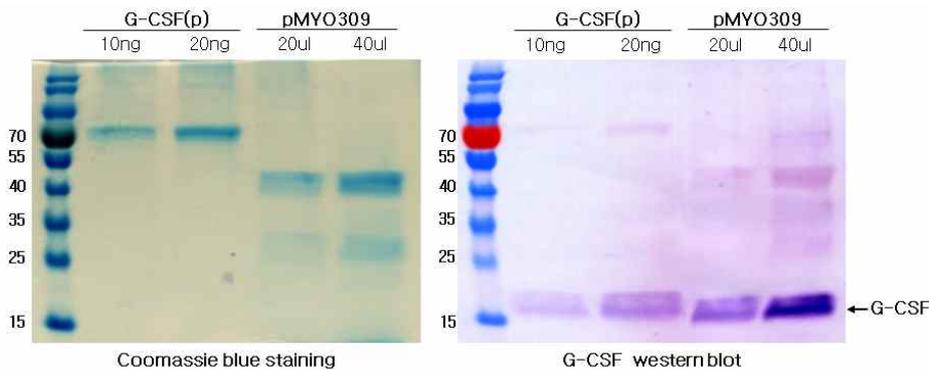
(다) western blot analysis

- 단백질 정량: Positive control인 대장균에서 발현된 재조합 G-CSF 단백질과 벼 유래 재조합 분비 단백질 G-CSF와의 동일한 양을 맞추기 위해 G-CSF western blot을 수행하였다. 10ng, 20ng의 대장균 유래 재조합 G-CSF 단백질을 분석에 사용하였고, 20ul, 40ul의 벼 유래 G-CSF 단백질이 분비된 배지를 분석에 각각 사용하였다.
- 열처리, pH에 따른 안정도 조사: reaction sample 40ul와 4x reduce sample buffer 10ul를 혼합하여 5분간 97°C에서 denaturation 시킨 후 50ul를 12% SDS-PAGE Gel에 loading 하여 전기영동을 수행 하였고, western blot analysis를 수행하여 단백질 안정성을 분석 하였다.
- 보관 조건에 따른 안정도 조사: reaction sample 20ul 과 4X reduce sample buffer 5ul를 혼합하여 5분간 97°C에서 denaturation 시킨 후 25ul 를 12% SDS-PAGE Gel에 loading 하여 전기영동을 수행하였고, western blot analysis를 수행하여 단백질 안정성을 분석하였다.

(나) 연구개발 결과

① hG-CSF의 정량

- 대장균 유래의 G-CSF와 형질전환 벼 유래의 G-CSF의 열처리, pH처리, 그리고 보관조건에 따른 안정성을 보다 정확하게 비교하기 위해 양 측정 실험을 실시하였다. 그 결과 대장균 유래의 G-CSF가 20ng일 때, 형질전환 벼 유래 G-CSF가 포함된 배지 20ul와 비슷한 발현율을 보였으므로 이후 모든 실험에는 대장균 유래 G-CSF 20ng와 형질전환 벼 유래 G-CSF 20ul를 이용하였다 (그림 325-3-26).

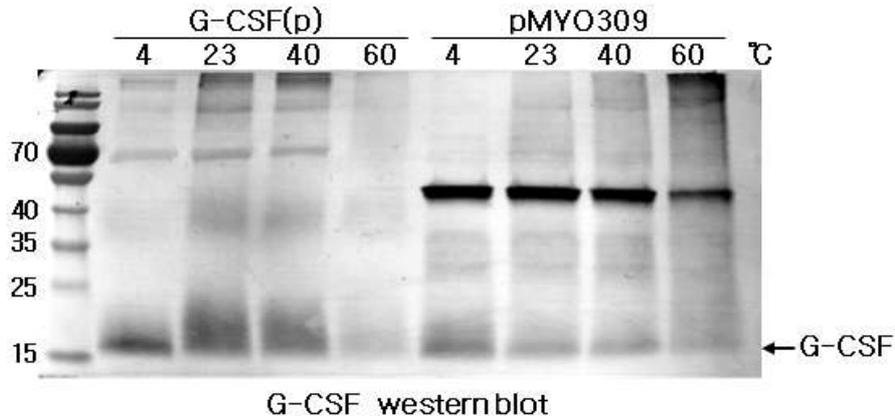


< 그림 325-3-26. 대장균 유래 재조합 G-CSF와 벼 유래 재조합 G-CSF의 western blot analysis >

② 열처리에 따른 G-CSF (pMYD319 분비 단백질)의 안정성 조사

- phosphate buffer saline (PBS)에 보관된 대장균 유래 G-CSF와 벼 유래 G-CSF은 각각 23°C 이상의 온도에서 안정성이 떨어지는 것을 확인 하였으며 특히 60°C 에서는 거의

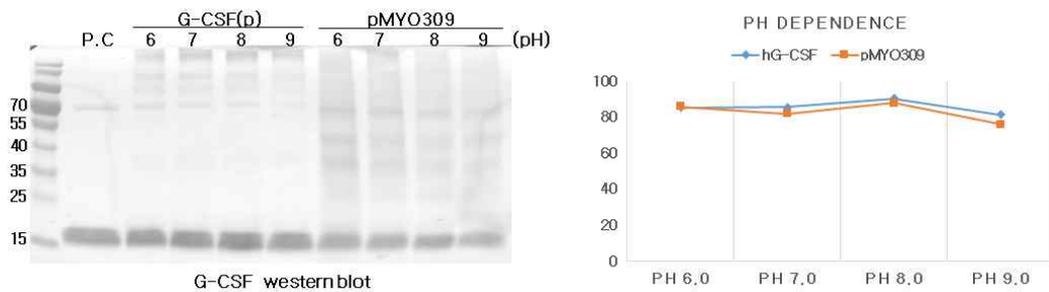
해당 band가 보이지 않았다 (그림 325-3-27).



< 그림 325-3-27. Western blot analysis of G-CSF under Thermal dependence >

(다) pH에 따른 G-CSF 단백질의 안정성 조사

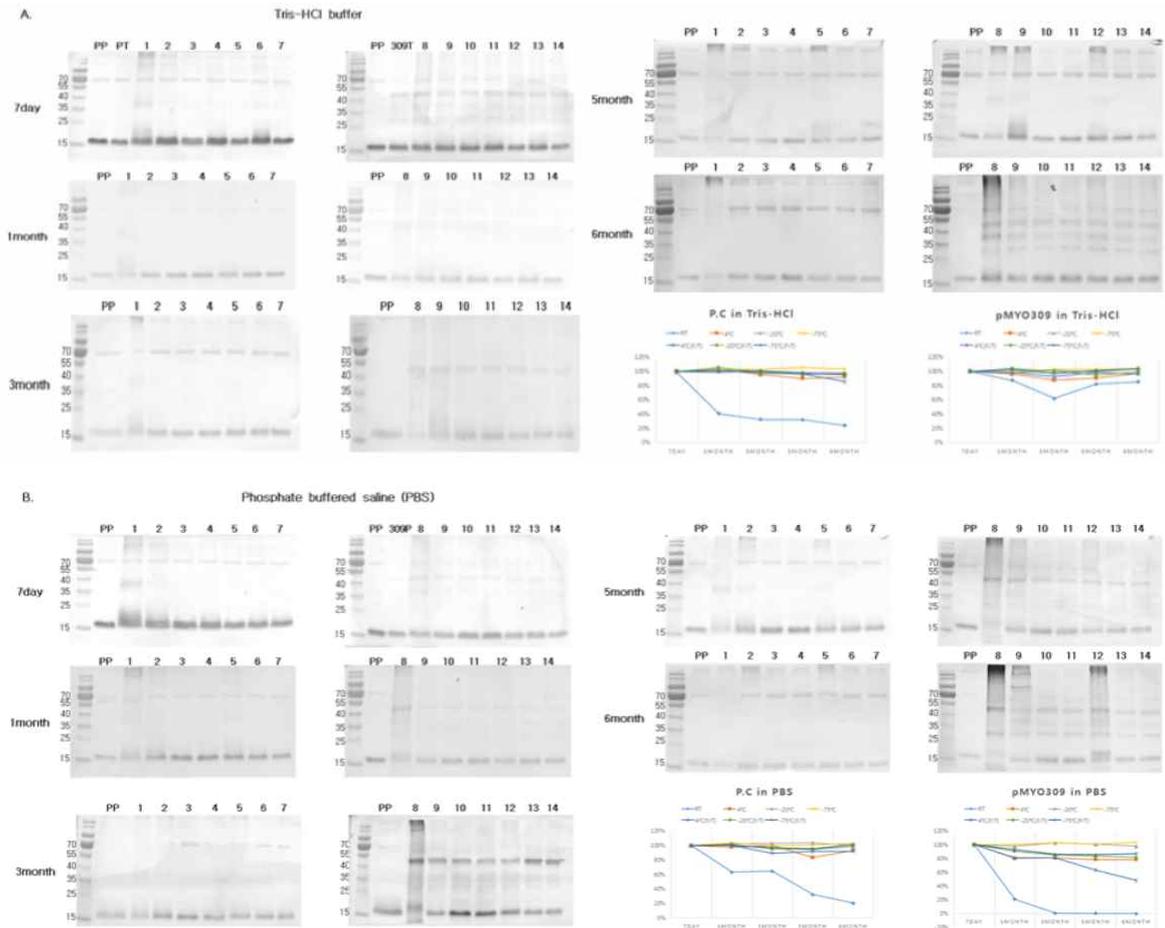
- 대장균 유래 G-CSF의 경우, pH 6.0 ~ pH 9.0 사이에서 단백질 안정성의 차이는 거의 없었고 벼 유래 G-CSF 단백질은 pH 9.0에서 약간 degradation이 되었지만 다른 pH에서는 거의 차이가 없었다 (그림 325-3-28).



< 그림 325-3-28. Western blot analysis of G-CSF under pH dependence >

③ 보관 버퍼, 보관 온도 및 기간에 따른 G-CSF 단백질의 안정성 조사

- 대장균 유래 재조합 G-CSF (P.C, sigma G0407)과 비교하여 벼 유래 G-CSF (pMYO309)의 저장 버퍼, 저장온도 및 보관기간에 따른 단백질 안정성을 조사한 결과 Tris-HCl에 7일 동안 보관한 시료에서 pMYO309는 단백질 안정성에 변화가 없는 반면 P.C는 RT(23°C)에서 서서히 변성이 되기 시작했다. 1개월 후에는 RT에서 모든 시료가 변성이 되었는데 pMYO309의 경우 약 80% 정도의 안정성을 보였지만 P.C는 약 40% 정도의 안정성을 나타냈다. RT를 제외한 나머지 보관온도에서는 P.C와 pMYO309의 단백질 안정성은 크게 변화는 없었다 (그림 325-3-29A).



< 그림 325-3-29. G-CSF의 보관 버퍼, 저장온도 및 기간에 따른 단백질 안정성 조사. PP: P.C in phosphate buffered saline, PT: P.C in Tris-HCl, P.C [1: RT, 2: 4°C, 3: -20°C, 4:-75°C, 5: 4°C(F/T), 6: -20°C(F/T), 7: -75°C(F/T)], 309P: pMYO309 in phosphate buffered saline, 309T: pMYO309 in Tris-HCl,pMYO309 [8: RT, 9: 4°C, 10: -20°C, 11:-75°C, 12: 4°C(F/T), 13: -20°C(F/T), 14: -75°C(F/T)] >

② 반면 PBS에 보관된 시료는 좀 더 다이내믹한 결과를 나타냈다. P.C의 경우 RT에서 보관된 시료는 7일째부터 변성이 시작되었고 한 달 뒤에는 60% 정도의 안정성을 나타냈으며 6개월 후에는 약 20%의 안정성을 나타냈다. 그리고 4°C와 4°C(F/T)에 보관된 시료는 6개월 후에 약간의 안정성이 떨어지는 것을 확인하였다. pMYO309의 경우, RT에서 보관된 시료는 1달 후에 20% 수준까지 안정성이 떨어졌고 3달 후부터는 G-CSF 단백질이 모두 변성이 되었다. 그리고 4°C(F/T)의 경우에도 6개월 후에 40% 수준의 안정성을 보였고 -20°C와 -75°C를 제외한 나머지 보관온도에서도 약 80% 수준의 안정성을 보였다. 이 결과 4°C 이하에서 Tris-HCl buffer에 보관하는 방법이 안정적으로 보관하는 방법이라고 판단된다.

3-2-6. 식물유래 TEV endopeptidase 생산기술 확립

1. 고발현 핵 형질전환 시스템을 이용한 TEV endopeptidase 생산기술 개발

○ 연구수행기관 : 한국생명공학연구원(전주생물소재연구소), (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) TEV endopeptidase 고발현 식물체 개발

- ① 식물발현벡터 제작
- ② 형질전환 및 고발현 세포주의 선발
- ③ 분자생물학적 분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 재조합 단백질 생산시 tagging protein을 제거하는 필수적인 효소
- 단백질의 특성상 대장균에서 생산 할 때에 inclusion body를 형성하여 생산수율이 낮으며, 대부분 CHO cell에서 생산하는 관계로 매우 고가임
- 의료용 단백질 생산시 2차 감염 관계로 동물세포유래 효소를 기피하는 실정이므로 생산시 사업화 가능성이 매우 높음
- 상기와 같이 TEV endopeptidase의 다량생산이 가능할 경우 산업화 가능성이 매우 높다고 판단되어 TEV endopeptidase의 생산기술을 확립하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용

(1) TEV endopeptidase 고발현 식물체 선발

(가) Recombinant TEV endopeptidase 유전자의 식물발현벡터로 삽입

- ① Recombinant TEV(Havana) 단백질을 코드하는 유전자는 담배(Havana) 식물체에서 높은 발현을 위해 코돈 최적화 방법을 통해 합성 하였다. 합성된 TEV 유전자를 식물발현벡터로 삽입하기 위하여 TEV 유전자가 삽입된 벡터와 담배식물발현벡터에 각각 제한효소 BamHI 과 EcoRI처리를 하여 확인하였다.
- ② TEV 유전자 발현벡터는 토양균인 *Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환을 위해 Triparental mating을 통하여 agrobacteria에 형질전환 하였고, plasmid DNA PCR과 제한효소 AccI을 처리에 의하여 선발 하였다.

(나) TEV endopeptidase의 고생산 세포주의 확립

① 토양균 (*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여 식물 형질전환 유도:

㉞ TEV 유전자 발현벡터 (pJKF48, pJKF49)를 가진 agrobacteria(토양균)을 2~3일간 암배양 후 harvest하여 1ml의 MSO liquid media를 넣고 vortexing, centrifuge하여 상층액을 버리는 과정을 3번 반복하여 cell을 washing해준 후 다시 MSO liquid 1ml을 넣어 resuspension 하였다. 그리고 기내 배양한 담배(Havana) 잎을 따서 mess를 이용하여 적당한 크기(0.5mm x 0.5mm)로 잘라 준비 하였다. MSO liquid 약 20ml을 petridish에 붓고, 잎의 기공면이 윗면을 향하도록 하고 MSO liquid 1ml에 resuspension한 Agrobacterim을 붓어서 15분간 infection 시켰다. 새로운 petridish에 filter paper를 깔아 담배 잎을 닦은 후, 담배 잎을 건져 기공면이 위로 향하도록 MS104배지에 촘촘히 얹어 2일간 암배양 하였다. 2일간 배양 뒤 MS selection 배지에 잎을 올려 명배양으로 25°C에서 2주정도 키우며 관찰하며, 형질전환체가 나오기 시작하면 배지를 갈아주고, shooting된 형질전환체는 rooting배지에 옮겨주며, pot 순화를 거쳐 종자를 수득함 .

MS media(100ml)				
Reagents	MSO	MS104	MS선발배지	rooting배지
MS salt	4.3 g/L	4.3 g/L	4.3 g/L	4.3 g/L
sucrose	30 g	30 g	30 g	30 g
plant agar	8 g	8 g	8 g	8 g
vitamin B5	1ml/L	1ml/L	1ml/L	1ml/L
BAP	.	1mg/L	1mg/L	.
NAA	.	0.1mg/L	0.1mg/L	.
cefotaxime	.	.	500mg/L	500mg/L
kanamycine	.	.	300mg/L	100mg/L

㉞ 형질 전환된 캘러스의 Genomic DNA 분석

○ pJKF48 (3Dsp/sTEV) 발현벡터와 pJKF49 (3Dsp/sTEV.S219V)의 형질전환 유무를 확인 하기 위해 각각의 식물체로부터 담배 잎을 50 mg씩 각각 모아 액체질소를 이용하여 균질화 한 후 3Dsp(BamHI) F (5'- TTG GAT CCA TCA GTA GTG GTT AGC AGC ACC -3')와 TEV(KpnI)R (5'-GGT ACC TCA TCA TTG AGA GTA AAC CAA CTC-3') primer를 사용하여 아래 PCR 조건으로 genomic DNA PCR를 실시하였다.

95°C, 5분간 pre-denaturation

95°C, 30초 denaturation 30cycles

60°C, 30초 annealing

72°C, 30초 extension

72°C, 3분 final extension

㉔ 형질 전환된 담배의 Northern blot 분석

- 담배식물체를 배양 후 형질전환된 담배잎을 1g씩 각각 모아 균질화 한 후 전체 RNA를 추출(30 ug) 하였다. 각각의 세포주의 RNA를 Formaldehyde gel에 loading 한 후 분석하고 NC membrane에 붙인 후, a-32p-dCTP (동위원소)를 붙인 pJKF48, pJKF49 유전자를 probe로 하여 Northern blot 분석을 수행하였다.

(다) Tobacco TEV - Homoline 선발

- ① 종자 발아: Germination 방법은 Ep tube에 종자 seed(약 50ul)를 준비하고, 70% 에탄올 500ul 첨가하여 표면소독 하였다. 이후 1분동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 증류수로 세척하며 에탄올을 완전히 제거하고, 1% 락스를 넣고 10분동안 침지 시켜 소독하고 멸균증류수로 3회 세척해서 락스를 완전히 제거하였다. 이후 1시간동안 물에 침지시킨 후 항생제 저항성 선발배지에 germination 유도하였다.

항생제 저항성 선발배지	
Reagents	1L 기준
MS salt	4.3 g
sucrose	30 g
plant agar	8 g
vitamin B5	1 ml
kanamycine	300ppm
pH	5.8

- ② Homo line 선발(selection): 카나마이신 300ppm을 포함하는 선발배지에서 생육이 왕성한 식물체와 이어서 이를 포토에 옮겨서 재배한 후 종자를 채워하여 유전자 분리비를 확인하였다.

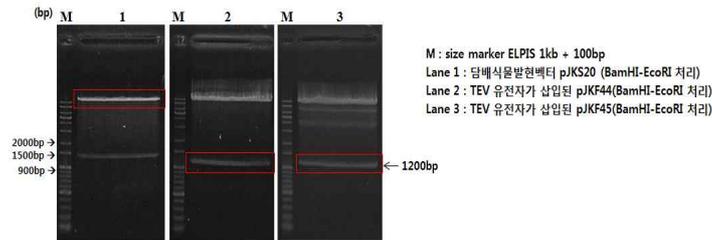
라. 세부연구개발 수행내용 (결과 및 고찰)

(1) TEV endopeptidase 고발현 식물체 선발과정

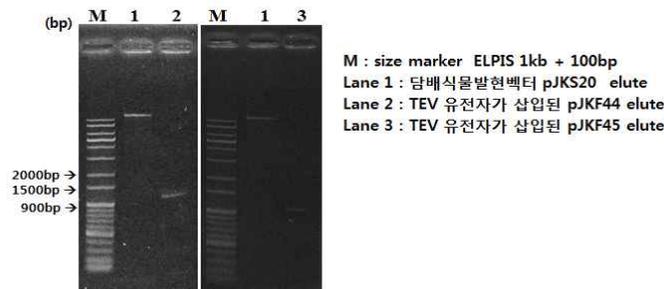
(가) Recombinant TEV(Havana) 유전자 식물발현벡터로 삽입

- ① 합성된 TEV 유전자를 식물발현벡터로 삽입하기 위하여 TEV 유전자가 삽입된 벡터 [(pJKF44 - 3Dsp/sTEV),(pJKF45 - 3Dsp/sTEV.S219V)]와 담배식물발현벡터에 각각

제한효소 BamHI 과 EcoRI처리를 하였고 (그림 326-1-1), Elution 후 Agrose gel run을 통하여 확인 하였다 (그림 326-1-2). Elution 후 TEV 유전자는 ligation과 형질전환과정을 거쳐 식물 발현을 유도하였다.

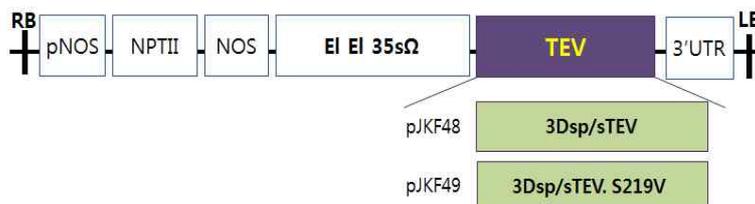


< 그림 326-1-1. 담배식물발현벡터 및 TEV유전자가 삽입된 벡터의 제한효소 처리 >



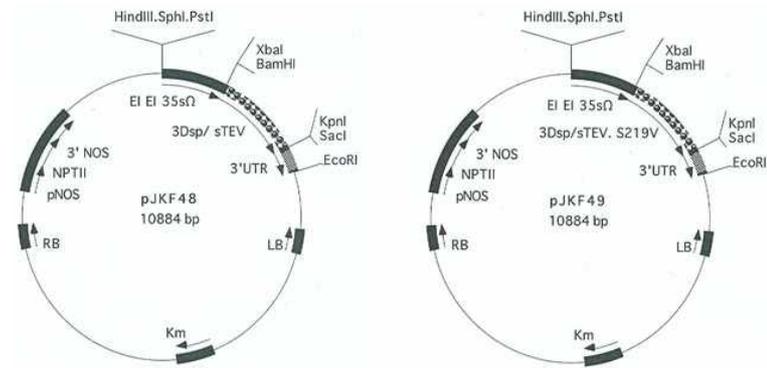
< 그림 326-1-2. Elution 후 담배식물발현벡터 및 TEV유전자 확인벡터내로 삽입하였다. >

② 아래 모식도는 재조합 TEV vector의 모식도이며 (그림 326-1-3), 각 TEV의 재조합 벡터는 pJKF48 와 pJKF49 으로 명명 하였다 (그림 326-1-4).

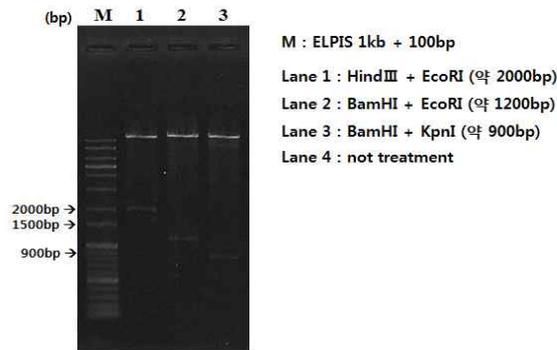


< 그림 326-1-3. 담배에서 TEV endopeptidase를 발현시키기 위해 제작된 TEV 벡터 >

③ TEV endopeptidase를 담배에서 발현시키기 위한 발현 벡터에서 프로모터부터 TEV 유전자까지는 HindIII와 EcoRI 제한 효소로, TEV 유전자에서 3'UTR 까지는 BamHI과 EcoRI 제한 효소를 사용하여 크기를 확인하였고, TEV 유전자는 BamHI과 KpnI 제한 효소를 사용하여 확인 하였다 (그림 326-1-5).

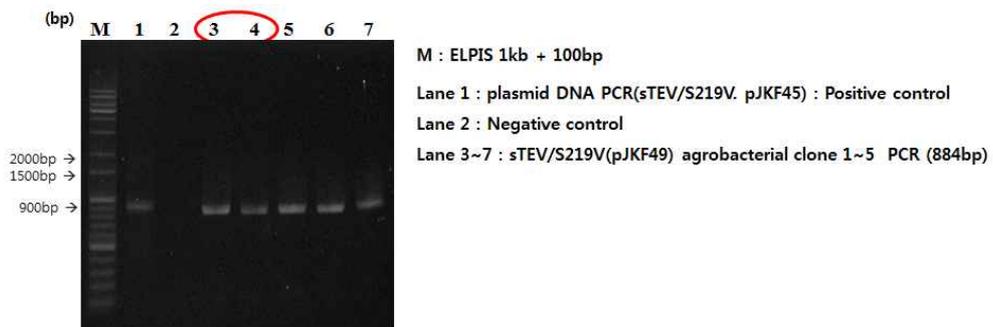


< 그림 326-1-4. pJKF48 와 pJKF49 유전자 지도 >

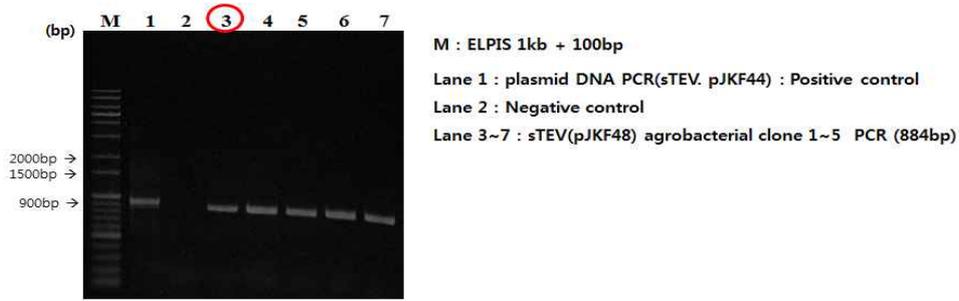


< 그림 326-1-5. TEV endopeptidase의 담배에서 발현시키기 위한 재조합 TEV 벡터 확인 >

④ TEV 유전자 발현벡터는 토양균인 *Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환을 위해 Triparental mating을 통하여 agrobacteria에 형질전환 하였고, plasmid DNA PCR을 통해 TEV 유전자로 형질전환된 *Agrobacterium*를 확인하였고, 제한 효소 AccI을 처리하여 최종 선발 하였다 (그림 326-1-6, 7).



< 그림 326-1-6. pJKF48 의 agrobacteria 형질전환 균주 선발 >



< 그림 326-1-7. pJKF49 의 agrobacteria 형질전환 균주 선발 >

(2) TEV endopeptidase의 고생산 세포주의 확립

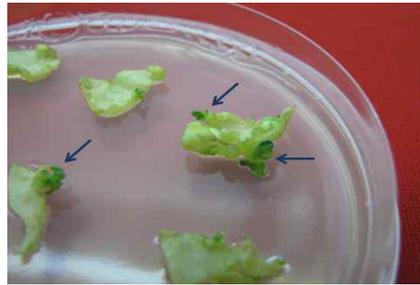
(가) 토양균 (*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여 식물 형질전환 유도

- ① *Agrobacterium tumefaciens*를 통한 식물세포 형질전환은 TEV 유전자 발현벡터 (pJKF48, pJKF49)를 가진 agrobacteria(토양균)을 사용하여 담배잎에 형질전환을 수행 하였다. 그리고 항생제 선발로부터 살아남은 캘러스는 키모트립신 유전자 도입여부를 분자생물학적으로 확인하였다.
- ② shooting된 형질전환체는 rooting배지에 옮겨주며, pot 순화를 거쳐 종자를 수득하였다 (그림 326-1-8).



< 그림 326-1-8. Tobacco TEV 형질전환 식물체 제조 과정 >

- ③ 항생제 선발로부터 살아남은 담배 캘러스 (그림 326-1-9)는 pJKF48 발현벡터를 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용해 형질전환 된 17개 세포주, pJKF49 발현벡터를 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용해 형질전환 된 10개 세포주를 각각 확보하였다.



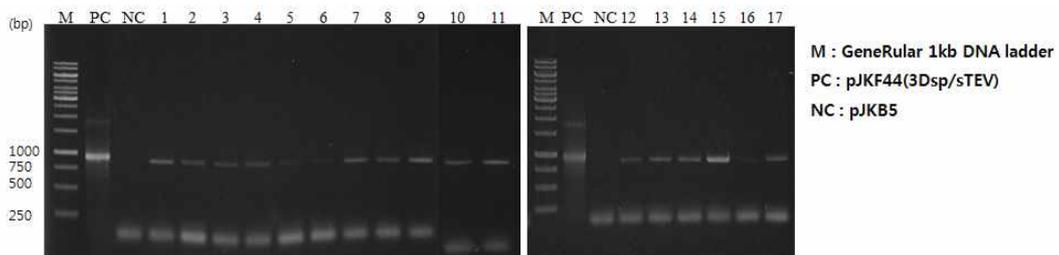
< 그림 326-1-9. 항생제 선발로부터 살아남은 담배식물체 >

- ④ 확보된 담배 세포주로부터 키모트리핀 유전자 도입여부를 분자생물학적으로 확인하기 위하여 각각의 MSR배지에 배양하였다 (그림 326-1-10).

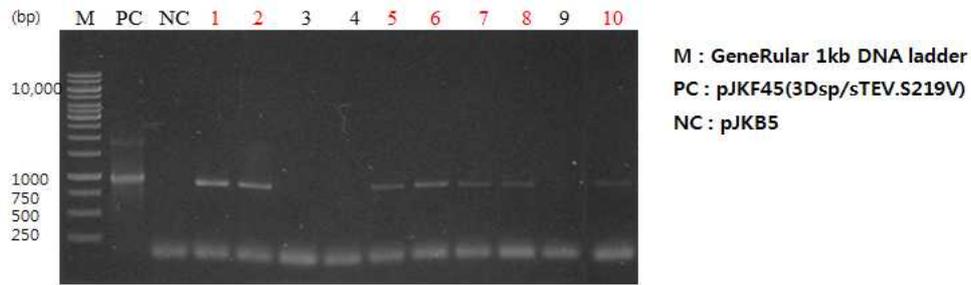


< 그림 326-1-10. 항생제 선발로부터 살아남은 재분화 담배식물체 배양 >

- ⑤ pJKF48 (3Dsp/sTEV) 발현벡터와 pJKF49 (3Dsp/sTEV.S219V)의 형질전환 유무를 확인하였다 (그림 326-1-11). pJKF48 (3Dsp/sTEV) 발현벡터를 토양균(agrobacterium)을 통해 형질전환 시킨 세포주 17개와 pJKF49 (3Dsp/sTEV.S219V)를 토양균(agrobacterium)을 통해 형질전환 시킨 세포주 7개를 각각 genomic DNA PCR을 한 후 아가로즈겔로 분석하여 약 900bp에서 band를 확인하였다 (그림 326-1-12).



< 그림 326-1-11. pJKF48 발현벡터가 도입된 세포주의 genomic DNA PCR >



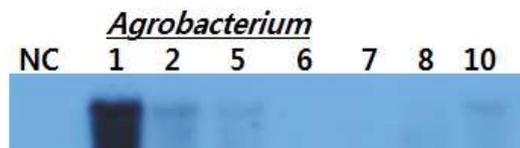
< 그림 326-1-12. pJKF49 발현벡터가 도입된 세포주의 genomic DNA PCR >

⑥ Genomic DNA PCR 결과 pJKF48(3Dsp/sTEV) 발현벡터를 토양균을 통해 형질전환 시킨 경우 pJKF48 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 9a,10a, 11a, 12a, 13a, 14a, 15a, 16a와 17a 세포주 17개를 선발 하였다. 또한 pJKF49(3Dsp/sTEV.S219V) 발현벡터를 토양균을 통해 형질전환 시킨 경우 pJKF49 1a, 2a, 5a, 6a, 7a, 8a와 10a 세포주 7개를 선발하였다. pJKF48 발현벡터를 토양균을 통해 형질전환 된 17개 세포주 중 genomic DNA PCR를 통하여 17개 세포주를 선발하였고, Northern blot 분석을 통해 **pJKF48 8a**와 12a 세포주 2개를 선발하여 TEV 유전자의 단백질 발현 유무를 조사하기 위해 계대유지 및 배양 하였다 (그림 326-1-13).



< 그림 326-1-13. pJKF48 발현벡터를 토양균을 통해 형질전환된 11개 세포주의 Northern blot 분석 >

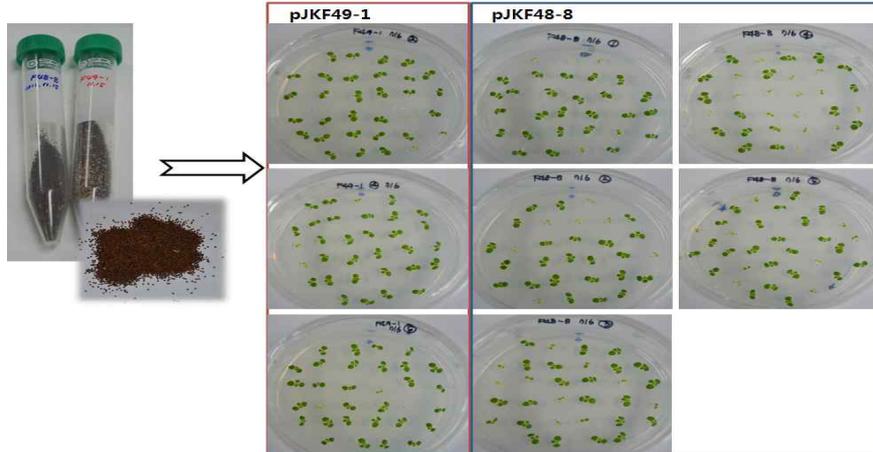
⑦ pJKF49 발현벡터를 토양균을 통해 형질전환 된 10개 세포주 중 genomic DNA PCR를 통하여 7개 세포주를 선발하였고, Northern blot 분석을 통해 **pJKF49 1a 세포주** 1개를 선발하여 TEV 단백질 발현 유무를 조사하기 위해 계대유지 및 배양 하였다 (그림 326-1-14).



< 그림 326-1-14. pJKF49 발현벡터를 토양균을 통해 형질전환된 7개 세포주의 Northern blot 분석 >

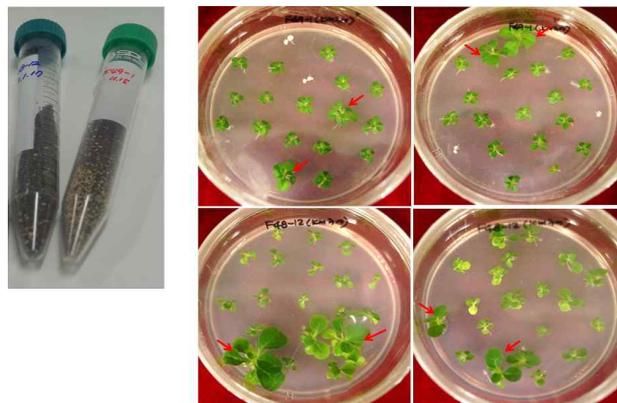
(나) Tobacco TEV - Homoline 선발

- ① 종자발아: 고발현 세포주로 선발된 pJKF49 1a, pJKF48 8a 각각의 식물체에 대한 Homoline 선발을 위하여 수확한 pJKF49 1a, pJKF48 8a 식물체의 종자를 항생제저항성 선발배지에 germination 유도하였다 (그림 326-1-15).



< 그림 326-1-15. TEV endopeptidase 고발현 pJKF49 1a, pJKF48 8a 식물체의 T1종자의 발아 확인실험 >

- ② 선발: 카나마이신 300ppm을 포함하는 선발배지에서 생육이 왕성한 식물체를 잠정적으로 카나마이신에 대하여 저항성인 RR 유전자형 후보군으로 선발하였으며 (그림 326-1-16), 이를 포도에 옮겨서 재배한 후 종자를 채워하여 유전자 분리비를 확인하여 최종적으로 Homoline을 선발하였다



< 그림 326-1-16. TEV endopeptidase 고발현 pJKF49 1a, pJKF48 8a 식물체의 T1종자로부터 Homoline 선발 >

2. 식물유래 TEV endopeptidase의 분리정제 및 활성 확인

○ 연구수행기관 : (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) TEV endopeptidase 정제를 위한 식물조직별 적정 파쇄방법 확립

- ① 액체질소를 이용한 파쇄방법
- ② 상온에서 homogenizer를 이용한 파쇄방법
- ③ 4°C에서 homogenizer를 이용한 파쇄방법

(2) 이온교환 크로마토그래피를 이용한 TEV endopeptidase 정제

- ① 음이온 크로마토그래피를 이용한 TEV endopeptidase 정제

(3) 최적 효소활성 조건 확인

- ① 버퍼 조성에 따른 효소활성 확인
- ② pH에 따른 TEV endopeptidase의 활성 조사
- ③ 저장 온도에 따른 TEV endopeptidase의 활성 조사
- ④ 저장 기간에 따른 TEV endopeptidase의 활성 조사

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 재조합 단백질 생산시 tagging protein을 제거하는 필수적인 효소
- 단백질의 특성상 대장균에서 생산 할 때에 inclusion body를 형성하여 생산수율이 낮으며, 대부분 CHO cell에서 생산하는 관계로 매우 고가임
- 의료용 단백질 생산시 2차 감염 관계로 동물세포유래 효소를 기피하는 실정이므로 생산시 사업화 가능성이 매우 높음
- 본 연구를 통하여 산업화 가능성이 높은 TEV endopeptidase의 고생산 식물체가 개발되어 이로부터 TEV endopeptidase의 분리정제 기술을 확립하고 적정 저장조건을 확립하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 결과

(1) 산업화 수준의 단백질 다량 추출을 위한 식물 조직별 적정 파쇄방법

- TEV endopeptidase 고발현 식물체로부터 산업화 수준의 단백질 다량 추출을 위한 식물 조직별 적정 파쇄방법을 조사하였음. 식물세포를 파쇄 할 경우 식물세포 내에 존재하는 다량의 endopeptidase에 의해 재조합단백질이 분해되어 생산수율이 낮아지는데 이러한 문제점을 극복하기 위해 다양한 파쇄방법에 따른 재조합단백질의 활성을 측정해 최적의 조건을 확립하였음.

(가) 액체질소를 이용한 파쇄방법

- 식물조직을 쉽고 빠르게 파쇄하기 위한 방법으로 액체질소를 이용하여 파쇄 하였음.
- 전주생물소재연구소로부터 받아 적정 파쇄방법을 조사하였음. 잎을 메스로 잘게 자른 후 각각 2g을 저울로 칭량한 후 미리 준비해둔(-70℃에 보관) 막자사발에 넣고 파쇄하였음. 실험조건은 액체질소를 이용해 파쇄한 경우와 액체질소와 PMSF(단백질 분해 억제제)를 이용해 파쇄한 경우로 각각 파쇄하였음. 각각의 시료를 2 mL tube에 넣고 현탁용액(Mcivaine's buffer, pH 6.0, 10 mM NaCl) 0.6mL로 현탁 후 12,000 rpm, 4℃, 30분 동안 원심분리 하였음. 상층액 (Total cell extract)을 조심스럽게 새로운 2 mL tube에 넣고, -20℃에 보관하면서 다음실험을 진행하였음.

(나) 상온에서 homogenizer를 이용한 파쇄방법

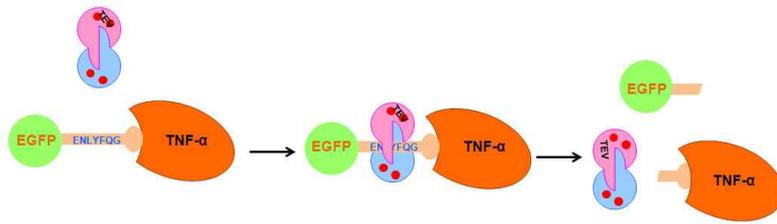
- 잎을 메스로 잘게 자른 후 각각 2g을 저울로 칭량한 후 미리 준비해둔(-70℃에 보관) 2 mL tube에 각각 넣고 homogenizer로 파쇄하였음. 실험조건은 상온에서 액체질소 없이 파쇄한 경우와 상온에서 단백질 분해 억제제만 넣고 파쇄한 경우로, 각각의 시료를 homogenizer로 파쇄 후 2 mL tube에 넣고 현탁용액(Mcivaine's buffer, pH 6.0, 10 mM NaCl) 0.6mL로 현탁 후 12,000 rpm, 4℃, 30분 동안 원심분리 하였음. 상층액 (Total cell extract)을 조심스럽게 새로운 2 mL tube에 넣고, -20℃에 보관하면서 다음실험을 진행하였음.

(다) 4℃에서 homogenizer를 이용한 파쇄방법

- 잎을 메스로 잘게 자른 후 각각 2g을 저울로 칭량한 후 미리 준비해둔(-70℃에 보관) 2 mL tube에 각각 넣고 homogenizer로 4℃에서 파쇄 하였음. 실험조건은 액체질소 없이 파쇄한 경우와 단백질 분해 억제제만 넣고 파쇄한 경우로, 각각의 시료를 homogenizer로 파쇄 후 2 mL tube에 넣고 현탁용액(Mcivaine's buffer, pH 6.0, 10 mM NaCl) 0.6mL로 현탁 후 12,000 rpm, 4℃, 30분 동안 원심분리 하였음. 상층액 (Total cell extract)을 조심스럽게 새로운 2 mL tube에 넣고, -20℃에 보관하면서 다음실험을 진행하였음.

(라) 파쇄 방법에 따른 재조합단백질의 활성 측정

- 타겟 재조합단백질 TEV endopeptidase의 활성을 측정하기 위해 기질 단백질인 GFP-ENLYFQG-TNF- α fusion 단백질을 이용하여 SDS-PAGE와 western blot을 수행함. TEV endopeptidase에 의해 GFP (kDa)와 TNF- α (kDa)의 band를 확인



< 그림 326-2-1. TEV endopeptidase 활성화 모식도 >

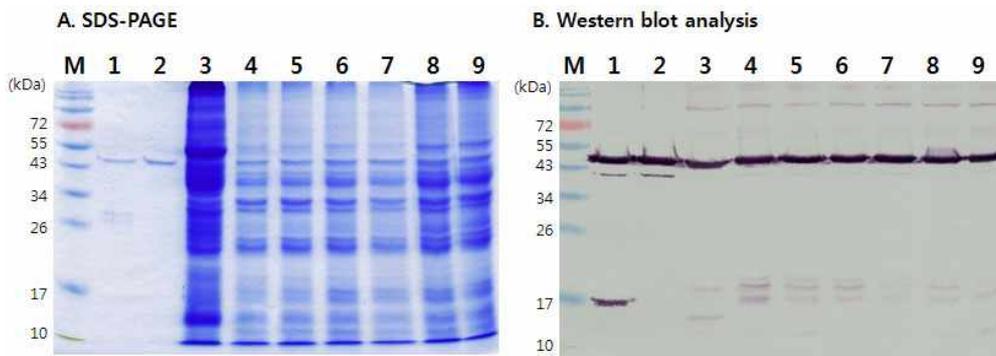
- TEV endopeptidase 활성을 측정하기 위해 각각의 파쇄방법으로 추출한 상층액을 이용하여 아래와 같이 enzyme reaction mixture를 만든 후 30°C, 3h 동안 반응시켰음. 각각의 반응액 30 uL와 5X sample buffer 6 uL를 넣고 100°C, 5 min 동안 시료를 끓인 후 36 uL를 12% polyacrylamide gel에 loading 하고 120V로 gel run을 하였음. 이후 CBBR 염색과 silver 염색, western blot을 수행하였음.

	stock 농도	Working 농도	NC	PC	시료	단위
			substrate	TEV protease (Invitrogen)		
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24ug	1	1	1	ul
10X reaction buffer			3	3	3	ul
TEV protease (Invitrogen)	1unit /ul	1unit	-	1	-	ul
시료			-	-	26	ul
DW	-	-	26	25	-	ul
Final volume			30	30	30	ul
· 10X reaction buffer : 250mM Tris-HCl(pH7.5), 750mM NaCl, 10mM DTT, 5mM EDTA · Positive control : AcTEV™ protease (invitrogen / cat. 12575-015)						

- western blot을 위해 anti-hTNFα ascite를 primary antibody로 1:5000으로 사용하였고, secondary antibody는 anti-mouse IgG(AP conjugated)를 1:10,000으로 사용하여 BCIP/NBT 용액으로 약 4분 발색한 후 band를 확인 함.

	1차 antibody	2차 antibody
Name	anti-hTNFα ascite fluid	anti-mouse IgG (Whole molecule) -alkaline phosphatase polyclonal antibody
Working concentration	1: 5000	1:10,000
제조회사	전주생물소재연구소. 신물질탐색실 최충현 연구원	Sigma/Cat. A3562
발색 : BCIP/NBT solution (발색 3'30")		

- 식물 조직의 파쇄방법에 따라 TEV protease의 활성을 비교한 결과 약 2g의 담배 잎을 상온에서 파쇄한 경우나 액체질소를 첨가해서 파쇄한 경우, 또는 protease의 inhibitor를 넣고 파쇄한 경우 모두 활성이 유사하게 나타남. 담배 조직의 파쇄 정도는 액체질소를 넣고 파쇄 했을 때 균질화가 잘 되었고, 상온과 4℃에서는 담배 잎의 조직이 잘 파쇄 되지 않았음.



M : protein ladder, 1: PC (pJKF33/RIL *E.coli* TEV) + substrate
 2: substrate, 3: NC (Tobacco) 35ul + substrate
 4: RT + substrate, 5: RT (+1mM PMSF) + substrate
 6: 4 °C + substrate, 7: 4 °C (+ 1mM PMSF) + substrate
 8: 액체질소 + substrate, 9: 액체질소 (+ 1mM PMSF) + substrate

< 그림 326-2-2. 식물조직 파쇄 방법에 따른 TEV protease의 활성 측정 >

(2) TEV endopeptidase 고발현 식물체로 부터의 분리정제

(가) TEV endopeptidase의 정제

- 그림 326-1-17과 같이 온실에서 재배 중인 TEV endopeptidase 고발현 식물인 Tobacco TEV[pJKF48-8/pJKF49-1]을 수확하여 재료로 사용하였음.

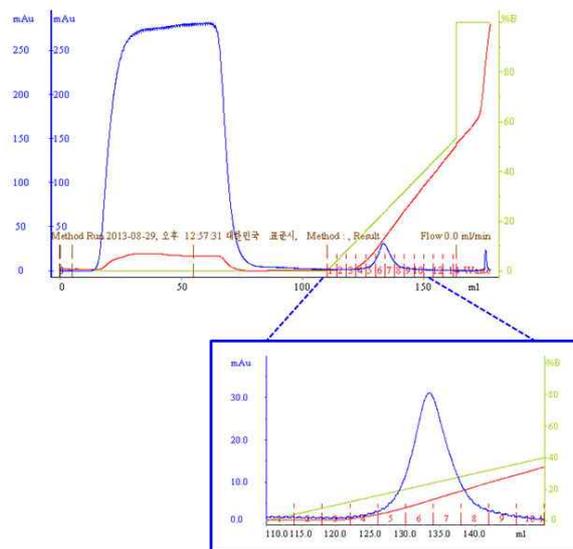


a. Tobacco TEV Pot 순화

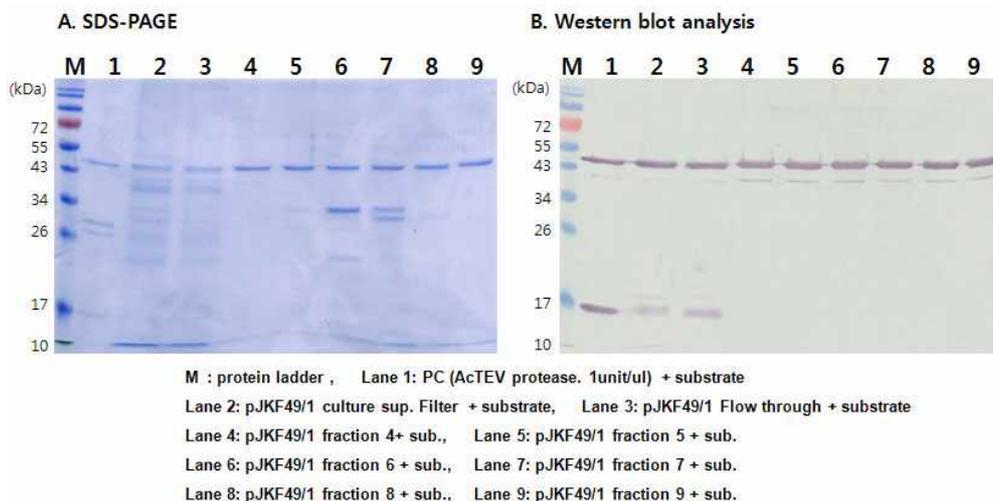
b. Leaf harvest(25g사용)

< 그림 326-2-3. 포트에서 재배중인 담배와 담배잎 수확 및 칭량 >

○ 담배잎으로부터 TEV protease의 정제: pJKF49-1의 담배잎을 파쇄하여 TEV protease를 정제하기 위해 음이온 ion-exchange chromatography 수행하였음. 음이온 ion-exchange chromatography는 Q-Sepharose FF를 사용하였으며, pH 8.0의 버퍼를 이용하여 수행하였음. 음이온 ion-exchange chromatography를 수행한 결과 fraction#5-8 사이에서 1개의 peak를 확인하였으며, fraction#5-8을 SDS-PAGE 및 Western blot analysis 분석을 수행한 결과 모든 fraction#5-8에서 TEV protease의 항체에 대한 밴드가 검출되어 TEV protease가 분리되었음을 확인하였음 (그림 326-2-5)



< 그림 326-2-4. pJKF49-1 담배잎으로부터 추출한 샘플의 anion exchange chromatography 수행 >



< 그림 326-2-5. pJKF49-1 담배잎으로부터 추출한 샘플의 SDS-PAGE 및 protease활성 측정 >

(1) 식물유래 TEV endopeptidase의 활성 확인

(가) 세부연구개발 수행내용

- ① TEV endopeptidase 고발현 식물체로부터 생화학적 분석을 위한 단백질을 추출하였다. 식물조직을 쉽고 빠르게 파쇄하기 위하여 액체질소를 이용하여 식물조직을 파쇄하였고, total cell extract를 추출하였다.
- ② TEV endopeptidase 고발현 식물체의 잎을 메스로 자른 후 50g을 저울로 칭량한 후 25g을 미리 준비해둔(-70℃에 보관) 막자사발에 넣고 파쇄하였다. 시료를 100 mL tube에 넣고 현탁용액(Mcivaine's buffer, pH 6.0, 10 mM NaCl) 50mL로 현탁 후 8,000 rpm, 4℃, 30분 동안 원심분리 한 후, 상층액 (Total cell extract)을 조심스럽게 새로운 tube에 넣고, 원심분리를 1회 반복하여 상층액을 취하였다. 그 후 Flow through를 받아 -20℃에 보관하면서 생화학적 분석을 진행하였다.
- ③ 반응온도에 따른 TEV endopeptidase (pJKF48-8 Flowthrough)의 활성 조사
 - Havana 유래 재조합 Tobacco etch virus protease의 반응온도에 따른 활성을 조사하기 위해 현재 판매되고 있는 invitrogen사의 TEV protease와 비교하였다.
 - Enzyme reaction mixture: Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase의 활성은 (주)엔비엠에서 정제한 EGFP-hFXa TEV-TNFa substrate protein을 이용하여 확인하였다. TEV endopeptidase(pJKF48-8 Flow through)의 반응온도에 따른 효소 활성을 조사하기 위해 10℃, 20℃, 30℃, 40℃ 각각에서 아래 reaction mixture만든 후 15h 동안 반응시켰다.

	stock 농도	Working 농도	Only substrate	10℃		20℃		30℃		40℃		단위
				PC	pJKF48/8	PC	pJKF48/8	PC	pJKF48/8	PC	pJKF48/8	
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24 ug	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ul
10X reaction buffer			4	4	4	4	4	4	4	4	4	ul
TEV protease (Invitrogen)	1 unit/ul	1 unit	-	1	-	1	-	1	-	1	-	ul
pJKF48/8			-	-	35	-	35	-	35	-	35	ul
DW	-	-	35	34	-	34	-	34	-	34	-	ul
Final volume			40	40	40	40	40	40	40	40	40	ul
· 10X reaction buffer : sodium phosphate pH 7.0, 10mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT · Positive control : AcTEV™ protease (invitrogen / cat. 12575-015)												

- SDS-PAGE 및 Western blot으로 활성 측정하기 위해 Reaction sample 40ul 과 5X reduce sample buffer 8ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 48ul 를 loading 하여 전기영동을

수행하였고, Western blot analysis를 수행하여 활성 분석하였다.

Western blot에 사용한 antibody

	1차 antibody	2차 antibody
Name	anti-hTNFa ascite fluid	anti-mouse IgG (Whole molecule) alkaline phosphatase conjugated polyclonal antibody
Working concentration	1: 5000	1:10,000
제조회사	전주생물소재연구소	Sigma/Cat. A3562
발색 : BCIP/NBT solution (발색 2')		

④ Buffer 구성에 따른 TEV endopeptidase (pJKF48-8 Flow through)의 활성 비교 조사

- Enzyme reaction mixture: Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase의 활성은 (주)엔비엠에서 정제한 EGFP-hFXa TEV-TNFa substrate protein을 이용하여 확인하였다. TEV endopeptidase(pJKF48-8 Flow through)의 Buffer 구성(Buffer 1. 250mM Tris-HCl (pH7.5), 750mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT ; Buffer 2. sodium phosphate pH 7.0, 10mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT)과 반응온도(10°C, 20°C, 30°C, 40°C) 따른 효소 활성을 조사하기 위해 각각에서 아래 reaction mixture만든 후 15h 동안 반응시켰다.

	stock 농도	Working 농도	Only substrate	10°C		20°C		30°C		40°C		단위
				PC	pJKF 48/8							
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24 ug	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ul
10X reaction buffer			4	4	4	4	4	4	4	4	4	ul
TEV protease (Invitrogen)	1 unit/ul	1 unit	-	1	-	1	-	1	-	1	-	ul
pJKF48/8			-	-	35	-	35	-	35	-	35	ul
DW	-	-	35	34	-	34	-	34	-	34	-	ul
Final volume			40	40	40	40	40	40	40	40	40	ul
· 10X reaction buffer buffer 1. 250mM Tris-HCl(pH7.5), 750mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT buffer 2. sodium phosphate pH 7.0, 10mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT · Positive control : AcTEV TM protease (invitrogen / cat. 12575-015)												

- SDS-PAGE 및 Western blot으로 활성 측정하기 위해 reaction sample 40ul 과 5X reduce sample buffer 8ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 48ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, Western blot analysis를 수행하여 활성 분석하였다.

⑤ pH에 따른 TEV endopeptidase (pJKF48-8 Flow through)의 활성 조사

- Havana 유래 재조합 Tobacco etch virus protease의 최적 활성을 보이는 pH를 조사하기

위해 현재 판매되고 있는 invitrogen사의 TEV protease와 비교하였다.

- Enzyme reaction mixture: Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase의 활성은 (주)엔비엠에서 정제한 EGFP-hFXa TEV-TNFa substrate protein을 이용하여 측정하였고, pH에 따른 효소 활성을 조사 하기 위해 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 buffer 각각에서 아래 reaction mixture를 만든 후 30°C, 15h 동안 반응시켰다.

	stock 농도	Workin g 농도	Only substrate	pH 6.0		pH 7.0		pH 8.0		pH 9.0		단위
				PC	pJKF 48/8							
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24 ug	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ul
10X reaction buffer			4	4	4	4	4	4	4	4	4	ul
TEV protease (Invitrogen)	1 unit/ul	1 unit	-	1	-	1	-	1	-	1	-	ul
pJKF48/8			-	-	35	-	35	-	35	-	35	ul
DW	-	-	35	34	-	34	-	34	-	34	-	ul
Final volume			40	40	40	40	40	40	40	40	40	ul
· 10X reaction buffer sodium phosphate pH 6.0, 10mM NaCl + 10mM DTT, 5mM EDTA sodium phosphate pH 7.0, 10mM NaCl + 10mM DTT, 5mM EDTA sodium phosphate pH 8.0, 10mM NaCl +10mM DTT, 5mM EDTA sodium phosphate pH 9.0, 10mM NaCl +10mM DTT, 5mM EDTA · Positive control : AcTEV TM protease (invitrogen / cat. 12575-015)												

- SDS-PAGE 및 Western blot으로 활성 측정하기 위해 reaction sample 40ul 과 5X reduce sample buffer 8ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 48ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, Western blot analysis를 수행하여 활성 분석하였다.
- Enzyme reaction mixture: Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase의 활성을 조사하기 위해 EGFP-TNFa substrate protein을 이용하였다. 아래 표와 같이 enzyme reaction mixture를 만든 후 30°C, 3h 동안 반응시켜. TEV protease는 각각 4°C, -20°C, -70°C에서 1개월에서부터 11개월까지 보관한 sample들로서 매달 정해진 시간이 되었을 때에 활성을 측정하였다.

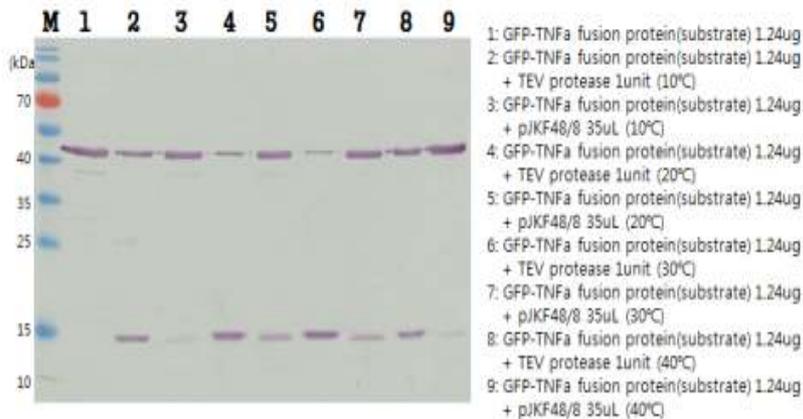
	stock 농도	사용 농도	NC	PC	보관온도별			Freeze-thaw recycle			단위	
			기질	pJKF33-RIL (<i>E. coli</i> TEV)	RT (23°C)	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C		-70°C
Substrate (EGFP-hFXa TEV-TNFa)	1.24 ug/ul	1.24 ug	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ul
10X reaction buffer			4	4	4	4	4	4	4	4	4	ul
pJKF33-RIL (<i>E. coli</i> TEV)	0.17 ug/ul	0.17 ug	-	1	-	-	-	-	-	-	-	ul
Havana 유래 재조합 TEV	30ul	30 ul	-	-	30	30	30	30	30	30	30	ul
DW	-	-	35	34	5	5	5	5	5	5	5	ul
Final volume			40	40	40	40	40	40	40	40	40	ul
· 10X reaction buffer : 250mM Tris-HCl(pH7.5), 750mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT · Positive control : pJKF33-RIL(<i>E. coli</i> TEV) from (주)NBM												

- SDS-PAGE 및 Western blot으로 활성 측정: reaction sample 40ul 과 5X reduce sample buffer 8ul 를 혼합하여 5분간 끓인 후 48ul 를 loading 하여 전기영동을 수행하였고, Western blot analysis를 수행하여 활성 분석하였다.

(나) 연구결과

① 반응온도에 따른 식물유래 TEV endopeptidase의 활성 조사

- Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase의 반응온도에 따른 효소 활성을 조사한 결과 20°C와 30°C에서 최적의 활성을 나타내었으며, 10°C 이하, 40°C 이상에서는 endopeptidase 활성이 감소하는 하는 것을 확인 하였다 (그림 326-2-6).



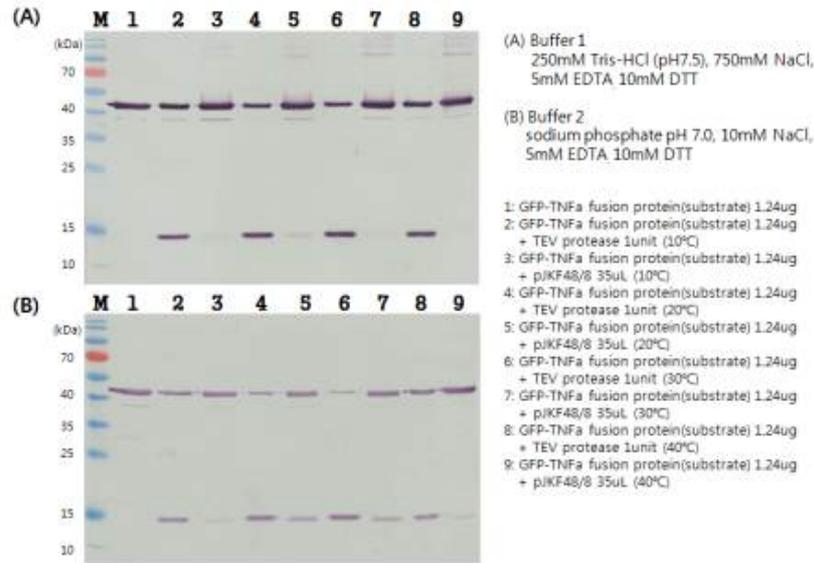
< 그림 326-2-6. 식물유래 TEV endopeptidase의 온도에 따른 효소 활성 조사 >

② Buffer 조성에 따른 식물유래 TEV endopeptidase의 활성 비교 조사

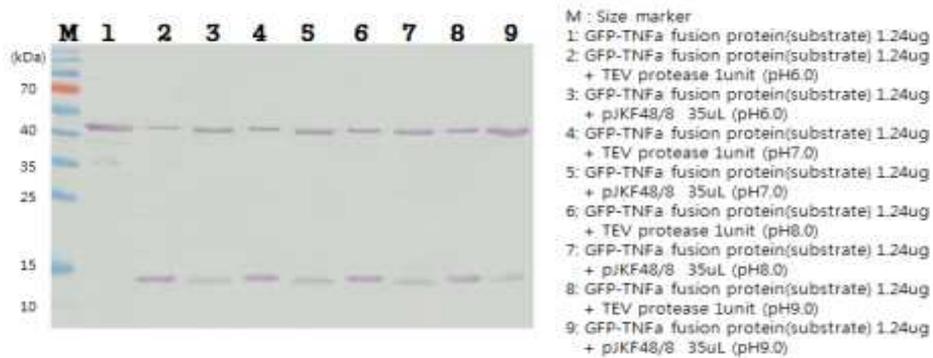
- Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase는 buffer 1 [250mM Tris-HCl (pH7.5), 750mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT]로 반응시켰을 때에는 온도와 상관없이 거의 활성을 보이지 않았다. 그러나 buffer 2 [sodium phosphate pH 7.0, 10mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT] 로 반응시켰을 때에는 20°C와 30°C에서 최적의 활성을 나타내었으며, buffer 1에 비해 높은 효소 활성을 보이는 것을 확인하였다. 따라서 Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase의 활성을 조사하기 위해서는 sodium phosphate pH 7.0, 10mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM DTT, 30°C에서 반응시키는 것이 최적 조건임을 확인 하였다 (그림 326-2-7).

③ pH에 따른 식물유래 TEV endopeptidase의 활성 조사

- Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase (pJKF48/8)의 pH에 따른 효소 활성을 조사 한 결과 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 buffer 각각에서 endopeptidase에 의해 모두 cleavage 되는 것을 확인했으며 큰 차이는 보이지 않았다 (그림 326-2-8).



< 그림 326-2-7. 식물유래 TEV endopeptidase의 buffer 조성에 따른 효소 활성 비교 조사 >



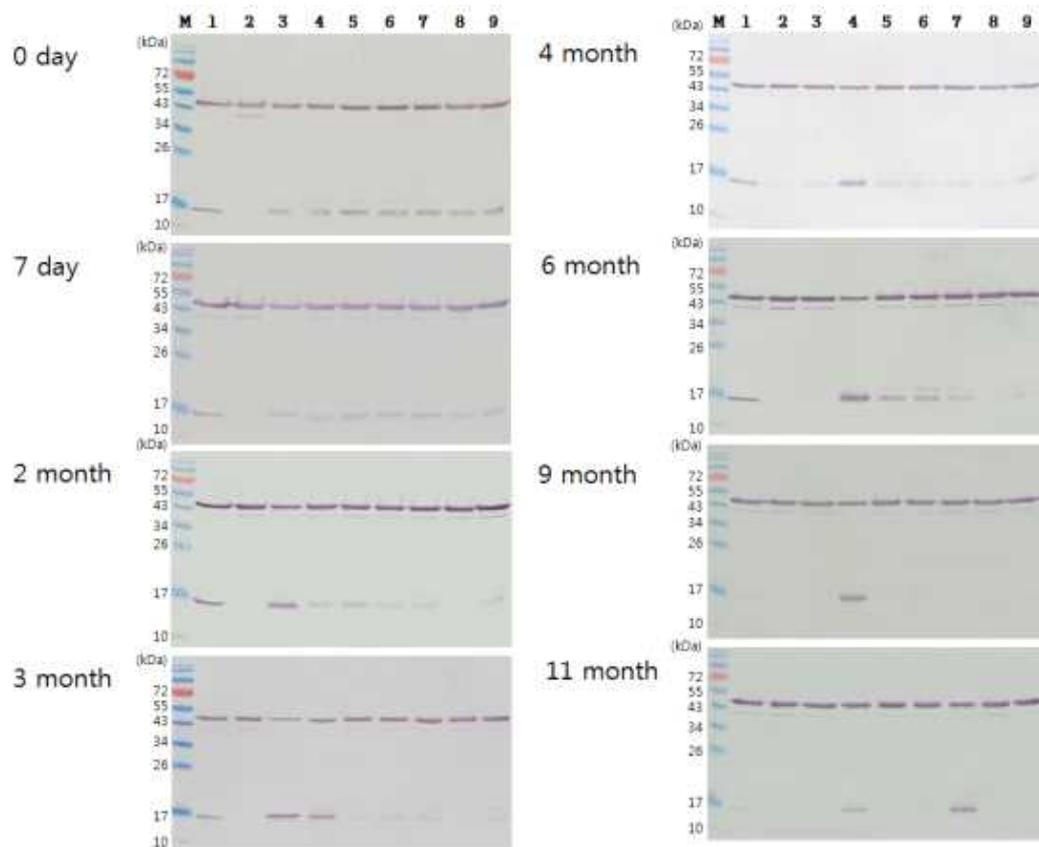
< 그림 326-2-8. 식물유래 TEV endopeptidase의 pH에 따른 효소 활성 조사 >

④ 저장온도 및 기간에 따른 식물유래 TEV endopeptidase의 활성 조사

- 일반적으로 재조합 단백질의 최적 보관방법은 $-20^{\circ}\text{C} \sim -70^{\circ}\text{C}$ 에서 12 month 동안, $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 에서는 1 month 동안 안정하다고 알려져 있고, 또한 $-20^{\circ}\text{C} \sim -70^{\circ}\text{C}$ 보관하는 동안 freeze-thaw 하게 되면 1month 까지 안정하다고 알려져 있다. 하지만 제품의 형태 즉, 분말, 액체에 따라서 그 저장 온도와 방법은 달라진다. 따라서 저장온도 및 기간에 따른 효소활성을 조사함으로써 재조합 단백질(TEV endopeptidase)의 최적 보관방법을 결정하고자 한다. TEV endopeptidase 고발현 식물체의 저장성을 조사하기 위해 (주) 엔비엠에서 정제한 pJKF33-RIL (*E.coli* TEV) TEV protease와 비교하였다.
- Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase [pJKF48/8 Flow through] 35ul씩 aliquot하여 Room-temperature, 4°C , -20°C , -70°C 에 보관하였고, freeze-thaw recycle(F/T 라

표기)에 따른 활성을 측정하기 위하여 온도별(4℃, -20℃, -70℃)로 보관하였다. 각각 1개월부터 11개월이 각각 되었을 때 시료를 꺼내어 TEV protease의 활성을 측정하였다.

- Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase의 저장온도 및 보관기간에 따른 효소 활성을 조사한 결과 보관 7일째까지는 활성에 큰 차이를 보이지 않았다. 2개월 이후부터는 전반적으로 효소 활성이 감소하기 시작하였고, 상온에 보관 했을 경우 보관기간 4개월 이후부터는 효소 활성이 사라짐을 확인하였다. 그러나 4℃에 보관했을 경우 11개월이 된 시점에서조차 효소 활성에 차이가 없는 것으로 확인되었다. 따라서 Havana 유래 재조합 TEV endopeptidase를 장기 보관하기 위해서는 단백질 분해 억제제, glycerol 등의 안정제를 첨가하여 보관하는 것이 안정적으로 보관하는 방법이라고 보인다 (그림 326-2-9).



M : size marker, 1 : PC, 2 : substrate, 3 : RT, 4 : 4℃,
5 : -20℃, 6 : -70℃, 7: 4℃(F/T), 8: -20℃(F/T), 9: -70℃(F/T)

< 그림 326-2-9. TEV endopeptidase (pJKF48-8)의 저장온도 및 기간에 따른 효소 활성 조사 >

⑤ TEV endopeptidase의 적정 포장방법

- TEV endopeptidase의 포장을 위한 formulation은 크게 분말 형태와 액상형태로 나눌수 있는데 protease의 경우 주로 액상제형으로 판매됨. 따라서 액상제형으로 포장함. 분말형태는 동결건조 분말인데 액상제형에서 50% glycerol을 제외하고 동결건조 함으로서 분말화하여 제품으로 포장한 상태임. 액상제품 포장을 위한 formulation은 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% glycerol을 첨가하여 제조함.
- 식물유래 TEV endopeptidase을 gel filtration column이나 dialysis를 통해 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM DTT로 buffer exchange 한 후 50% glycerol을 첨가하여 제형을 만듦.
- Formulation 1
 - 식물유래 TEV endopeptidase을 gel filtration column이나 dialysis를 통해 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM DTT로 buffer exchange 한 후 0.2 um 필터 함. 단백질을 정량한 후 10 unit, 50 unit, 100 unit으로 vial에 각각 분주하고 동결건조하여 분말형태로 포장.
- Formulation 2
 - 식물유래 TEV endopeptidase을 gel filtration column이나 dialysis를 통해 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM DTT로 buffer exchange 한 후 0.2 um 필터 함. 단백질을 정량한 후 1000 unit으로 vial에 각각 분주하고, 50% glycerol을 첨가하여 액상제형으로 포장.



< 그림 326-2-10. 식물유래 제조 TEV endopeptidase 제품 포장 >

3-2-7. 식물유래 Anti-CCP 항체 생산기술 확립 및 효능검증

1. Anti CCP 항체 유전자 클로닝

- 연구수행기관 : 전북대학교

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) Anti-CCP 항체 유전자 확보

- ① Antibody isotyping
- ② cDNA 합성
- ③ CCP 항체 PCR
- ④ Library로부터 항체유전자 screening

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 제 2협동과제의 참여기관인 카톨릭의과대학 연구진에 의하여 단클론 항체 생산을 위한 하이브리도마를 확보하고 있으며 기능이 확인되어있음
- 류마티스 관절염에 대한 조기, 정밀 진단이 가능한 진단용 항체로 이용 가능함으로 류마티스 관절염 진단키트로 산업화가 가능함
- 본 연구는 식물에서 anti-CCP 항체를 생산하기 위하여 우선 anti-CCP 항체를 생산하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마로부터 anti-CCP 항체에 특이적인 유전자를 클로닝하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용

(3) Anti-Cyclic Citrullinated Peptide (CCP) 항체 유전자 클로닝

(가) 연구개발 수행내용

- ① Antibody isotyping
 - 카톨릭의대 주지현 교수님 연구팀으로부터 받은B hybridoma cell (12G1, anti-CCP를 생산)의 배양액을 이용하여 heavy chain과 light chain의 antibody isotyping을 하였다. Heavy chain antibody isotyping은 다음과 같은 ELISA를 사용하여 수행하였다. ELISA plate(NUNC)에 Goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 antibody를 각각 넣어 coating(4℃, overnight)한 후 Plate를 washing, 5% skim milk solution으로 Blocking한 다음 CCP hybridoma 배양액을 넣어 실온에서 2시간 배양하였다. Plate를 washing, anti mouse IgG-HRP를 넣고 실온에서 1시간 배양한 후 Plate를 washing, substrate를 넣어 실온에서 20~30분 정도 발색 반응 시킨 후 stop solution으로 반응을 종료한 후

Spectrophotometer(PACKARD)로 540nm의 파장에서 측정하였다. Light chain의 isotyping은 다음과 같은 방법으로 dot blot을 수행하였다. Nitrocellulose membrane에 CCP hybridoma 배양액을 소량 묻힌 후 5% skim milk solution으로 Blocking하였다. 각각의 anti-mouse kappa light chain alk phos와 anti-mouse lambda light chain alk phos를 처리 후 substrate를 넣어 발색 여부로 typing을 하였다.

② Anti-CCP 항체를 생산하는 hybridoma cell로부터 RNA 추출 및 cDNA 합성

- B hybridoma cell (12G1, anti-CCP를 생산)을 fresh over (노란색을 띄기 전 단계) 까지 키운 후 5×10^5 cell만을 수거하여 RNeasy Micro Kit (Qiagen)를 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. Spectrophotometer (Bio-rad, USA)를 이용하여 RNA 농도 및 purity를 확인한 후 cDNA Library Kit (Clontech, Takara Bio Company, USA)를 사용하여 다음과 같은 방법을 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 1-5 ug의 total RNA에 3'CDS primer를 섞은 후 72°C에서 3분 동안 처리하였다. 5× First-strand buffer, DTT, dNTP mix, Oligonucleotide, RNase inhibitor, reverse transcriptase등을 혼합하여 42°C에서 90분 동안 처리한 후 68°C에서 10분 동안 열을 가하여 반응을 종료하고 first-strand cDNA를 합성하였다.

③ CCP 항체 PCR

- BALB/c origin의 항체유전자로 알려진 염기서열에 해당하는 아래와 같은 다양한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. Heavy chain PCR을 위한 primer set: F: 5'-GGC ACC ATG GRA TGS AGC TGK GTM ATS CTC TT-3', F: 5'-GAG GTG AAG CTG CAG GAG TCA GGA CCT AGC CTG GTG-3', F: 5'-GGC ACC ATG RAC TTC GGG YTG AGC TKG GTT TT-3', R: 5'-CAT GGT CCC AGG CAT TGC TGG GTG CT-3'. Light chain PCR을 위한 primer set: F:5'- TGG CGT CCT GAA CAG TTG GAC TG-3', R: 5'-GGA TGG AAG CCC CAT GCT CAG CTT CTC-3', F: 5'-TGG CGT CCT GAA CAG TTG GAC TG-3', R: 5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3', F: 5'-GGC ACC ATG ATG AGT CCT GCC CAG TTC C-3', R: 5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3', F: 5'-GGC ACC ATG ATG AGT CCT GCC CAG TTC C-3', R: 5'-GGG GTC GAC ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA-3', F: 5'-GGC ACC ATG ATG AGT CCT GCC CAG TTC C-3', R: 5'-GGA TGG AGW CAG ACA CAC TCC-3', F: 5'-GGC ACC ATG ATG AGT CCT GCC CAG TTC C-3', R: 5'-GGA TGA GGT KCC YTG YTC AGY TYC-3'.

④ Library로부터 항체유전자 screening

- Heavy chain과 light chain의 DNA probe를 제작하여 mouse IgG1 heavy chain의

constant (CH2와 CH3)와 kappa chain의 PCR을 수행하였다. α -³²P로 표지한 Colony Blot Hybridization를 수행하여 X-ray film으로 develop 하여 positive signal을 나타내는 colony를 선발하였다. 선발된 콜로니로부터 DNA를 얻어 정제한 후 sequencing을 의뢰하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① B hybridoma cell에서 CCP 항체의 isotyping

- B hybridoma cell의 배양액을 이용한 antibody isotyping을 알아보기 위한 ELISA 결과 heavy chain은 IgG1 type으로 확인되었다 (표 327-1-1). Light chain은 dot blot결과 kappa chain임을 확인하였다 (그림 327-1-1).

< 표 327-1-1. ELISA를 이용한 heavy chain isotyping >

IgG1		IgG2a		IgG2b		IgG3	
0.899	0.881	0.200	0.218	0.146	0.093	0.387	0.348
0.917	0.734	0.181	0.123	0.081	0.114	0.327	0.396
0.827	0.662	0.211	0.216	0.114	0.121	0.332	0.318
0.615	0.416	0.230	0.253	0.124	0.144	0.255	0.300
0.453	0.317	0.149	0.265	0.119	0.152	0.248	0.263
0.338	0.307	0.212	0.182	0.128	0.141	0.214	0.227
0.233	0.255	0.211	0.208	0.147	0.148	0.183	0.215
0.182	0.132	0.207	0.214	0.134	0.177	0.170	0.151

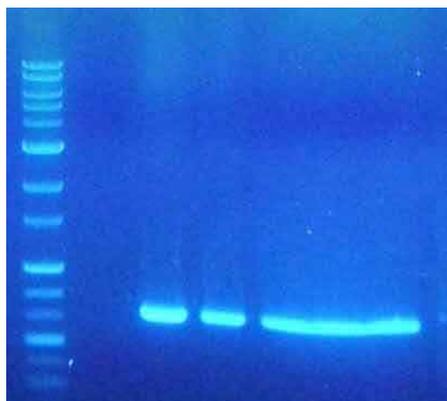


< 그림 327-1-1. Dot blot을 이용한 light chain isotyping >

② cDNA를 이용한 PCR

- BALB/c origin의 항체유전자로 알려진 염기서열에 해당하는 다양한 상기의 primer를 사용하여 PCR 수행하였다. Mouse Ig-Primer Sets로 PCR을 수행한 결과 PCR product 중 heavy와 light chain gene의 예상되는 길이와 맞는 산물을 얻었으며, cloning하여 sequencing하였으나 기존에 알려진 항체유전자와 matching되는 product가 없어, 보다 다양한 Primer로 실험하기 위하여 Mouse Ig Primer Sets (Novagen)을

구입하여 PCR을 수행하였다. Light chain의 경우 16개의 primer로 PCR하여 light chain으로 예상되는 유사한 크기의 밴드 3개를 얻었다 (그림 327-1-2).



< 그림 327-1-2. PCR을 이용한 light chain 산물 >

- 확인된 DNA band를 purify하여 pGEM T-EASY vector에 형질전환 시킨 후 *Eco* RI과 *Sal* I 제한효소 처리를 통하여 insert가 들어간 것을 확인하여 sequencing을 의뢰하였다. 다음과 같은 sequencing 결과를 확인하여 CCP 항체의 light chain의 클로닝이 성공적으로 이루어 졌다고 판단하였으며, 이후 본 연구에서 확보한 유전자를 이용하여 CCP 항체 고생산 식물체를 개발하였음 (그림 327-1-3).

```

ACGCGGATTCTATCGACTCCTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGG
CCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTACTAGTCGACATGAGGTAAGTCTCGGCTCAGT
TCCTTGAATCTTGTGCTCTGGTTTCCAGGTATCAAATGTGACATCAAGATGACCAC
GTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGC
GAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAGCTGGTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCC
TAAGACCCTGATCTATCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAG
TGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGA
TATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGG
CACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCA
TCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCT
ACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAAATGGCG
TCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCA
CCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCA
CTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGA
ATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGC
    
```

```
GTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCAT
GGTCATAGCTGTTTCCTGTGGGAAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAC
GAGCCGGAAGCATAAAGTGTAANCCCGGGGGGGCCTAATGAGTGAGCTACTCNCATT
AATTGCGTTGCGCTCANGGCCNGCTTTCAGTCNGGGAAACNTGTGCGNCGNANCTGC
ATTAATGAATCGNCCANNCNCGGGNAAAAGGCGGTTTGCCNANTGGGGCGCTTTT
CCGCTTTNCCCCTCAANNGANTCGGG
```

< 그림 327-1-3. Light chain sequencing 결과 >

- Heavy chain은 Ig-Primer Sets (15개 primer)을 사용하여 PCR 실험한 결과 확인하여 CCP 항체의 heavy chain의 클로닝이 성공적으로 이루어 졌다고 사료되어 진다 < 그림 327-1-4).

```
TNACGGGGAAACCCGGCGAACGTNGCGAAAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGC
GGNCGNTAGGGCGCTNGCAAGNGTAGCGGTCACGNTGGGNGTNACCNCCCACACCC
CGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGNGCGTCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAAC
TGTTGGAAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGG
GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGT
TGAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCG
ACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGGCCGCGGAATTCGATTAGCAGCACCAAG
GTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGGCATAAACAACT
GTGATCCGTGTCCCTCTCCACAGTCCCTGAACACACTGACTTTCTCCATGGGAATGGAGT
GGGGTCTTTATCTTTCTCTTGTTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAGTTGC
AGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGG
CTTCTGGATACGGCTTCACTAACTACTGGCTCGGTTGGATAAAGCAGAGGCCTGGAC
ATGGACTTGAGTGGATTGGAGATATTTACCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATG
AGAAGTTCAAGGGCAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCGAGCACAGTCTATA
TGCAGCTCAGTAGCCTGACATCTGAAGACTCTACTGTCTATTTCTGTGCAAGAGAGG
GGGAATTACTACGGCTCCGTACCCGTTTGGTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA
CTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGC
TGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGA
GCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCAATCACTAGTGAAATTCGCGGC
CGCCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGT
ATTCTATAGTCACNAAAG
```

< 그림 327-1-4. Heavy chain sequencing 결과 >

2. CHO 발현을 통한 anti CCP 항체 유전자 항체형성 확인

○ 연구수행기관 : 전북대학교

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(3) Anti-CCP 항체 발현

① anti-CCP 항체클론을 CHO세포에 transfection

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

○ 본 연구를 통하여 클로닝 한 anti-CCP 항체 유전자가 정상적으로 anti-CCP 항체를 생산하는지 확인하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용

(3) Anti-Cyclic Citrullinated Peptide (CCP) 항체 유전자 클로닝

(가) 연구개발 수행 내용

① Plasmid DNA 준비

○ pGEM T easy vector에 삽입되어 있는 CCP antibody 유전자(heavy와 light chain)를 mammalian cell(CHO cell)에 transfection하기 위하여 pcDNA3.1 vector로 삽입 후 plasmid DNA를 준비하였다.

② pcDNA3.1-CCP antibody DNA의 CHO-K1 세포로의 transient transfection

○ Transfection 하루 전에 24 well plate에 well당 4×10^4 cell/0.5 ml(배지: RPMI-1640, 10% FBS) 농도로 세포를 접종하여 준비하며, transfection 당일 cell density가 confluent 상태의 70~80%가 되도록 하여야 함. Serum free Opti-MEM medium(100ml)에 2mg의 plasmid DNA를 넣고 잘 mix한 후 Lipofectamine 2~5ml를 넣어 부드럽게 mix하여 DNA-Lipofectamine complex가 형성되도록 상온에 5분 동안 반응시킴. 배지를 제거하고 신선한 배지 0.5 ml을 추가한 다음 DNA-Lipofectamine complex (100ml)를 넣고 배양용기를 전후좌우로 부드럽게 rocking한 후 37°C CO₂ incubator에서 1~3일 정도 배양함. 배양 후 culture supernatant를 수확하여 항원에 대한 반응성을 ELISA를 이용하여 확인하였음.

③ 항체 생산 및 생산된 항체의 검정을 위한 ELISA

○ ELISA plate에 CCP 혹은 CRP 단백질을 각 well에 넣어 plate를 coating(4°C, overnight). Plate를 세척하고 5% skim milk solution으로 blocking을 시행한 다음 CCP 항체유전자를 transfection시킨 세포배양액 혹은 control CCP 항체 생산 hybridoma 배양액을 넣은 후 상온에서 2시간동안 반응시킴. Plate를 세척하고, anti-mouse

IgG-HRP를 넣은 후 상온에서 1시간동안 반응시킴. Plate를 세척하고 substrate를 추가하여 상온에서 20~30분 정도 발색 반응을 진행시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시킴. Spectrophotometer로 430nm의 파장에서 흡광도를 측정.

(나) 연구결과 및 고찰

① CCP 항체 생산 및 생산된 항체의 검정을 위한 ELISA

○ CCP antibody 유전자를 transfection시킨 CHO-K1 세포의 배양액에서 수확한 culture supernatant를 반응시켰을 때 CCP 단백질을 검출함을 확인하여 항체유전자의 기능성을 확인할 수 있었음. 비교 대조군으로 사용한 CRP 단백질은 CCP와 유사성을 가지지만, 항체에는 반응하지 않는 peptide로서 항체의 반응성 오류를 확인하기 위하여 사용하였으며, CCP 항체 유전자를 transfection시킨 CHP-K1 세포 배양액에 존재하는 항체에 의하여 검출되지 않아 실험 결과를 확인 할 수 있었음 (표 327-2-1).

< 표 327-2-1. 생산된 항체 검정을 위한 ELISA >

CCP coated well		CRP coated well		Hybridoma culture supernatant	
1.293	1.181	0.190	0.211	0.516	0.493
0.932	0.914	0.189	0.223	0.735	0.695
0.652	0.667	0.215	0.217	Negative control	
0.392	0.416	0.236	0.258	0.124	0.244

3. 고발현 식물 viral vector를 이용한 Anti CCP 항체의 대량생산 및 항원 결합능력 확인

○ 연구수행기관 : 전북대학교

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) Anti-CCP 항체 고발현 식물 viral vector 벡터 구축 및 생산확인

- ① CCP 항체의 고발현 식물벡터로 클로닝
- ② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환
- ③ 분자생물학적 분석을 통한 항체 확인 (Western blot analysis)

(2) 효과적인 transient expression system 구축

- ① CCP 항체의 고발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축
- ② 분자생물학적 분석 (SDS-PAGE와 Western blot analysis)
- ③ Affinity chromatography를 이용한 anti-CCP 항체의 정제 및 항원 결합능력 확인

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 본 연구를 통하여 클로닝 한 anti-CCP 항체 유전자가 CHO 배양을 통하여 정상적으로 항체를 형성하고 항원을 인식함을 확인하였음
- 본 연구는 류마티스 관절염에 대한 조기, 정밀 진단이 가능한 진단용 항체로 이용 가능한 anti-CCP 항체를 식물 viral vector를 이용하여 대량생산하기 위한 기술을 개발하고자 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용

(1) Anti-CCP 항체 고발현 식물 viral vector 벡터 구축 및 생산 확인

(가) 연구개발 수행 내용

① CCP 항체의 transient expression vector에 클로닝

- 본 연구를 통하여 확보된 CCP 항체의 heavy chain (pMYD316)을 TMV vector에 삽입하여 pMYD316-1이라고 명명하고 PVX vector에 삽입하여 pMYD316-11라 명명하였다. 선행연구 결과 확보된 CCP 항체의 light chain (pMYD315)을 TMV vector와 PVX vector에 각각을 삽입하여 pMYD315-1과 pMYD315-11로 명명하였다.

② Electroporation을 이용한 Agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환

- Electrocompetent agrobacteria cell을 만들기 위하여 agrobacteria (strain GV3101)을 50 mg/L rifampicin이 첨가된 5 ml의 LB medium에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후 agrobacteria 만을 수거하여 항생제를 제거하기 위하여 차갑게 준비된 500ul의 10% glycerol을 이용하여 2번 washing 하였다. Pellet에 차갑게 준비된 100 ul의 10% glycerol로 resuspension 한 후 25 ul를 취하여 미리 차갑게 준비된 EP tube에 분주하여 electrocompetent cell을 준비하였다.
- 25 ul의 electrocompetent cell에 상기에서 준비된 1 ul의 plasmid DNA를 첨가한 후 미리 차갑게 준비된 cuvette에 mixture를 넣고 ice에서 5분간 방치하였다. GenePulser를 이용하여 1800 kV, 25 uF 그리고 200 Ω 조건하에서 형질전환을 수행하였다. 형질전환된 electrocompetent cell을 EP tube에 옮긴 후 신선한 1ml의 LB 배지를 첨가한 후 28°C에서 2-3시간 암 상태에서 현탁배양 하였다.
- 형질전환 된 세포를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에

도말하여 28℃에서 2-3일 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 항생제가 첨가된 배지에서 형성된 단일 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출 한 후 제한 효소 처리로 상기의 유전자들이 성공적으로 도입된 것을 확인하였다.

③ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYD315-I, II 그리고 pMYD316-I, II가 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28℃, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재 현탁하였다. Agrobacterium 현탁액은 OD600에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe을 이용하여 infiltration을 수행하였다.
- Syringe를 이용한 direction injection은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*의 잎의 뒷면에 박테리아 현탁액을 주사기 바늘 없이 주사기로 주입함으로써 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 PVX based vector에 삽입되어 있는 light chain 그리고 PVX based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 TMV based vector에 삽입되어 있는 light chain의 혼합 박테리아 현탁액은 각각의 조건당 2개의 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 ℃, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 11일 동안 성장하였고, infiltration 후 5,8 그리고 11일에 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리하였다.

④ 분자생물학적 분석 (SDS-PAGE와 Western blot analysis)

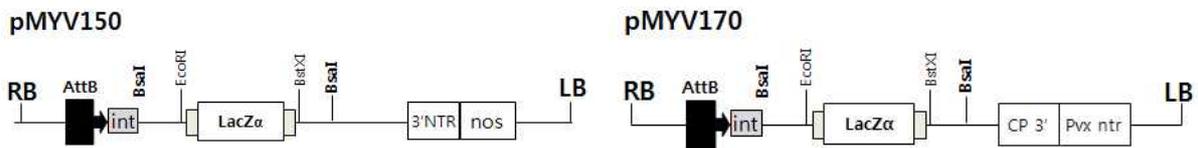
- Anti-CCP 항체의 발현을 확인하기 위하여 시간별로 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 μg의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 non-reducing condition에서 10 % 와 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 poly acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다.
- Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1%Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 Anti-mouse IgG (whole) alkaline phosphatase conjugated (A3562, Sigma), anti-mouse IgG (γ-chain specific) alkaline phosphatase conjugated (A3438, Sigma) 그리고 monoclonal anti-mouse kappa light chain (K2132, Sigma) 등을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:7,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였다.

TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

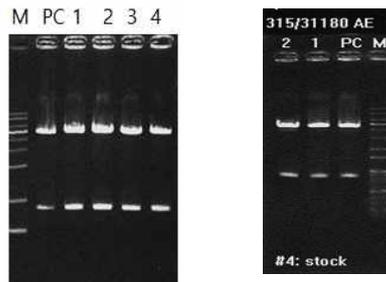
(나) 연구결과 및 고찰

① Anti-CCP 항체의 transient expression vector에 클로닝

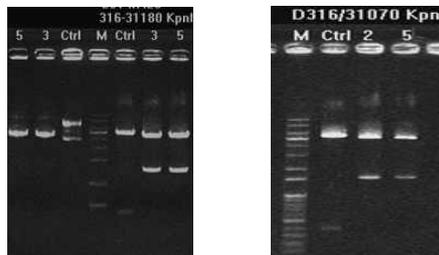
○ TMV based vector인 pMYV150 (그림 327-3-1)에 선행연구결과 확보된 CCP 항체의 heavy chain과 light chain 각각을 Bsa I site를 이용하여 삽입하여 pMYD316-I과 pMYD315-I으로 명명하였으며, PVX based vector인 pMYV170(그림 327-3-1)에 CCP 항체의 heavy chain과 light chain을 각각 삽입하여 pMYD316-II와 pMYD315-II로 명명하였다 (그림 327-3-2, 327-3-3). 각각의 E. coli균주는 agrofiltration을 위해 agrobacterium (strain GV31010)에 형질전환 하였다.



< 그림 327-3-1. 연구에 사용된 TMV based vector (pMYV150)와 PVX based vector (pMYV170) >



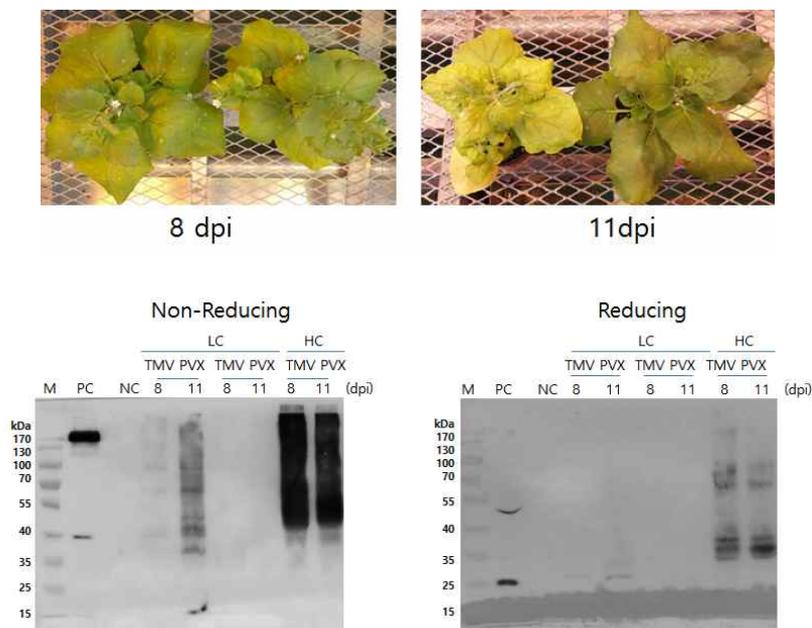
< 그림 327-3-2. Monoclonal CCP antibody의 light chain 유전자의 TMV based vector (pMYV150)와 PVX based vector (pMYV170)로의 클로닝 >



< 그림 327-3-3. Monoclonal CCP antibody의 heavy chain 유전자의 TMV based vector (pMYV150)와 PVX based vector (pMYV170)로의 클로닝 >

② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환 및 Western blot analysis를 이용한 발현 확인

○ 온실에서 4-6주 정도 자란 *N. benthamiana* 식물체를 이용하여 anti-CCP 항체의 heavy chain과 light chain의 발현을 확인하기 위하여 주사바늘을 제외한 주사기를 이용하여 잎 뒷면에 아그로박테리아 혼합 현탁액을 주입하였다. TMV based vector에 각각 삽입된 light chain (pMYD315-1)과 heavy chain (pMYD316-1) 그리고 PVX based vector 삽입된 light chain (pMYD315-11)와 heavy chain (pMYD316-11) 의 각각의 아그로박테리아를 infiltration을 수행한 후 8일과 11일째 잎을 수확하여 단백질 분석을 수행하였다. 그 결과 reducing condition에서 대략 25 kDa의 light chain과 대략 55 kDa에서 heavy chain이 발현된 것을 확인하였으며, non-reducing condition에서 light chain과 heavy chain 각각이 assembly를 형성하는 것을 확인하였다 (그림 327-3-4). 본 실험 결과를 통하여 monoclonal antibody CCP의 light chain과 heavy chain이 *Nicotiana benthamiana*에서 안정적으로 발현되는 것을 확인하였다.



< 그림 327-3-4. *N.benthamiana*에서 monoclonal antibody CCP의 heavy chain과 light chain의 발현 확인 >

(2) 효과적인 transient expression system 구축

(가) 연구개발 수행내용

① CCP 항체의 고발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축

○ 3차년도에 확립된 anti-CCP항체 고발현 조건을 이용하여 아그로박테리아를 50mg/L

rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재현탁 하였다. Agrobacterium 현탁액은 OD600에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe를 이용하여 infiltration을 수행하였다.

- Agroinfiltration은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*를 이용하여 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 heavy chain(pMYD316)과 TMV based vector에 삽입되어 있는 light chain(pMYD315), PVX based vector에 삽입되어 있는 heavy chain(pMYD322)과 PVX based vector에 삽입되어 있는 light chain(pMYD321), TMV based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 PVX based vector에 삽입되어 있는 light chain 그리고 PVX based vector에 삽입되어 있는 heavy chain과 TMV based vector에 삽입되어 있는 light chain의 혼합 박테리아 현탁액은 각각의 조건당 2개의 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 7일 동안 성장하였고, 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리 및 western blot을 통해 분석함으로써 이것의 발현수준 및 assembly를 확인하였다. 가장 높은 H2L2 whole antibody 발현률을 보이는 PVX-LC, TMV-HC를 이용하였을 때 heavy chain과 light chain이 가장 높은 발현률을 보이는 시간을 결정하기 위해 infiltration 후 5, 7, 9일 째 되는 날에 잎을 수확하여 단백질을 분리 하였다. 또한 Anti-CCP 항체 의 고 발현을 위한 아그로박테리아 현탁액의 농도를 결정하고자 OD600에서 0.3, 0.6 그리고 0.9로 맞춘 후 infiltration을 수행하였다. Vacuum을 이용한 vacuum infiltration은 전체 식물체를 화분에 있는 흙이 쏟아지지 않게 고정된 후 화분을 뒤집어서 5L의 상기의 아그로박테리아 혼합액에 잠기도록 한 후 -90 kPa에서 1분 동안 vacuum을 걸어서 현탁액 안에 있는 기포를 빼준 후 재빨리 vacuum을 대략 -10 kpa 까지 잠근다. 이때 아그로박테리아 현탁액이 식물체의 잎 안으로 침투되는 것을 육안 으로 확인 할 수 있다. Vacuum에 의해 infiltration 된 식물체는 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 배양되었고, 3,5,7 그리고 9일째 식물의 잎을 수확하여 최대 항체 생산 시기를 결정하기 위한 분석에 사용하였다.

② 분자생물학적 분석 (SDS-PAGE와 Western blot analysis)

- Anti-CCP 항체의 발현을 확인하기 위하여 시간별로 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 µg의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 non-reducing condition에서 10 % 와 reducing condition에서의 12% 의 각각의 poly acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다. Western blot analysis를

수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 Anti-mouse IgG (whole) alkaline phosphatase conjugated (A3562, Sigma), anti-mouse IgG (kappa-chain specific) alkaline phosphatase conjugated (SAB3701215, Sigma) 그리고 anti-mouse IgG (gamma-chain specific) alkaline phosphatase conjugated(A3438, Sigma) 등을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:7,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

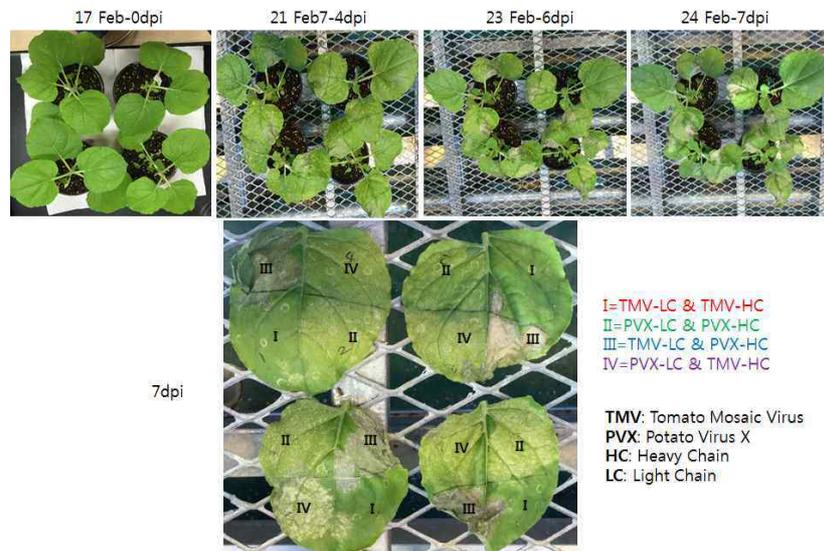
③ Affinity chromatography를 이용한 anti-CCP 항체의 정제

- Anti-CCP 항체를 생산하는 담배와 벼 현탁배양으로부터 샘플을 준비한 후 거름종이로 filtration하여 soup을 분리하여 동결건조 한 후 PBS buffer에 녹여서 sodium phosphate buffer로 투석 하였다. 투석을 한 후에 배양액을 Protein G column (GE Healthcare)을 장착한 BioLogic LP, chromatography system (BIO-RAD)을 이용하여 다음과 같은 방법으로 정제하였다. Column을 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 washing 한 후 sample을 loading하고 다시 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 washing 하였다. Sample을 washing한 후에 항체 단백질을 분리하기 위하여 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7)를 이용하여 elution 하였다. 항체단백질을 elution 한 후에 용액의 pH를 중성으로 맞추기 위해 미리 준비해놓은 1 M Tris-HCl (pH 9.0)을 1/10 volume 넣은 tube에 elute를 섞고 정제된 항체는 fraction 별로 SDS-PAGE과 Western blot analysis를 수행하였다.

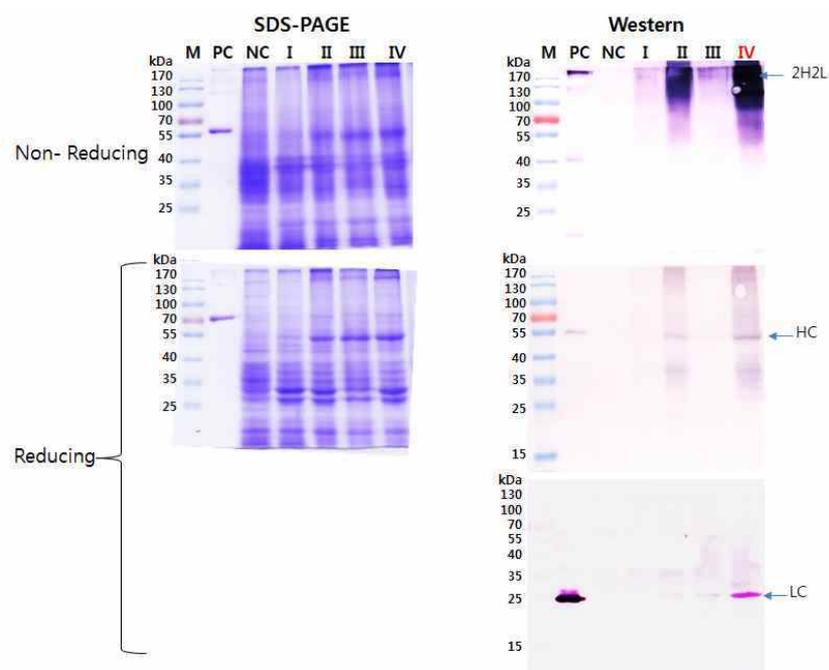
(나) 연구결과 및 고찰

① Vector 조합에 따른 anti-CCP항체의 발현 수준 확인 및 assembly 확인

- Anti-CCP항체의 생산에 있어 최적인 vector의 조합 및 이때의 항체 assembly 여부를 알아보기 위하여 pMYD316, 315, 322 그리고 321를 각각 조합하여 Heavy chain과 light chain의 발현에 이용하여 보았다. 동일 조건에서 infiltration 및 7일째 되는 날에 수확하여 단백질을 추출 및 western blot을 통해 각각의 anti-CCP항체 발현 수준을 비교하였다. 그 결과 PVX based vector에 삽입된 heavy chain (pMYD322)과 TMV based vector에 삽입된 light chain (pMYD315) 조합을 이용하였을 때 식물체에 심각하지 않은 영향을 미치면서 가장 높은 수준의 H2L2형태의 anti-CCP항체가 발현됨을 확인하였다 (그림 327-3-5, 327-3-6).



< 그림 327-3-5. Vector 조합에 따른 식물체에의 영향 >

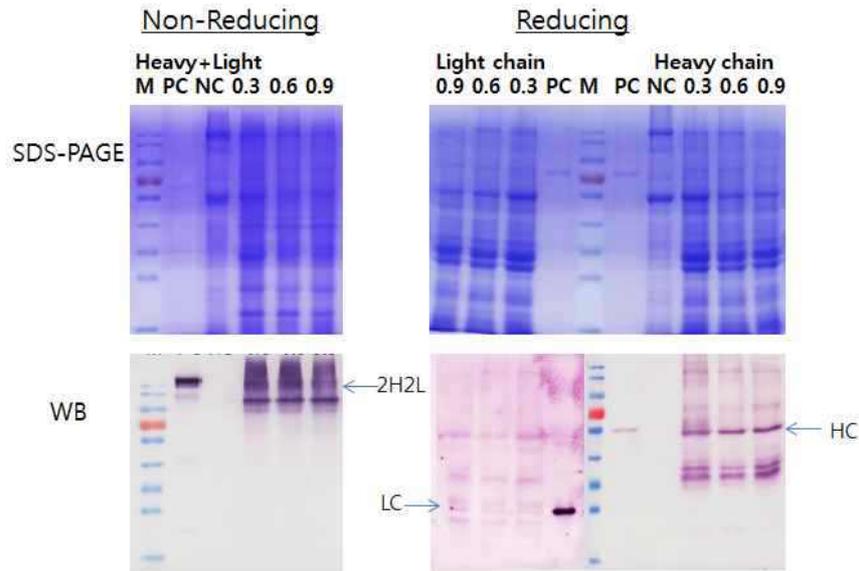


< 그림 327-3-6. Vector 조합에 따른 anti-CCP 항체의 발현 수준 및 assembly 확인 >

② Anti-CCP 항체의 고 발현을 위한 최적 아그로박테리아 현탁액 농도 확인

○ Anti-CCP 항체의 고 발현을 위한 효과적인 infiltration 법을 선별하기 위한 실험에서는 PVX based vector에 삽입된 heavy chain (pMYD322)과 TMV based vector에 삽입된 light chain (pMYD315) 조합을 선택하였다. 아그로박테리아 현탁액의 농도를 OD600

0.3, 0.6 그리고 0.9로 맞춘 후 syringe를 이용하여 담배 잎 뒷면에 agroinfiltration을 수행하고 5, 8 그리고 11일째 잎을 수확하여 SDS-PAGE 와 Western blot analysis를 수행하였다. 그 결과 아그로 박테리아 현탁액 농도 OD600 0.3에서 H2L2의 CCP whole antibody 비율이 상대적으로 높게 나타나는 것을 확인 하였다 (그림 327-3-7).

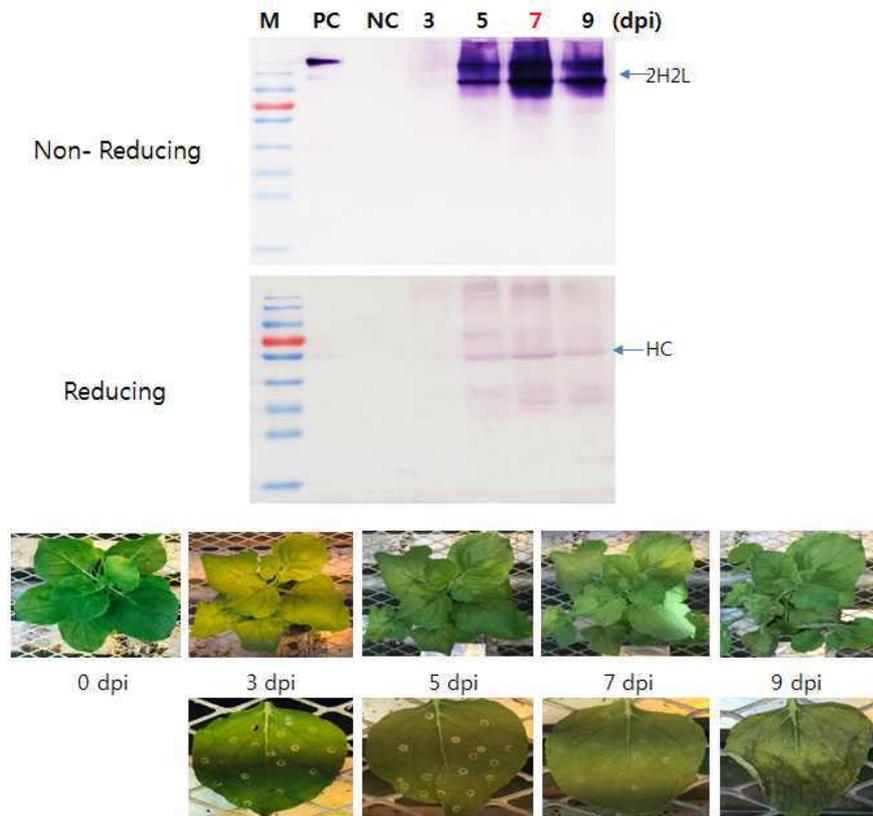


< 그림 327-3-7. 아그로 박테리아 현탁액 농도에 따른 anti-CCP항체의 고발현 조건 확립 >

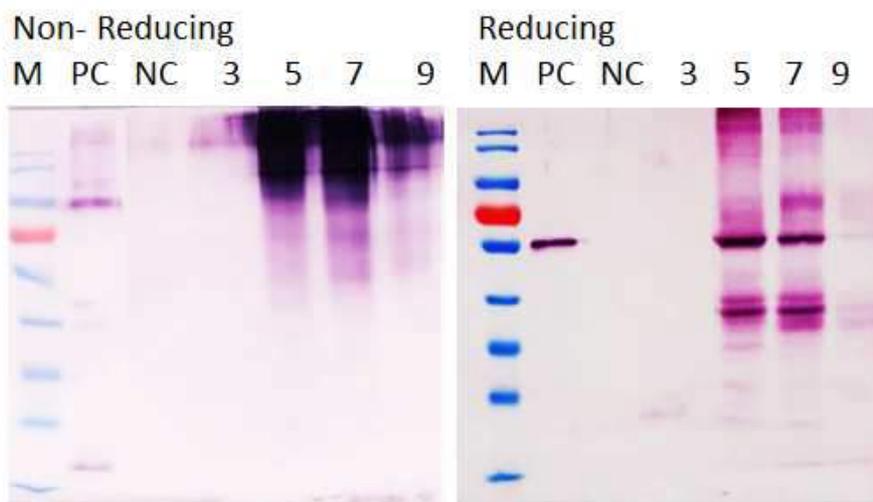
③ Anti-CCP 항체의 고 발현 시기 결정

○ Anti-CCP 항체의 고 발현을 위한 아그로박테리아 현탁액 농도를 OD600 0.6으로 결정한 후 대량 생산을 위한 식물체 확보를 위해 vacuum infiltration을 위한 조건을 잡기 위해 PVX based vector에 삽입된 heavy chain (pMYD322)과 TMV based vector에 삽입된 light chain (pMYD315) 조합을 선택하여 Anti-CCP 항체가 최대 생산되는 시기를 결정하는 실험을 수행하였다. 4-6주 정도 자란 *N.benthamiana* 식물체를 이용하여 syringe infiltration을 수행한 후 3, 5, 7 그리고 9일 동안 배양 한 후 시간별로 식물체를 수확하여 최대 발현량을 확인하기 위한 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다 (그림 327-3-8). 아그로박테리아 현탁액의 농도가 OD600 0.3에서 Agroinfiltration을 수행한 후 식물체의 상태를 확인 한 결과 배양 7일 이후 부터는 식물체의 잎이 노화되는 현상이 관찰되었다. Western blot analysis를 수행한 결과 Anti-CCP 항체의 발현이 5일 이후부터 증가하기 시작하였으며, 7일째 최대 발현량을 보이는 것을 확인하였다. 반면, vacuum infiltration시에는 5일에서 7일보다 높은 수준의 Heavy chain과 Light chain이 확인되었고, H2L2 조건에서는 5일과 7일에서 거의 유사한 양으로 확인되었다 (그림 327-3-9). 이에 따라 Anti-CCP 항체의 대량 생산을 위한 agroinfiltration 조건으로는 아그로박테리아 현탁액 농도 OD600 0.3에서 vacuum

infiltration 후 5일째 식물들을 수확하는 방법을 이용하는 것이 바람직하다고 사료된다.



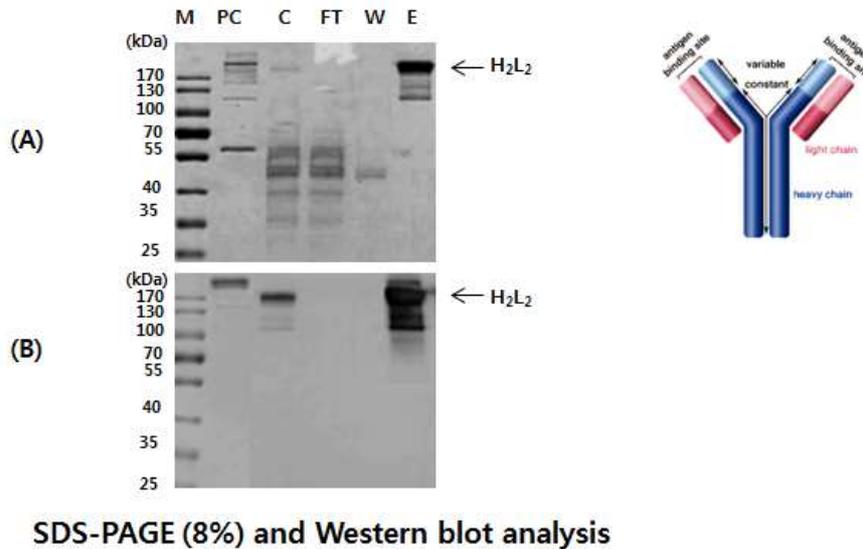
< 그림 327-3-8. Agroinfiltration 후 배양 시간에 따른 anti-CCP항체의 고발현 조건 확립 >



< 그림 327-3-9. vacuum infiltration 후 배양 시간에 따른 anti-CCP항체의 고발현 조건 확립 >

④ 식물유래 anti-CCP항체의 정제 과정 확립

- 선행연구결과 확립된 고 발현 조건을 따라 형질전환 벼 현탁배양 세포를 당이 없는 배지에서 9일 동안 배양한 후 배양액을 수거하여 proteinG affinity chromatography를 이용하여 식물 유래 anti-CCP 항체를 분리 정제하였다. Non-reducing 상태에서 SDS-PAGE를 수행한 결과 whole assembly 형태의 2H2L의 anti-CCP 항체가 대략 85% 순도로 분리 정제 된 것을 확인하였다 (그림 327-3-10).

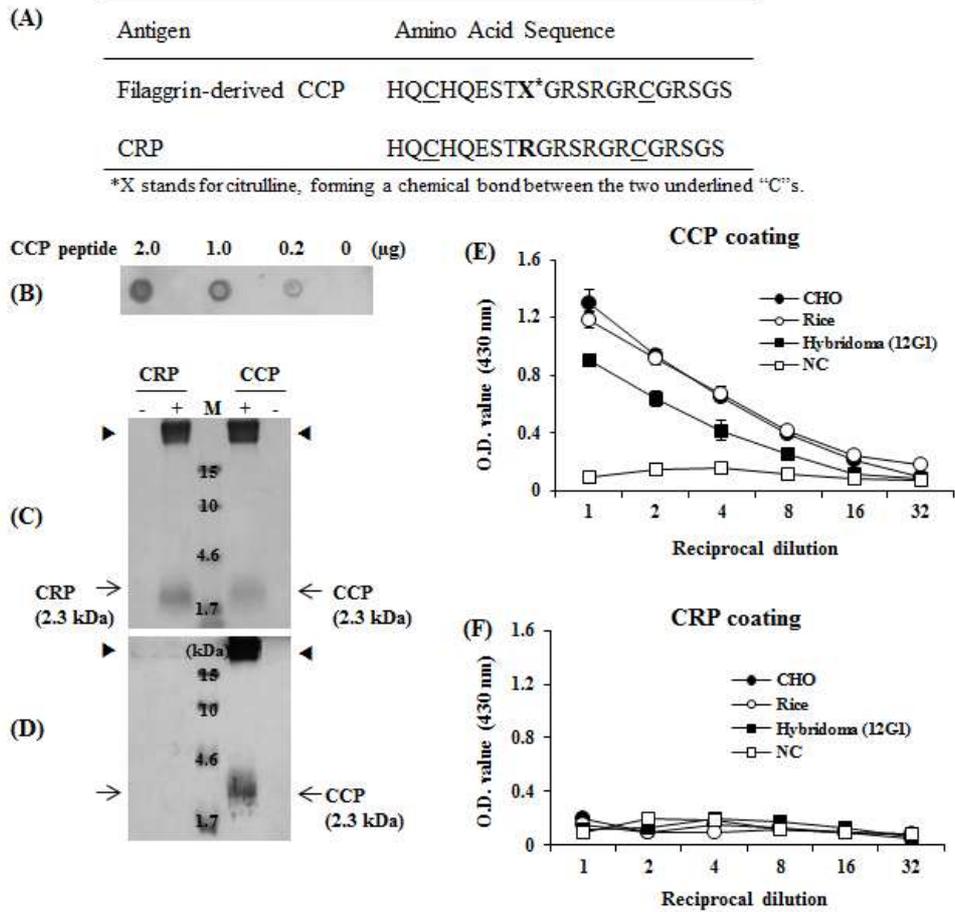


< 그림 327-3-10. Protein G affinity chromatography를 이용한 식물유래 anti-CCP항체의 분리정제 >

② 식물 유래 anti-CCP 항체의 항원과의 결합력 확인

- ProteinG affinity chromatography를 통해 분리정제 된 식물유래 anti-CCP 항체를 filaggrin 유래의 합성 CCP 펩타이드 (Girbal-Neuhauser E et al., 1996)와 그의 대조군인 CRP 펩타이드와의 결합력을 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하여 확인하였다 (그림 327-3-11A, B, C 그리고 D). SDS-PAGE를 수행하기에 적합한 CCP 펩타이드의 양은 Dot blot을 통하여 대략 2 μ g으로 결정되었으며, 식물유래의 정제된 anti-CCP 항체를 일차 항체로 사용하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행한 결과 식물유래 anti-CCP 항체가 항원으로 사용한 합성 CCP 펩타이드와 결합하여 대략 2.3kDa에서 밴드가 나타나는 것을 확인하였다. 반면 CRP 펩타이드와는 결합하지 않는 것을 확인하였다 (그림 327-3-11C 와 D). 또한 ELISA를 통하여 두 개의 플레이트에 하나는 CCP펩타이드로 코팅을 하고 다른 하나는 CRP 펩타이드로 코팅을 한 후 제2협동 위탁기관인 카톨릭의대 주 지현 교수 연구실로부터 받은 12G1 hybridoma cell culture medium (Kim Y et al., 2015), anti-CCP항체 유전자가 형질전환 된 CHO 세포 배양액과 식물유래 anti-CCP 항체를 일차 항체로 반응시켰을 때 대조구로 사용한

PBS버퍼에서는 반응이 나타나지 않았지만 상기의 세 가지 조건에서 항원과 반응하는 것을 확인하였다 (그림 327-3-11E와 F). 위와 같은 결과는 식물유래 anti-CCP 항체를 관절염 초기 진단을 위한 키트 제작에 항체로 사용될 수 있음을 시사한다.



< 그림 327-3-11. 식물유래 anti-CCP항체와 항원과의 결합력 확인 >

3-2-8. 식물유래 PNGase A 생산기술 확립

1. 벼 현탁세포를 이용한 PNGase A 생산기술 개발

- 연구수행기관 : 한국생명공학연구원, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) 고발현을 위한 PNGase A 유전자의 코돈 최적화

- ① Almond PNGase A 유전자의 코돈 최적화 및 유전자 합성

(2) PNGase A 발현벡터 제작 및 형질전환

- ① 벼 현탁세포 특이적 프로모터를 이용한 PNGase A 고발현 식물발현벡터의 제작
- ② 토양균을 이용한 벼 형질전환
- ③ 분자생물학적 분석을 통한 고발현 세포주의 선발

(3) PNGase A 고발현 형질전환체 확보

- ① 분자생물학적 분석에 의한 고발현 세포주의 선발
- ② 현탁세포의 유도

(4) 식물유래 PNGase A의 생화학적 분석:

- ① PNGase A 활성 분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 최근 바이오시밀러연구와 분자농업 연구의 관심이 높아지면서 식물유래 및 곤충세포유래 당단백질의 구조분석 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있음
- 식물유래 당단백질 당구조상 Fucose와 Xylose를 포함하고 있으므로 미생물 유래 PNGase F에 의하여 절단이 되지 않아 반드시 식물유래 효소인 PNGase A를 사용하여야 절단이 됨(Altman et al., 1998, Eur. J. Biochem. 252, 118-123)
- 상기와 같이 수요가 급격하게 증가하고 있는 단백질이나 현재는 전량 아몬드에서 추출하여 사용하므로 매우 고가(30만원/1mIU) 이므로 재조합 단백질로서의 생산이 이루어지는 즉시 산업화가 가능하다고 판단됨
- 본 연구는 식물 viral vector를 이용하여 PNGase A의 생산기술을 개발하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) 고발현을 위한 PNGase A 유전자의 코돈 최적화

(가) 코돈 최적화 PNGaseA 유전자 분석 및 합성

- PNGaseA 유전자를 단자엽 고발현 시스템인 벼에서 발현하기 위하여 유전자 분석을 수행하였다. 본 연구에서 목적으로하는 PNGaseA 유전자는 쌍자엽식물인 Almond 유래이며, 단백질 발현 시스템으로는 단자엽 식물인 벼를 사용하고 있다. 일반적으로 종이 다른 경우에는 사용하는 codon usage의 차이에 의해, 벼에서 낮은 빈도로 사용되는 codon usage가 목적 유전자에 사용되었을 경우, 그 유전자의 단백질 발현 효율 또는 정밀도가 낮아진다고 보고되어 있으므로, PNGaseA의 codon usage를 확인해보았다. 벼에서 사용되어지는 codon usage는 <http://www.kazusa.or.jp/codon/> 의 database에서 제공하는 *Oryza sativa* 데이터를 참고하여 분석하였다.
- 그림 328-1-1에서 볼 수 있듯이 치환되어야 하는 염기서열은 붉은색으로 표시하였다. 그 결과, 낮은 사용빈도의 codon은 전체 mature peptide codon 571개중 250 로, 이는 전체 codon의 약 43.7%에 해당되었다.
- 설계가 완료된 아래의 염기를 바탕으로 유전자를 합성하였다

```

GAG CCA ACA9 CCA CTC18 CAT27 GAG ACA CCA36 CCA ACA45 ITC ITC54 GTC ACC63
CCT ATC GAA72 GTG CCT81 ACC AAG90 CCG IGT ICC CAG CTC ATC99 CTC CAG CAT108
ITC GCC TAC117 ACA TAT126 CAA GCT CCA135 GTC ITC144 AAC TAC153 CCT CCT162
GAC IGT171 CCG180 ICT CAG189 ITC ICC198 ACC207 ATC GTC216 GAA IGG225 GCT ACC234
AGA CCG243 ACG252 CAG ITC261 GAT AAG270 ATC ITC279 GGT GTG288 TGG CTC297 GGT GGT306 GTT GAG315 ATC324
CTC AAG ACG333 TGC ACA GCA342 GAA CCA AGA351 CCT AAT360 GGC ATC369 GCT GTC378
AAG GAC387 ATC396 ACA AAG405 TAC414 CCA AAG423 AAC CAG432 GCT ACT441 GGC450
TAT CTT GGC459 AAC IIG468 ATC477 GAC AAG486 CTT TAT495 CAT GTG504 AAC513 ATC522
AGC CTT CAT531 ITC TAC CCT540 GGC AAG549 AAG IIG558 AAT ICT567 CAG CAG576 AAG585
GAC AAC594 GGC ICT603 TAC CAC612 TGG GCT621 IIG ATC630 CCA ATC639 CCT648
AGG AAT CTS657 CCG IIG666 AAT GAC675 GGC IIG684 IGG ITC693 GAT CAG702 AAT711
ACG GAG720 IIG AAG GAG729 ITC AAG ATT738 CAG AAT747 GCT GTG756 GCT765
ACG GAG774 IIG AAG GAG783 ITC AAG ATT792 CAG AAT801 GCT GTG810 IIG819
GTG TAT828 ITC837 ITC GAG AAT846 GAG ITC855 TAC ICA864 CTT CCI873 AAC882
GAG TAC891 GCT GCC900 AAC CTC909 ACG ACA CCA918 GGC AAT927 GGC CCT936 ITC945
GAG GTG954 GTC AGC963 CTT GAT GGT972 GAG GTG981 GCA GTC990 CCT1000 ITC1009
GAG GTG1018 GTC AGC1027 GAT GGT1036 GTG GTT1045 GCA GTC1054 CCT1063 ITC1072
GTG ATC1081 ACT GGA1090 ATC AAT1099 CTC IIG1108 AGA CCA1117 ITC ACT1126 GGC1135
GGC ICA ITC1144 GAT CTT1153 CCG ACT TAC1162 GAT ATC1171 GAG ATC1180 ACA CCA1189
ATC IIG1198 GAT GGC1207 AAG ACG1216 CAC AAG1225 GGC ITC1234 AAT1243 GTC ACA1252
GTC IGG1261 TAC GTC1270 GAT GAT1279 AAC IIG1288 CTT IGG1297 CAG AAG1306 ACA1315
ACT GAA1324 AAG CTC1333 AAG CAT1342 AAG ITC1351 GGC ITC1360 GTC ITC1369
ITC GAC1378 ITC1387 AAC GGT1396 IIG1405 AAG GGC1414 ACA ITC1423 IIG1432 GTC ACA1441
ICA ITC1450 ACC GGA1459 IGG GTG1468 AAG ICT1477 TAT GGC1486 AAC ATC1495 ACA1504
CAG GAC1513 ITC1522 IAC IAC1531 ACG1540 AAC ICA1549 GTC CTC1558 AAG GAT1567 GGC1576
ATC GTC1585 AAC1594 CAG AAG1603 ATC ITC1612 AAC1621 GAC ITC1630 TAC1639 ATC1648
ITC TAC1657 CAC ICA1666 ACC ICA1675 CCG1684 AAG ACC1693 ITC CCA1702 CTC1711 IIG1720
GAC ITC1729 GGA CAA1738 AAT GGC1747 ACC1756 TAC IIG1765 ATC1774 ACC1783 GTG GAC1792
GGA ITC1801 ATC1810 GAG AAG1819 AAG1828 ICT1837 GGC1846 ITC1855 AAC1864 GTC1873 CTC1882
CTG AAG1891 ACG1900 GGC GAG1909 AAC ATG1918 GTC AAG1927 AAC1936 IIG1945 GTC1954
IIG GAG1963 ACG1972 ACC CAG1981 CAG1990 ATC1999 TAC2008 GGT2017 GGT2026 AAG2035
AAG AAC2044 ATC2053 ACG2062 AAC TAC2071 ACC2080 ATC2089 CTC2098 TAC2107 GAC2116
TGC AAC2125 AAG2134 AAG2143 ITC2152 ACC2161 AAC2170 GAC2179 ITC2188 GTC2197
ITC GGC2206 GCG2215 CCG2224 ATG2233 AAC2242 ITC2251 GCT2260 CTC2269 CCG2278 ITC2287 ACC2296

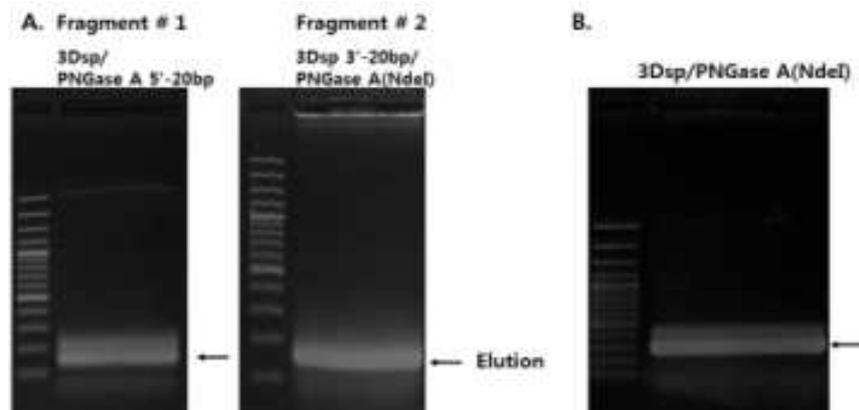
```

< 그림 328-1-1. 벼 코돈에 최적화를 위한 PNGaseA 유전자 설계 (적색은 고발현 코돈으로 치환한 내역임) >

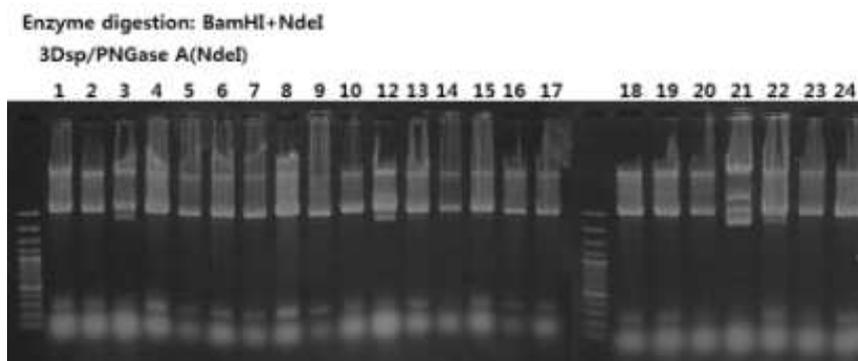
(2) PNGase A 발현벡터 제작 및 형질전환

(가) RAmy3D signal peptide(3Dsp)/PNGase A(NdeI) construct 제작

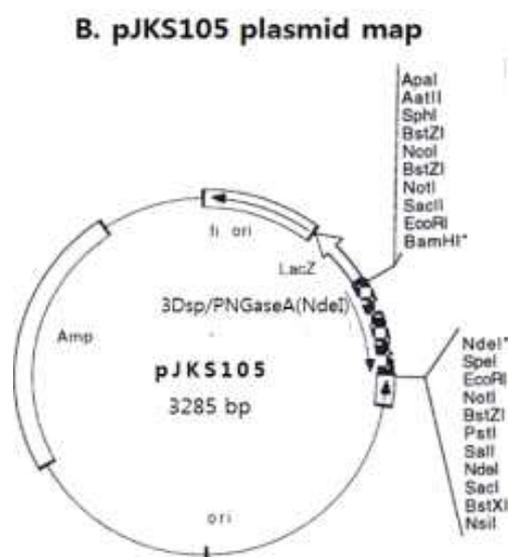
- N-glycanase (PNGase)는 Asn에 결합한 당단백질의 N-glycan 당 사슬을 가수분해 하는 효소이다 (Suzuki et al., 2016). 식물 특이적 당 사슬인 B(1,2)-xylose와 a(1,3)-fucose가 존재하는데 PNGase F (N-glycosidase F)는 대부분의 당 사슬을 탈당화 유도하는 효소이지만 N-acetylglucosamine에 연결된 a(1,3)-fucose는 탈당화를 유도하지 못한다 (Tarentino et al., 1985). 반면 아몬드 유래 PNGase A는 이에 대한 탈당화가 가능하다 (Tretter et al., 1991).
- Overlap PCR을 통한 RAmy3D signal peptide (3Dsp)/PNGase A(NdeI)/construct 제작
 - 본 실험에서는 벼 현탁세포 배양을 통해 아몬드 유래 PNGase A 단백질을 배지내로 분비시켜 고발현 시키고자 하였다. 아몬드 유래 PNGase A sequence를 먼저 벼에 대하여 codon optimization을 수행한 후, 3'-region에 His6 tag과 KpnI enzyme site를 포함한 1740bp에 대하여 Genotech에 유전자 합성을 의뢰하여 유전자를 확보 하였다. 확보한 RAmy3D signal peptide (3Dsp)와 PNGase A(NdeI)단편을 fusion 시키기 위해 각각의 단편들을 overlap PCR을 수행하여 3Dsp/PNGase A 5'-20bp, 3Dsp 3'-20bp/PNGase A(NdeI) 2개의 단편을 제작하였다 (그림 328-1-2A).
 - 각각의 band를 elution 하여 fusion 시키기 위해 2cycle PCR을 수행 후 생성된 product를 PCR 증폭을 하여 279bp에 해당하는 3Dsp/PNGase A(NdeI) 단편을 확보하였다 (그림 328-1-2B). T-vector에 ligation 후 TOP10에 transformation하여 취득한 24개의 white 콜로니로부터 DNA를 추출 후 BamHI/NdeI으로 제한효소 처리한 결과, 약 300bp에서 band가 확인 되었고 (그림 328-1-3) 그 중 6개의 colony(#4,6,8,18,19,24)를 취하여 sequencing을 의뢰하여 cloning 여부를 확인하였다. 그 결과 콜로니 4번, 6번, 8번이 sequence가 100% 일치하는 것을 확인 하였고 콜로니 4번을 pJKS105라 명명하였다 (그림 328-1-4).



< 그림 328-1-2. 3Dsp/PNGase A(NdeI) 단편 확보를 위한 클로닝 >



< 그림 328-1-3. 3Dsp/PNGase A(NdeI) 유전자 식물 발현벡터 제작 >

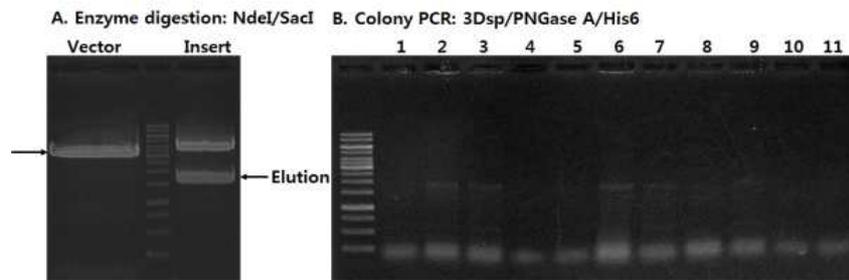


< 그림 328-1-4. 3Dsp/PNGase A(NdeI) 유전자가 삽입된 plasmid >

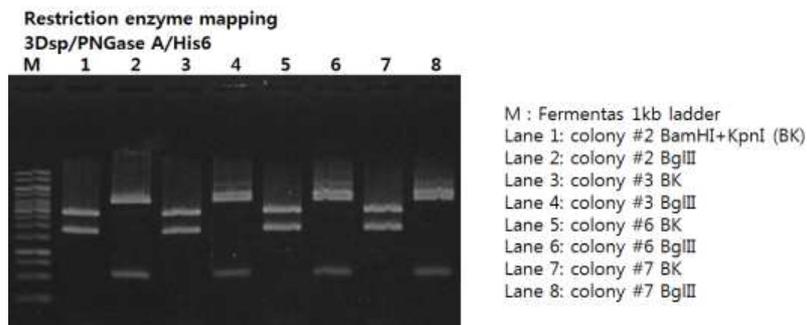
(나) RAmy3D signal peptide(3Dsp)/PNGase A/His6 construct 제작

- 3Dsp/PNGase A(NdeI) fragment 3'-region 부분부터 나머지 PNGase A와 His6을 붙이기 위해 PNGase A와 His6이 포함되어 있는 pJKS104로부터 (NdeI)PNGase A/His6을 NdeI+SacI으로 제한효소 처리를 하여 1620bp 크기의 fragment를 확보하였고, vector로 사용되는 pJKS105 plasmid의 PNGase A(NdeI) 3'-region을 NdeI+SacI으로 제한효소 처리하여 fragment를 확보 하였다 (그림 328-1-5A). 각각의 vector fragment와 insert fragment를 ligation 수행한 뒤 TOP10에 형질전환 하였다. 항생제가 포함된 배지에서 자란 콜로니 11개를 colony PCR을 수행하여 콜로니 2번, 3번, 6번, 7번, 9번에서 약 1887bp의 band가 확인되었다 (그림 328-1-5B). 이 중 2번, 3번, 6번, 7번 콜로니를 취하여 BamHI+KpnI(3Dsp/PNGase A/His6 유전자 배열 확인)과 Bgl II(PNGase A 유전자

삽입 확인)의 2가지 방법으로 제한효소 처리하여 각각 3015bp/1887bp, 612bp의 band를 확인하였고 (그림 328-1-6), 콜로니 2번을 pJKS106이라 명명하였다 (그림 328-1-7).

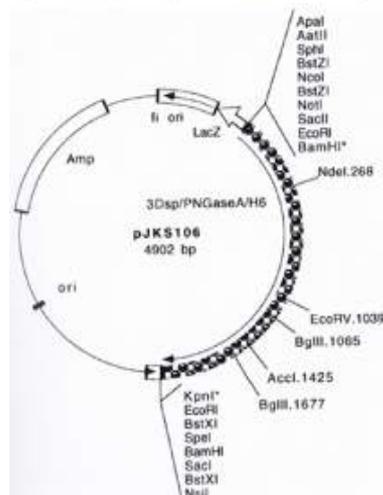


< 그림 328-1-5. 3Dsp/PNGase A/His6 단편 확보를 위한 클로닝 >



< 그림 328-1-6. 3Dsp/PNGase A/His6 유전자 식물 발현벡터 제작 >

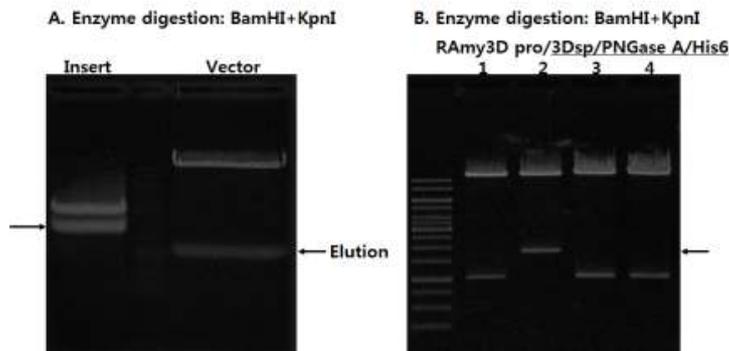
pJKS106 plasmid map



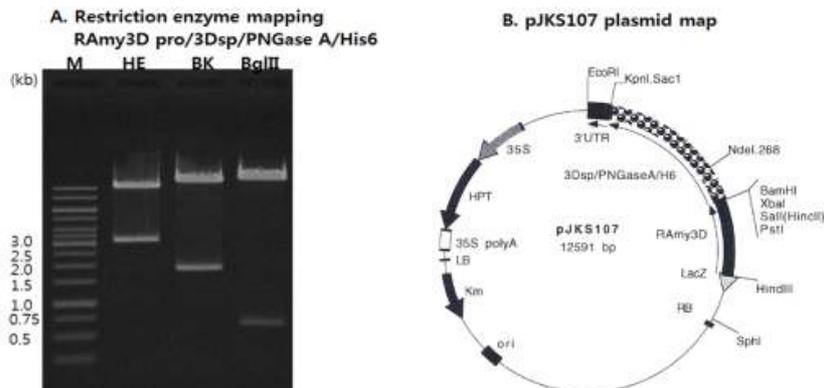
< 그림 328-1-7. 3Dsp/PNGase A/His6 유전자가 삽입된 plasmid >

(다) RAmy3D promoter를 포함한 3Dsp/PNGase A/His6 construct 발현 벡터 제작

○ 목적 유전자의 고발현 유도를 위하여 RAmy3D promoter를 사용하고 RAmy3D signal peptide(3Dsp)를 사용하여 목적단백질의 분비 효율을 더 높이기 위하여 RAmy3D promoter/3Dsp/PNGase A/His6 construct를 제작하고자 하였다. Vector로 사용된 pCAMBIA1300-based plasmid와 insert로 사용된 pJKS106 plasmid DNA를 BamHI+KpnI으로 제한효소 처리한 후 각각의 band를 gel elution 하였다 (그림 328-1-8A). Ligation을 수행하고 TOP10에 형질전환 한 후, 총 4개의 항생제 저항성 콜로니를 획득했다. 콜로니 선별을 하기 위해 BamHI+KpnI으로 제한효소 처리한 결과, 콜로니 2번이 약 1.9kb에 해당하는 band를 확인 하였고 (그림 328-1-8B) 2번 콜로니에 대하여 최종 선별을 위해 제한효소 mapping을 수행하였다. HindIII+EcoRI(RAmy3D promoter/3Dsp/PNGase A/His6/3'UTR 유전자 배열 확인)과 BamHI+KpnI(3Dsp/PNGase A/His6 유전자 삽입 확인), 그리고BglII(PNGase A 유전자 확인)의 3가지 방법으로 제한효소 처리 결과, 각각 3260bp, 1887bp, 612bp로 일치하는 크기의 band를 확인하였고 (그림 328-1-9A), 콜로니 2번을 pJKS107이라 명명하였다 (그림 328-1-9B).



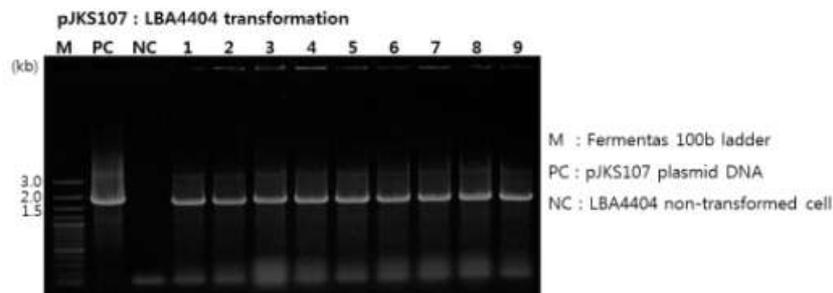
< 그림 328-1-8. RAmy3D promoter/3Dsp/PNGase A/His6 단편 확보를 위한 클로닝 >



< 그림 328-1-9. RAmy3D promoter/3Dsp/PNGase A/His6 가 삽입된 식물 발현 벡터 >

(라) 식물발현벡터 (pJKS107)의 *Agrobacterium* 형질전환

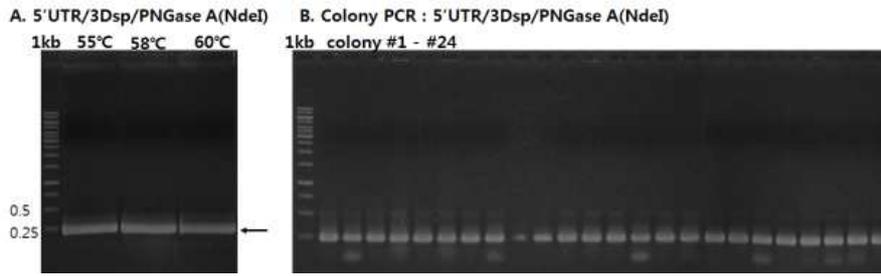
- 상기 확보한 pJKS107 식물발현 벡터를 tri-parental mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 형질전환 하였으며 리팜피신과 카나마이신이 포함된 배지에서 자란 9개의 콜로니를 선별하기 위해 colony PCR을 수행하였다. Positive control은 pJKS107 plasmid DNA를 사용하였고 negative control은 LBA4404 non-transformed cell을 사용하였다. 3Dsp/PNG F와 PNG(H6) R1 primer로 annealing temp: 53°C 28cycle의 조건으로 colony PCR 선별을 한 결과, 콜로니 #1-9 모두 PNGase A에 해당하는 band를 확인하였고 (그림 328-1-10), 콜로니 3번을 pJKS107(LBA4404)라 명명하였다.



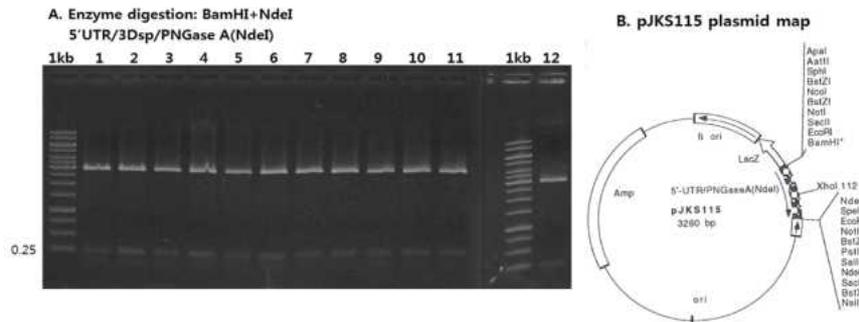
< 그림 328-1-10. RAmy3D promoter/3Dsp/PNGase A/His6(pJKS107)의 LBA4404 형질전환 >

(마) 5'UTR/3Dsp/PNGase A(NdeI) construct 제작

- PNGase A translation의 효율을 더욱 높이기 위해 3Dsp/PNGase A/His의 5'-region에 untranslation region을 추가 도입하는 과정을 수행 하였다. 위에 언급되었던 pJKS106 (3Dsp/PNGase A/His6)의 plasmid DNA를 template로 이용하여 annealing 온도를 55°C, 58°C, 60°C 3가지 조건으로 PCR 한 결과, 5'UTR/3Dsp/PNGase A (NdeI)에 해당하는 크기의 band를 확인 하였다 (그림 328-1-11A). 이 band를 gel elution을 통해 정제 한 후 ligation을 수행하고 TOP10에 형질전환을 하였다.
- 항생제 저항성을 가진 총 24개의 white 콜로니를 획득하여 PCR확인 결과, 모든 콜로니에서 5'UTR/3Dsp/PNGase A(NdeI) 유전자에 해당하는 크기의 band를 확인 하였고 (그림 328-1-11-B), #1-12 콜로니를 amp 항생제가 첨가된 LB배지에 5ml culture를 하였다. 각각의 콜로니로부터 추출한 DNA를 BamHI+NdeI 제한효소를 처리한 결과, 모든 콜로니에서 5'UTR/3Dsp/PNGase A(NdeI)에 해당하는 band를 확인하였고 (그림 328-1-12A) 임의로 2번, 4번, 9번, 10번, 11번, 12번 콜로니의 plasmid DNA를 sequencing 의뢰하였다. 그 결과 모든 6개 cell line에서 sequence가 일치 하였고 이 중 9번 콜로니를 pJKS115라 명명하였다 (그림 328-1-12B).



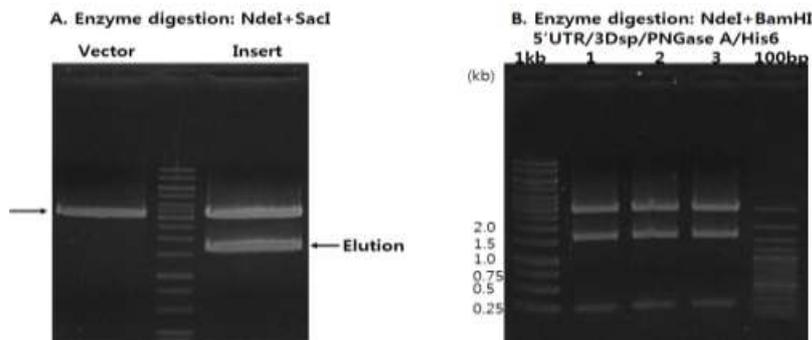
< 그림 328-1-11. 5'UTR/3Dsp/PNGase A(NdeI) 단편 확보를 위한 클로닝 >



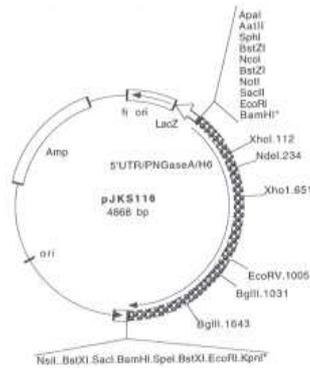
< 그림 328-1-12. 5'UTR/3Dsp/PNGase A(NdeI) 유전자가 삽입된 plasmid >

(바) 5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 construct 제작

○ pJKS115 plasmid의 5'UTR/3Dsp/PNGase A(NdeI)와 앞에 언급되었던 pJKS106의 PNGaseA/His6을 fusion 시키기 위해 제한효소 처리된 pJKS115(NdeI/SacI)를 vector로 사용하고 pJKS106 (NdeI/SacI)을 insert로 사용하였다 (그림 328-1-13A). 각각의 fragment를 ligation 수행하고 TOP10에 형질전환 후, 항생제가 포함된 배지에서 자란 콜로니 3개를 취하여 NdeI+BamHI(5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6) 유전자 삽입 확인, 234bp, 1619bp) 제한효소를 처리하여 클로닝 여부를 확인하였다. 그 결과 콜로니 1번, 2번, 3번 모두 band 크기가 234bp와 1619bp에 일치함을 확인하였고 (그림 328-1-13B), 콜로니 1번을 pJKS116이라 명명하였다 (그림 328-1-14).



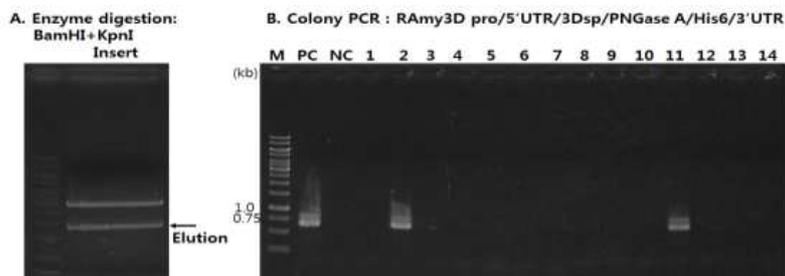
< 그림 328-1-13. 5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 단편 확보를 위한 클로닝 >



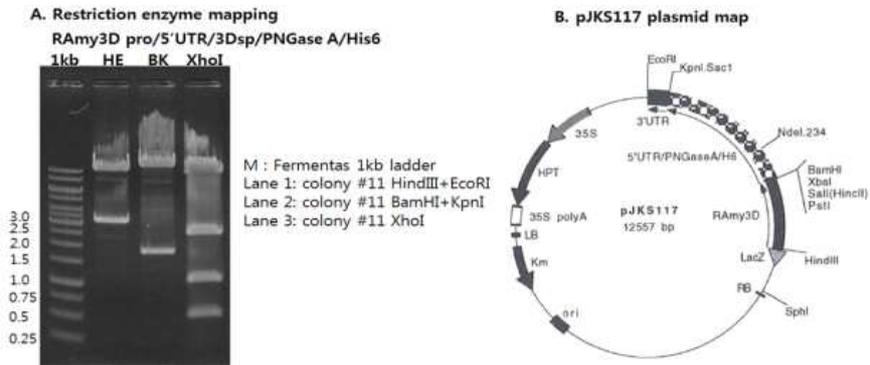
< 그림 328-1-14. 5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 유전자가 삽입된 plasmid >

(사) RAmy3D promoter를 포함한 5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 construct 발현 벡터 제작

- 목적 단백질 translation의 높은 효율을 위해 제작된 5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 fragment를 이미 언급되었던 목적 유전자의 고발현 유도를 위하여 RAmy3D promoter와 3'UTR이 포함되어 있는 pCAMBIA1300-based 식물 발현벡터에 클로닝하고자 하였다. Vector로 사용된 pCAMBIA1300-based plasmid와 insert로 사용된 pJKS106 plasmid DNA를 BamHI+KpnI으로 제한효소 처리한 후 각각의 band를 gel elution 하였다 (그림 328-1-15A). Ligation 수행하였고 TOP10에 형질전환 후, 총 14개의 항생제 저항성 콜로니를 획득했다. 콜로니 PCR을 수행하여 14개의 콜로니 중, 2번, 11번 콜로니가 해당 크기에 band가 확인 되어 1차 선별 하였다 (그림 328-1-15B). 임의로 11번 콜로니를 선택하여 restriction enzyme mapping을 하여 유전자 삽입 여부를 최종 확인하기 위하여 HindIII+EcoRI(RAmy3D promoter/5'UTR/PNGase A/His6/3'UTR 유전자 배열 확인, 3227bp), BamHI+KpnI(5'UTR/PNGase A/His6 유전자 삽입 확인, 1853bp), XhoI(PNGase A 삽입 확인, 539bp, 1077bp)의 3가지 방법으로 제한효소 처리결과, 각각 해당하는 크기의 band를 확인하였고 (그림 328-1-16A), 콜로니 11번을 pJKS117이라 명명하였다 (그림 328-1-16B).



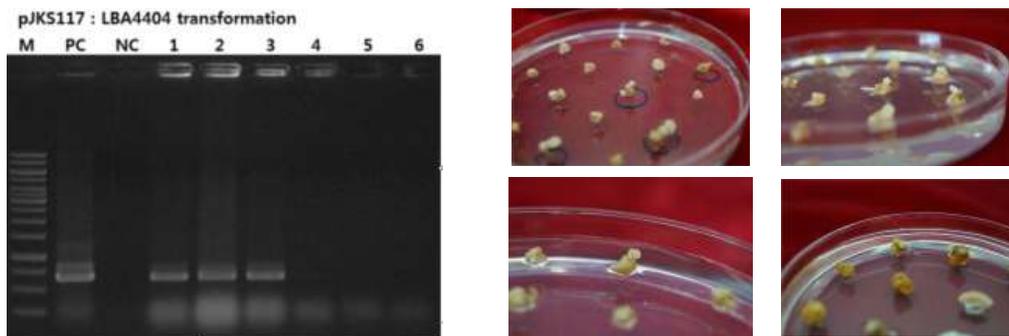
< 그림 328-1-15. RAmy3D pro/5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 단편 확보를 위한 클로닝 >



< 그림 328-1-16. RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 가 삽입된 식물 발현 벡터 >

(아) 식물발현벡터 (pJKS117)의 *Agrobacterium* 형질전환

○ 상기 확보한 pJKS117 식물발현 벡터를 tri-parental mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 형질전환 하였으며 리팜피신과 카나마이신이 포함된 배지에서 자란 6개의 콜로니를 선별하기 위해 colony PCR을 수행하였다. Positive control(PC): pJKS117 plasmid DNA, negative control(NC): LBA4404 non-transformed cell을 사용하였고 5'UTR/3Dsp F primer와 PNG(XhoI) R primer를 사용하여 annealing temp: 58°C 25cycle의 조건으로 colony PCR을 수행하였다. colony PCR로 선별한 결과, 콜로니 #1-4에서 5'UTR/3Dsp/PNGase A (XhoI)에 해당하는 약 660bp크기의 band를 확인하였고 (그림 328-1-17) 콜로니 1번을 pJKS117 (LBA4404)라 명명하였다.



< 그림 328-1-17. RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6(pJKS107)의 LBA4404 형질전환(좌)과 항생제 포함 배지에서의 형질전환 캘러스 선발(우) >

(3) PNGase A 고발현 형질전환체 확보

(가) 연구수행 내용

① Total RNA extraction & cDNA synthesis

○ *Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환 방법을 사용하여 hygromycin B가 첨가된 배지에서 유도된 벼 캘러스를 선별하였고 Tri-regent와 액체질소를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 150ul DEPC water에 RNA pellet을 녹인 후 농도를 측정하였고 그 결과를 바탕으로 30ug의 RNA에 DNase를 37°C에서 40분간 처리하였다. 순수한 RNA를 추출하기 위하여 phenol extraction & EtOH precipitation을 수행하였고, Purified RNA pellet을 40ul DEPC water에 녹이고 nanodrop으로 농도를 측정하였다. 1ul purified RNA를 template로 하여 oligo-dT primer를 첨가해 70°C에서 5분간 denaturation을 실시하고 ice에 5분간 fixing 하였다. 그리고 Promega의 1st strand cDNA synthesis kit를 이용해서 annealing temp: 25°C 5min, synthesis temp: 42°C 1hr, RTase inactivation temp: 70°C 15min의 조건으로 cDNA를 합성하였다.

② Northern blot analysis

○ 벼 캘러스로부터 Tri-regent 방법으로 추출한 total RNA를 사용하여 RNA level에서 고발현 PNGase A elite line을 선별하기 위해 Northern blot analysis를 수행하였다. 각각 20ul의 total RNA를 formaldehyde gel에 40 volt로 3시간정도 loading하여 gel lea는 18S, 28S RNA를 확인하기 위해 EtBr staining을 수행하였고 다른 1ea gel은 positive charged nylon membrane에 transfer를 수행하였다. Membrane에 Transfer RNA는 PNGase A probe를 사용하여 hybridization을 수행하였고 1시간~4시간의 exposure time 조건으로 PNGase A RNA 발현 분석을 진행 하였다.

③ Quantitative real-time PCR

○ 추가적으로 *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 획득한 캘러스 중에서 RNA level에서 고 발현 PNGase A elite line을 선별하기 위해 real-time PCR (qPCR) 방법을 수행하였다. 각각의 합성된 cDNA 1ul를 template로 사용하였고, normalized expression level을 확인하기 위한 reference gene으로는 벼 actin 유전자(GeneBank: X15865.1)를 사용하였다. Actin은 forward: 5'-AGC TTC CTG ATG GAC AGG TTA TC-3', reverse: 5'-ACC ACT GAG AAC GAT GTT GCC-3'primer를 이용하여 증폭하였고, PNGase A는 PNGase A(qPCR)_F: 5'-TAA CGA GTA CAT CGC TGC CAA C-3', PNGase A(qPCR)_R: 5'-AAT GGT GTG ATC TCG ATA TCG TAA G-3'을 이용하여 증폭하였다. Real-time dye는 SYBR Green을 사용 하였고, PCR 조건은 Pre-denaturation은 95°C 15min이며 denaturation 95°C 10sec, annealing 54°C 15sec, synthesis 72°C 30sec를 총 50cycle로 하여 3반복으로 분석을 진행하였다.

④ Suspension culture

○ Northern blot analysis 와 Real-time PCR을 통해 선별된 pJKS117 #1, #12, #14, #16,

#18, #22, #23, (2)#1, (2)#2 9개 callus line과 pJKS107 #1, #2, (2)#2, (2)#4, (2)#6, (2)#8 6개 callus line으로부터 PNGase A 단백질의 분비를 유도하기 위한 적합한 캘러스를 유지 및 증식하기 위하여, cell suspension culture를 수행 하였다. 30g/L sucrose, 2mg/L, 2,4-D, 0.2mg/L kinetin, 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지 (N6SE)에 pJKS117, pJKS107 line callus를 넣고 28°C에서 150rpm으로 암배양을 수행하였다. 1주일 후 어느 정도 자란 callus를 mesh망을 이용하여 잘게 sieving을 하여 새로운 N6SE배지에 액체 배양을 하였다. 1주일 간격으로 계대 배양을 수행 하면서 항생제 포함 배지에서 캘러스 입자의 굵기가 잘게 유지하면서 증식을 유도하였다. 잘게 유도된 벼 캘러스를 무균상태에서 진공펌프를 이용하여 기존 배양액(N6SE)을 제거하고 D.W로 washing 후에 sucrose가 결핍된 N6-S 배지를 10ml/g 비율로 접종하고 당 결핍 상태로 28°C에서 150rpm으로 1주일간 암배양을 수행하였다. 배지내로 분비된 PNGase A 단백질을 분석하기 위하여 각각의 배양액을 취한 뒤 12,000rpm에서 30분간 원심분리를 한 상등액으로 단백질 분석을 진행하였다.

⑤ Antibody 제작

- Western blot analysis를 통해 벼 캘러스로부터 분비된 PNGase A 단백질을 분석하기 위해 PNGase A 항체를 제작 하였다. NCBI에서 PNGase A (UniProtKB/Swiss-Prot: P81898.2) database를 이용하여 펩타이드 분석을 하고 가장 적합한 항체 특이적인 site를 분석하였다. Rabbit를 이용하여 세 번의 In Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)를 거쳐서 항체가 포함된 serum과 purified PNGase A antibody를 제작하였다 (Pro sci사).

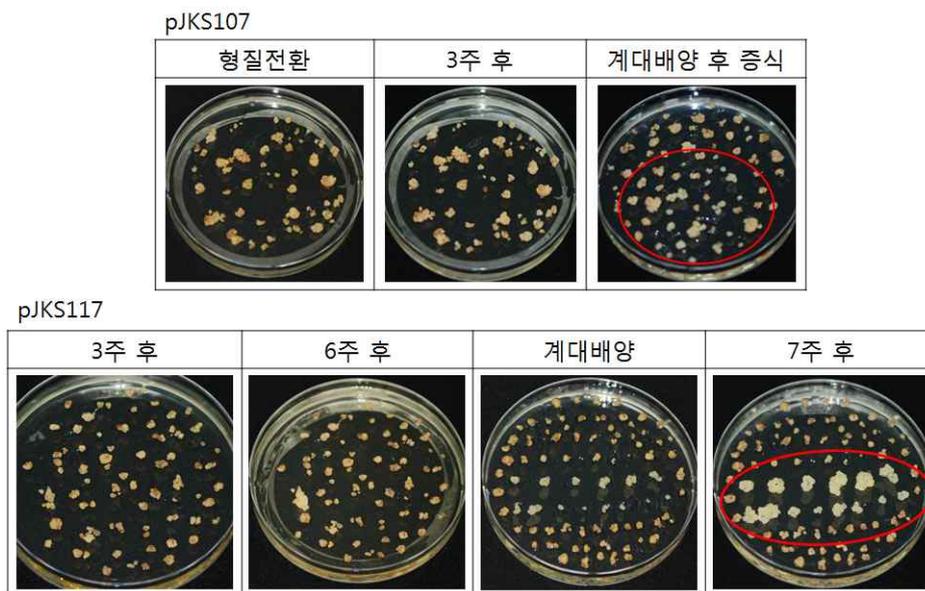
⑥ SDS-PAGE & western blot analysis

- 당 결핍 배양에서 취한 배양액을 SDS-PAGE & western blot analysis를 위한 재료로 사용하였다. 각각의 캘러스로부터 분비된 40ul의 배양액을 12% TGX PAGE-Gel (Bio-rad)에 200v로 전기영동을 실시하였다. 전기영동 한 gel 1개는 coomassie blue 염색약을 넣어서 SDS-PAGE analysis 실시하였고, 나머지 gel은 PVDF western blotting membrane (03 010 040 001, roche)에 200mA로 90분간 transfer 하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 5% skim milk로 RT에서 40분간 3회 blocking 하고 0.1% tween 20이 첨가된 TBS buffer (TBST)로 15분간 3회 세척 한 후 1차 항체인 His-prove rabbit polyclonal IgG (Santa cruz, H-15)와 제작한 PNGase A antibody를 1차 항체로 사용하여 4°C에서 O/N 하였다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, 2차 항체로 His와 PNGase A 1차 항체는 모두 anti-rabbit IgG AP (Santacruz)를 2차 항체로 사용하여 4°C에서 2시간동안 반응시켰다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, NBT/BCIP (Roche)용액으로 PVDF membrane을 detection하여 PNGase A 단백질을 확인 하였다.

(나) 연구결과

① *Agrobacterium*-mediated plant transformation

- 형질전환을 위한 준비과정으로 종피를 제거한 동진벼를 70% 에탄올에 표면소독을 하고, 3% sodium hypochloride에 10분씩 3회 소독, N6배지(sucrose 30g, casamino acid 0.3g, proline 0.5g, 2,4-D 2mg/l)에 10개씩 치상하여 벼 캘러스를 유도하였다. 3~4주 후 유도된 캘러스만 동일 배지에 옮겨준 후 3일간 28℃에서 암배양을 하였고, 3일 뒤 벼 캘러스와 PNGase A가 도입된 식물발현벡터 pJKS117, pJKS107 (LBA4404)을 공동 배양을 수행하기 위해 100uM acetosyringone이 포함된 N6CO배지에 3일간 25℃에서 암배양 하였다. 벼 캘러스를 250mg/l cefotaxime 용액에 세척한 다음 500mg/l cefotaxime, 50mg/l hygromycin이 포함된 N6SE 배지에 치상하였다. 첫 번째 selection 배지에 치상했던 캘러스는 두 번째 selection 배지에 모두 옮겨주었고, 세 번째 selection 배지로 옮길 때 새로 자란 캘러스들만 옮겨주었고, 이 때 항생제 저항성을 나타내는 캘러스 라인을 선별 하였다 (그림 328-1-18).



< 그림 328-1-18. pJKS107, pJKS117 벼 캘러스 형질전환 후 증식과정 >

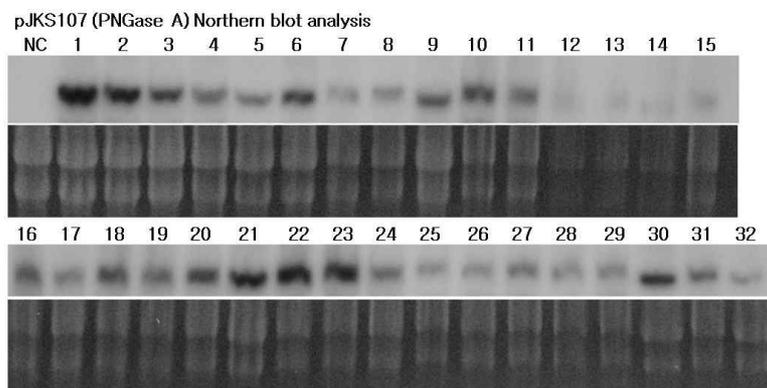
② 3Dsp/PNGase A/His6 (pJKS107) 고발현 형질전환체 선별

- *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 확보된 항생제 저항성 캘러스를 이용하여 mRNA에서 PNGase A 유전자 발현 확인을 위한 Northern blot 분석을 수행하였다. 총 32개의 3Dsp/PNGase A/His6 (pJKS107) cell line에서 total RNA를 추출하였다. 각각 추출된 total RNA를 nanodrop으로 농도를 측정 하였다 (그림 328-1-19).

Sample	ng/ul	Sample	ng/ul
N75	851.71	S107-17	1197.94
S107-01	805.14	S107-18	1061.79
S107-02	756.37	S107-19	818.77
S107-03	1466.19	S107-20	847.38
S107-04	1285.39	S107-21	1283.63
S107-05	760.69	S107-22	1051.99
S107-06	883.65	S107-23	1190.91
S107-07	312.37	S107-24	1402.23
S107-08	905.32	S107-25	1175.51
S107-09	1161.03	S107-26	1078.26
S107-10	1266.13	S107-27	1362.11
S107-11	1179.89	S107-28	1193.48
S107-12	765.29	S107-29	1290.54
S107-13	1438.48	S107-30	842.48
S107-14	1107.43	S107-31	1288.44
S107-15	1339	S107-32	1063.52
S107-16	1182.11		

< 그림 328-1-19. pJKS107 total RNA 농도 >

○ 각각의 20ug total RNA를 Northern blot 분석 수행에 사용하였고, negative control (NC)는 empty vector control인 N75 형질전환 개체를 사용하였다. 1.2% formaldehyde gel에 loading 한 후 EtBr에 염색하여 18S와 28S에 해당하는 band를 확인 하였다. 각각의 total RNA를 membrane에 transfer하여 northern blot 분석한 후 확인된 band 중에서 높은 발현을 보이는 pJKS107 #1, #2, #6, #10, #18, #20, #21, #22, #23, #30 개체를 선별하였다 (그림 328-1-20). 선별된 벤틀러스 라인은 단백질 분석을 수행하기 위하여 cell suspension culture를 진행하였다.



< 그림 328-1-20. 3Dsp/PNGase A/His6 (pJKS107) northern blot analysis >

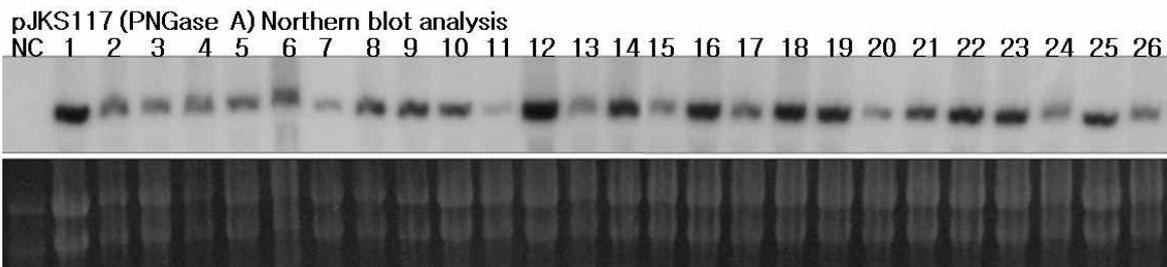
③ 5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 (pJKS117) 고발현 형질전환체 선별

- 항생제 포함 배지에서 선별된 웰러스로부터 Tri-regent/ LN2 grinding해서 total RNA를 추출하였고, nanodrop을 이용하여 RNA 농도를 측정 하였다 (그림 328-1-21).

Sample	ng/ul	Sample	ng/ul
N75	302.85	S117-14	1717.04
S117-01	1082.92	S117-15	1271.61
S117-02	1338.27	S117-16	1353.67
S117-03	866.12	S117-17	1180.89
S117-04	708.46	S117-18	905.52
S117-05	999.7	S117-19	1465.02
S117-06	278.25	S117-20	1107.42
S117-07	785.66	S117-21	1097.28
S117-08	888.55	S117-22	1232.77
S117-09	949.45	S117-23	1141.18
S117-10	1166.49	S117-24	1138.89
S117-11	1485.56	S117-25	996.98
S117-12	1362.28	S117-26	1052.69
S117-13	1211.87		

< 그림 328-1-21. pJKS117 total RNA 농도 >

- 각각의 20ug total RNA를 사용하여 PNGase A의 RNA 발현율을 조사하기 위해 Northern blot 분석 수행에 사용하였다. Negative control (NC)는 N75 형질전환 개체를 사용하였다. 1.2% formaldehyde gel에 loading 한 후 EtBr에 염색하여 18S와 28S band를 확인 하였고, membrane에 transfer하여 PNGase A probe를 이용하여 northern blot 분석한 후 확인된 band 중에서 높은 발현을 보이는 pJKS117 #1, #12, #14, #16, #18, #19, #22, #23 개체를 선별하였다 (그림 328-1-22). 선별된 베틀 웰러스 라인은 단백질 분석을 수행하기 위하여 cell suspension culture를 진행하였다.

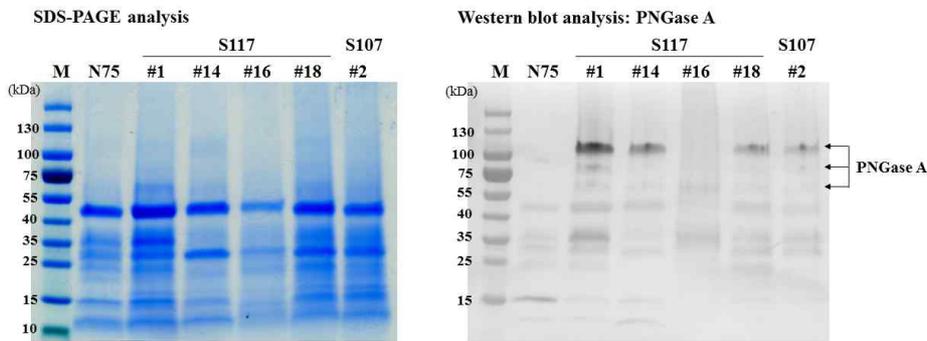


< 그림 328-1-22. 5'UTR/3Dsp/PNGase A/His6 (pJKS117) northern blot analysis >

(1) PNGase A 고발현 형질전환체 확보

(가) 3Dsp/PNGase A/His6(pJKS107) & 5`UTR/3Dsp/PNGase A/His6(pJKS117) 단백질 발현 측정

- 3차년도 결과에서 선별된 pJKS107(S107) #2와 pJKS117(S117) #1, #14, #16, #18 개체를 단백질 수준에서 PNGase A가 발현되어 분비되는지 확인하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 그 결과, S117 #16을 제외한 나머지 cell line에서 Vector control (negative control)로 사용한 N75와 다른 3개의 band를 확인하였다. PNGase A는 55kDa의 subunit을 가지고 있고 2개의 subunit을 합친 단백질 크기는 75.5kDa로 알려져 있다 (Altmann et al., 1998). Western blot 결과에서 각각의 단백질 크기보다 큰 크기의 band를 확인하였고 이는 PNGase A단백질이 가지고 있는 12개의 glycosylation site에 의한 것으로 사료된다. 그리고 100kDa이상에서 관찰된 band는 subunit의 dimer 형태로 예상된다. PNGase A의 단백질 발현이 관찰된 총 4개의 웰러스 라인 중에서 단백질 발현율이 높고 항생제 저항성 배지에서 자란 웰러스 상태가 우수한 S117 #1과 S117 #14 웰러스를 선별하였다 (그림 328-1-23).

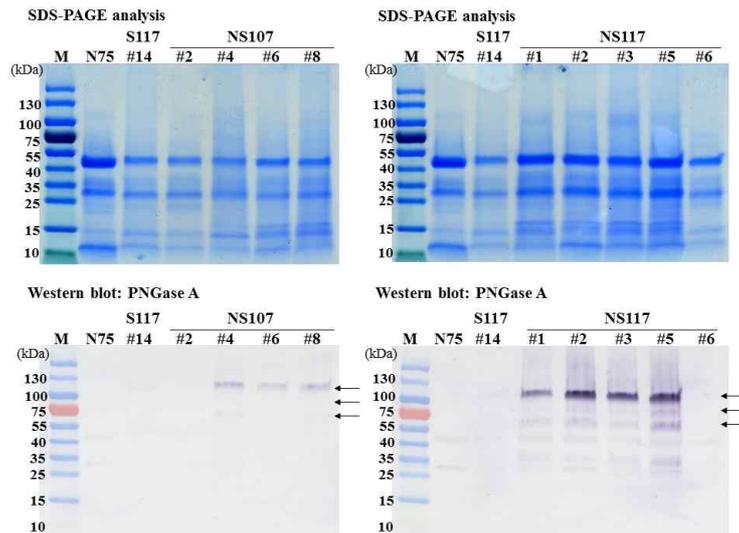


< 그림 328-1-23. S117, S107 cell line western blot analysis >

(나) 추가적인 pJKS107 (NS107) & pJKS117 (NS117) 단백질 발현 측정

- RNA 수준에서 추가적으로 선별된 4개의 NS107 cell line (#2, #4, #6, #8)과 5개의 NS117 cell line (#1, #2, #3, #5, #6)을 단백질 수준에서 PNGase A가 발현되어 분비되는지 확인하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. negative control은 vector control인 N75웰러스로부터 분비된 단백질을 사용 하였고, Positive control은 PNGase A 단백질 발현이 확인된 기존 S117 #14 cell line을 사용하였다. 각각 40ul의 배지를 전기영동 한 결과, NS107 cell line에서는 #4, #6, #8에서 발현을 확인 하였고 NS117 cell line에서는 #6을 제외한 나머지에서 발현을 확인하였다. 전체적으로 NS107 cell line보다 NS117 cell line에서 발현율이 높은 것을 확인 할 수 있었고, 이는 5`UTR의 존재의 유무로 인해 발현율이 높아 진 것으로 사료된다. positive control로 사용한 S117 #14번의 경우 다른 cell line보다 발현율이 현저히 낮은 것으로 관찰

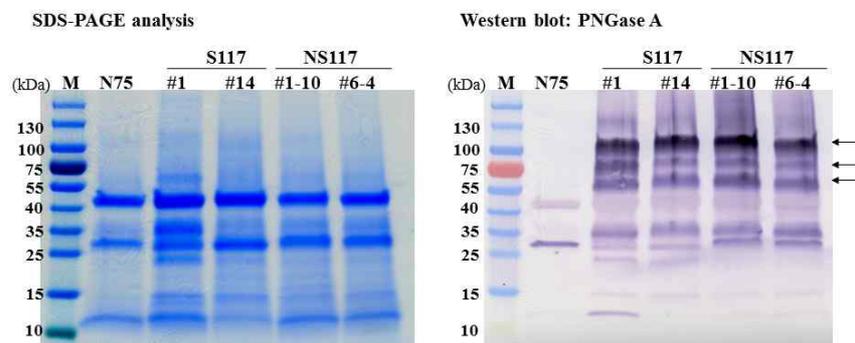
되었는데 이는 NS107과 NS117 cell line의 경우 캘러스를 잘게 seiving한 이후 바로 분석을 진행하였기 때문에 높은 단백질 분비가 유도 된 것으로 사료된다. PNGase A의 발현이 확인된 callus line 중에서 발현율이 높은 NS117 #2,과 #5을 선별하였다 (그림 328-1-24).



< 그림 328-1-24. NS107 & NS117 cell line western blot analysis >

(다) 전체 S107, NS107, S117, NS117 단백질 발현 비교

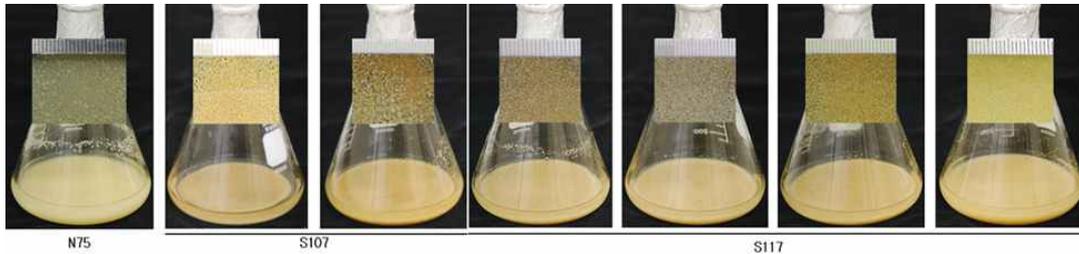
○ 앞서 선별된 PNGase A 고발현 형질전환체 캘러스의 발현율을 동일한 환경에서 각각 비교하기 위하여 S117 #1, S117 #14, NS117 #2(#1-10), NS117 #5(#6-4), 총 4개 캘러스 라인을 같은날 잘게 seiving을 수행하였고 1주일 뒤에 secretion을 수행하여 PNGase A 단백질의 분비를 유도하였다. 그리고 이 분비된 단백질이 포함되어있는 배지를 western blot analysis를 이용하여 PNGase A 발현율을 비교하였다. 그 결과, vector control인 N75와 비교하여 4개의 cell line 모두 비슷한 발현율을 보인 것으로 확인하였다 (그림 328-1-25).



< 그림 328-1-25. 선별된 S117 & NS117 cell line western blot analysis >

④ Suspension culture

- Northern blot analysis를 통해 선별된 pJKS107 #1, #2, #6, #10, #18, #20, #21, #22, #23, #30와 pJKS117 #1, #12, #14, #16, #18, #22, #23 캘러스를 PNGase A 단백질의 분비를 유도하기 위한 적합한 캘러스를 유지 및 증식하기 위하여, cell suspension culture를 수행 하였다. 30g/L sucrose, 2mg/L, 2,4-D, 0.2mg/L kinetin, 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지 (N6SE)에 pJKS117, pJKS107 line callus를 넣고 28℃에서 150rpm으로 암배양을 수행하였다. 1주일 후 어느 정도 자란 callus를 mesh망을 이용하여 잘게 sieving을 하여 새로운 N6SE배지에 액체 배양을 하였다. 1주일 간격으로 계대 배양을 수행 하면서 항생제 포함 배지에서 캘러스 입자의 굵기가 잘게 유지하면서 증식을 유도하였다. 일차적으로 항생제가 포함된 액체 배양에서 pJKS107 #2와 pJKS117 #1, #14, #16, #18 개체가 지속적인 항생제 저항성을 나타내고 증식이 잘 되는 개체로 선별하였다 (그림 328-1-26).

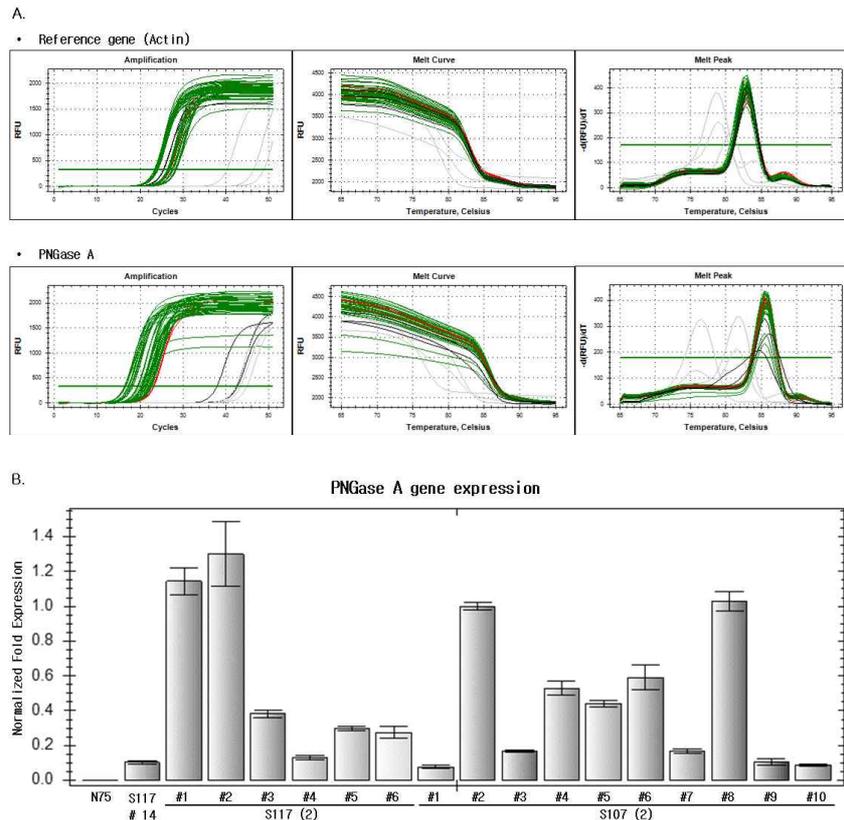


< 그림 328-1-26. suspension culture를 이용한 형질전환 벼 캘러스 증식 >

⑤ Quantitative real-time PCR

- 추가적으로 *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 획득한 캘러스 중에서 RNA level에서 고 발현 PNGase A elite line을 선별하기 위해 real-time PCR (qPCR) 방법을 수행하였다. 각각의 합성된 cDNA 1ul를 template로 사용하였고, normalized expression level을 확인하기 위한 reference gene으로는 벼 actin 유전자(GeneBank: X15865.1)를 사용하였다. Actin은 forward: 5'-AGC TTC CTG ATG GAC AGG TTA TC-3', reverse: 5'-ACC ACT GAG AAC GAT GTT GCC-3' primer를 이용하여 증폭하였고, PNGase A는 PNGase A(qPCR)_F: 5'-TAA CGA GTA CAT CGC TGC CAA C-3', PNGase A(qPCR)_R: 5'-AAT GGT GTG ATC TCG ATA TCG TAA G-3'을 이용하여 증폭하였다. Real-time dye는 SYBR Green을 사용 하였고, PCR 조건은 Pre-denaturation은 95℃ 15min이며 denaturation 95℃ 10sec, annealing 54℃ 15sec, synthesis 72℃ 30sec를 총 50cycle로 하여 3반복으로 분석을 진행하였다.

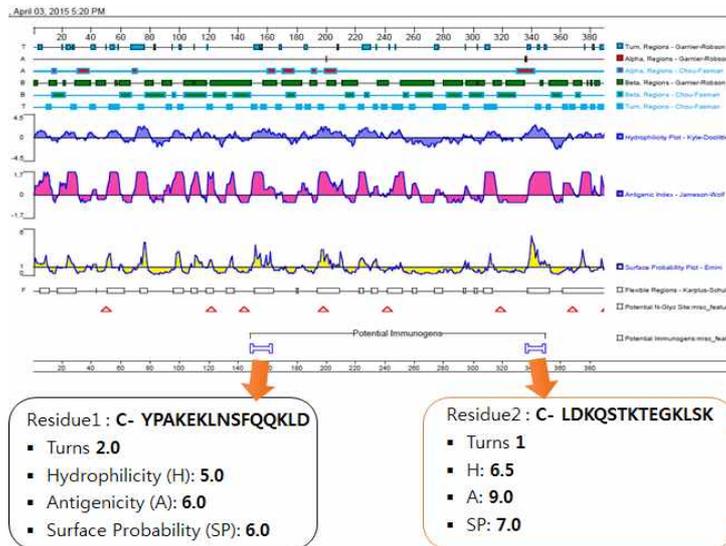
- real-time PCR이 잘 수행 되었는지 확인하기 위하여 Amplification, Melt Curve, Melt Peak 그래프를 확인 하였다. Reference gene인 actin PCR 경우, no template control (NTC; 회색선)를 제외한 negative control (N75;empty vector transgenic callus, 검은색선), positive control (pJKS117-14, 붉은색선), 추가로 선별된 PNGase A line (pJKS117(2), pJKS107(2) line)에서 30 cycle 이전에 증폭이 잘 이루어졌다는 것을 확인 하였다. 그리고 melting 온도도 NTC를 제외한 나머지 샘플에서 83도로 일정하게 나와 actin이 잘 증폭이 되었다는 것을 확인 하였다. PNGase A PCR 경우, NTC (회색선)와 negative control (N75, 검은색선)을 제외한 나머지 샘플에서 30cycle 이전에 증폭이 된 것을 확인 하였고, melting 온도도 85.5도로 일정하게 나와 PNGase A 유전자가 잘 증폭되었다는 것을 확인 하였다 (그림 328-1-27A).
- 이러한 결과를 바탕으로 PNGase A 유전자의 normalized expression level을 확인한 결과, pJKS117(2) 캘러스 라인에서는 #1, #2을 추가적으로 선별 하였고 pJKS107(2) 캘러스 라인에서는 #2, #4, #6, #8을 추가적으로 선별 하였다 (그림 328-1-27B). 선별된 개체는 추가적으로 PNGase A 분비 단백질을 분석하기 위해 suspension culture를 수행하였다.



< 그림 328-1-27. Real-time PCR을 이용한 PNGase A 캘러스 선별 >

⑥ PNGase A antibody 제작

○ 형질전환 벼 캘러스로부터 분비되는 PNGase A 단백질을 western blot analysis로 분석하기 위해 필요한 항체를 제작 하였다. PNGase A (UniProtKB/Swiss-Prot: P81898.2) NCBI database를 이용하여 펩타이드 분석을 하고 (그림 328-1-28) 항원성, 친수성, 표면 도출성 수치를 고려하여 가장 적절한 residue 2 (C-LDKQSTKTEGKLSK)을 선택하여 합성을 진행 하였다. Rabbit를 host로 사용하여 1회의 In Complete Freund's Adjuvant (CFA), 3회의 In Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)를 거쳐서 PNGase A 항체가 포함된 rabbit serum과 purified PNGase A rabbit polyclonal antibody를 제작 하였다.

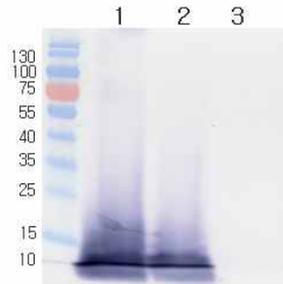


< 그림 328-1-28. PNGase A peptide 서열 분석 >

⑦ Western blot analysis를 이용한 PNGase A antibody 확인

○ 제작된 PNGase A antibody를 항원 특이적 항체 결합 여부를 확인하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. Positive control은 항체 제작에 사용되었던 C-LDKQSTKTEGKLSK peptide를 사용하였다. 0.5ug, 1.0ug의 PNGase A peptide와 PBS를 첨가하여 total reaction buffer를 20ul로 맞추고 4x reduce sample buffer 5ul를 혼합하여 97°C에서 5분간 denaturation을 시킨 후 25ul를 12% SDS-PAGE Gel을 이용하여 western blot을 수행하였다. 1차 항체는 PNGase A antibody 1/1000으로 희석하여 4°C에서 overnight으로 hybridization을 진행 하였고, 2차항체로 Rabbit IgG AP 1/2000을 사용하여 NBT/BCIP 용액으로 발색을 시켰다. 15 amino acid로 구성된 PNGase A peptide는 gel의 가장 밑 부분에서 발색 된 것을 확인 하였고 (그림 328-1-29), 이 조건으로 PNGase A western blot을 수행할 예정이다.

PNGase A peptide western blot



1: 1ug PNGase A peptide (15aa)
 2: 0.5ug PNGase A peptide (15aa)
 3: PBS buffer
 1st Ab: PNGase A antibody 1/1000
 2nd Ab: Polyclonal Rabbit IgG AP (1/2000)

< 그림 328-1-29. 제작한 PNGase A antibody를 확인하기 위한 western blot >

(4) 식물유래 PNGase A의 생화학적 분석:

(가) 연구수행 내용

① Western blot analysis를 이용하여 선별된 PNGase A 고발현 캘러스 라인 중에서, pJKS117(S117) #14 벼 캘러스로부터 생화학적 분석을 위한 실험을 수행하기 위하여 잘게 배양된 S117 #14 callus를 진공펌프를 이용하여 기존 배양액을 제거하고 sucrose가 제거되고 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지 (N6-S)에 10ml/g 비율로 접종하여 7일간 배양 하였다. 당 결핍 상태에서 PNGase A 단백질의 분비를 유도하였고 배양액을 취한 뒤, 생화학적 분석을 진행 하였다.

② 효소 활성화 분석 : 탈당화 (Fetuin)

○ Fetuin 당 단백질은 sigma (G0516)사로부터 구입하여 사용하였고, Roche사의 아몬드 유래 N-glycosidase A(PNGase A, 11 642 995 001)와 벼 유래 PNGase A(S117 #14)를 사용하여 1ul(1ug)의 fetuin의 탈당화를 유도하였다 (그림 328-1-30).

	Treatment 1	Treatment 2	10x buffer*
Fetuin (1ug)	1ul	1ul	100mM sodium acetate buffer 5M NaSCN 1M 2-mercaptoethanol pH 5.1 Incubation: 24h, 37°C
PNGase A (almond)	5ul (0.25mU)	-	
PNGase A (S117 #14)	-	89ul	
10x Buffer*	10ul	10ul	
D.W	84ul	-	
Total	100ul	100ul	

< 그림 328-1-30. PNGase A 효율을 분석하기 위한 deglycosylation reaction mixture >

○ 미생물 유래의 PNGase F와의 Fetuin 당 단백질의 탈당화를 유도하기 위해 여러 조건의 sample mixture를 진행하였다 (그림 328-1-31B). PNGase F(NEB)를 이용한 탈당화 반응은 NEB에서 제공하는 buffer와 protocol을 이용하여 수행하였다.

A.

	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
Fetuin	10ul(100ng)	10ul(100ng)	10ul(100ng)
PNGase A (almond)	2ul (0.1mU)	-	-
PNGase A (S117 #14)	-	80ul	-
N75	-	-	80ul
10x Buffer	10ul	10ul	10ul
D.W	84ul	-	-
Total	100ul	100ul	100ul

10x buffer: 100mM sodium acetate buffer, 5M NaSCN, 1M 2-mercaptoethanol, pH 5.1
Incubation: 24h, 37°C

B.

	Treatment 4	Treatment 5	Treatment 6
Fetuin	1ug	1ug	1ug
10x Glycoprotein denaturing buffer	2ul	2ul	2ul
D.W	16ul	16ul	16ul
Incubation: 100°C 10min			
10x Glycobuffer2	4ul	4ul	4ul
10% NP-40	4ul	4ul	4ul
PNGase F	2ul	-	-
PNGase A (S117 #14)	-	12ul	-
N75	-	-	12ul
D.W	10ul	-	-
Total	40ul	40ul	40ul

Incubation: 37°C 1hr
PNGase F (NEB) protocol 적용

< 그림 328-1-31. PNGase A와 PNGase F 효율을 분석하기 위한 deglycosylation reaction mixture >

(다) Pepsin-released glycopeptide를 이용한 탈당화

- 5% formic acid에 100ug의 fetuin 단백질을 용해시켜 pepsin을 1:50의 비율로 첨가하여 37도에 O/N시켜 반응을 유도하였다. 동결건조를 시켜 반응물을 건조시켜 0.1M citrate buffer (pH 5.0)에 녹여 아몬드 유래의 PNGase A, 벼 유래 PNGase A (S117 #14), 그리고 N75 배지 control을 첨가하여 탈당화 반응을 분석하였다 (그림 328-1-32A). 동일하게 PNGase F와 fetuin과의 탈당화 반응 조건을 이용하여 아몬드 유래의 PNGase A의 탈당화 반응을 분석하기 위하여 NEB사에서 제공되는 buffer와 protocol을 이용하여 탈당화 반응 분석을 진행하였다 (그림 328-1-32B).

A.

	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
Fetuin (pepsin-released)	4ul (4ug)	4ul (4ug)	4ul (4ug)
PNGase A (almond)	2ul (0.1mU)	-	-
PNGase A (S117 #14)	-	86ul	-
N75	-	-	86ul
1M citrate buffer pH 5.0	-	10ul	10ul
0.1M citrate buffer pH 5.0	94ul	-	-
Total	100ul	100ul	100ul

Incubation: 16h, 37°C

B.

	Treatment 4	Treatment 5	Treatment 6	Treatment 7
Fetuin	2ul (2ug)	2ul (2ug)	2ul (2ug)	2ul (2ug)
10x Glycoprotein denaturing buffer	2ul	2ul	2ul	2ul
D.W	16ul	16ul	16ul	16ul
Incubation: 100°C 10min				
10x Glycobuffer2	4ul	4ul	4ul	4ul
10% NP-40	4ul	4ul	4ul	4ul
PNGase F	2ul	-	-	-
PNGase A (almond)	-	5ul	-	-
PNGase A (S117 #14)	-	-	12ul	-
N75	-	-	-	12ul
D.W	10ul	7ul	-	-
Total	40ul	40ul	40ul	40ul

Incubation: 37°C 1hr
PNGase F (NEB) protocol

< 그림 328-1-32. peptide 형태 fetuin의 탈당화를 분석하기 위한 reaction mixture >

(라) Glycoprotein: RNase B

- 당 단백질 RNase B의 탈당화를 유도하기 위하여, 미생물 유래 PNGase F, 아몬드 유래 PNGase A, 벼 유래 PNGase A를 RNase B와 반응시켰다. 반응조건은 NEB사에서 제공하는 protocol을 이용하여 실험을 수행하였다 (그림 328-1-33).

	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
RNase B	4ul (20ug)	4ul (20ug)	4ul (20ug)	4ul (20ug)
10x Glycoprotein denaturing buffer	2ul	2ul	2ul	2ul
D.W	14ul	14ul	14ul	14ul
Incubation: 100°C 10min				
10x Glycobuffer2	4ul	4ul	4ul	4ul
10% NP-40	4ul	4ul	4ul	4ul
PNGase F	2ul	-	-	-
PNGase A (almond)	-	5ul	-	-
PNGase A (S117 #14)	-	-	12ul	-
N75	-	-	-	12ul
D.W	10ul	7ul	-	-
Total	40ul	40ul	40ul	40ul
Incubation: 37°C 1hr RNase B (NEB) protocol				

< 그림 328-1-33. RNase B의 탈당화를 분석하기 위한 reaction mixture >

(마) SDS-PAGE & Western blot analysis

- Reaction sample 40ul와 4x reduce sample buffer 10ul를 혼합하여 5분간 97°C에서 denaturation 시킨 후 50ul를 4-20% TGX PAGE-Gel (Bio-rad)에 200v로 전기영동을 실시하였다. 전기영동 한 gel 1개는 coomassie blue 염색약을 넣어서 SDS-PAGE analysis 실시하였고, 나머지 gel은 PVDF western blotting membrane (03 010 040 001, roche)에 200mA로 90분간 transfer 하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 5% skim milk로 RT에서 40분간 3회 blocking 하고 0.1% tween 20이 첨가된 TBS buffer (TBST)로 15분간 3회 세척 한 후 제작한 PNGase A antibody를 1차 항체로 사용하여 4°C에서 O/N 하였다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, 2차 항체로 anti-rabbit IgG AP (SantaCruz)를 사용하여 4°C에서 2시간동안 반응시켰다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, NBT/BCIP (Roche)용액으로 PVDF membrane을 detection하여 PNGase A 단백질을 확인 하였다.
- Fetuin 당단백질의 경우 4-20% TGX PAGE-Gel (Bio-rad)을 사용하여 1ul(1ug)와 3ul(3ug)의 fetuin 당단백질을 loading하여 SDS-PAGE analysis와 western blot analysis를

수행하였다. 1차 항체로 Rackland (200-101-456)사의 Anti-goat IgG Fetuin 항체를 1/1000 희석하여 4°C에서 O/N 하였다. 2차 항체로는 anti-Goat IgG AP (SantaCruz)를 1/2000으로 희석 사용하여 4°C에서 2시간동안 반응시켜 분석을 수행하였다.

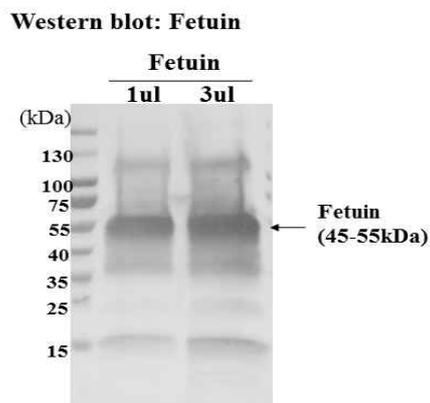
(가) 연구결과

① Fetuin 당 단백질을 이용한 PNGase A (S117#14) 효소 활성 조사

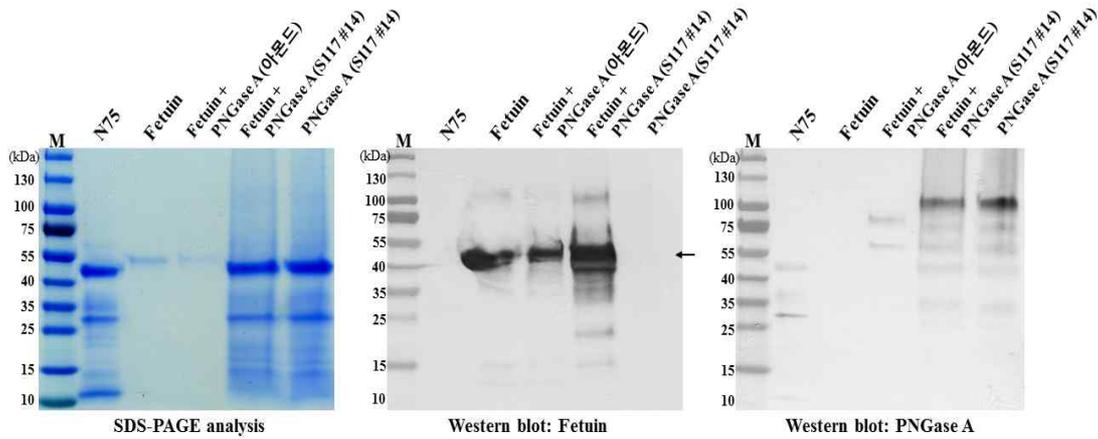
○ Fetuin은 포유동물 태아 혈청에 특징적으로 나타나는 시알로당단백질로서, 282개의 아미노산이 포함되어있는 A chain과 27개의 아미노산이 포함된 B chain이 heterodimer를 이루어 분자량은 32.9kDa이다. 하지만 당화에 의해 재조합 Fetuin은 45~55kDa 정도의 분자량을 나타낸다. 먼저 재조합 human fetuin의 western blot 분석을 위한 최적의 조건을 확립하기 위하여 fetuin protein에 대한 western blot 분석을 진행하였다. western blot 분석 결과, 약 55kDa에서 Fetuin에 해당하는 band가 관찰되었고 (그림 328-1-34), 1ul(1ug)의 Fetuin 단백질을 사용하여 이후 실험을 진행하였다.

② PNGase A를 이용한 Fetuin 당 단백질의 탈당화 유도 및 활성 분석

○ 당 단백질 Fetuin의 분석을 위해 확립된 western blot 분석 조건을 바탕으로 PNGase A를 이용한 탈당화 유도 실험을 진행하였다. Western blot analysis를 수행한 결과, 우선 벼 유래 PNGase A 단백질과 Fetuin 항체와의 결합은 확인되지 않아 항체의 특이성은 확인 되었다 (그림 328-1-35). 이 결과를 바탕으로, 무처리의 Fetuin과 비교하여 아몬드 유래 PNGase A 처리한 Fetuin 단백질과 벼 유래 PNGase A(S117 #14)와 반응시킨 Fetuin 단백질 결과에서 탈당화 반응이 유도되지 않았다. 다만, 벼 유래 PNGase A와 반응한 fetuin은 다른 샘플과는 다르게 55kDa 밑 부분에서 band가 관찰되었다.

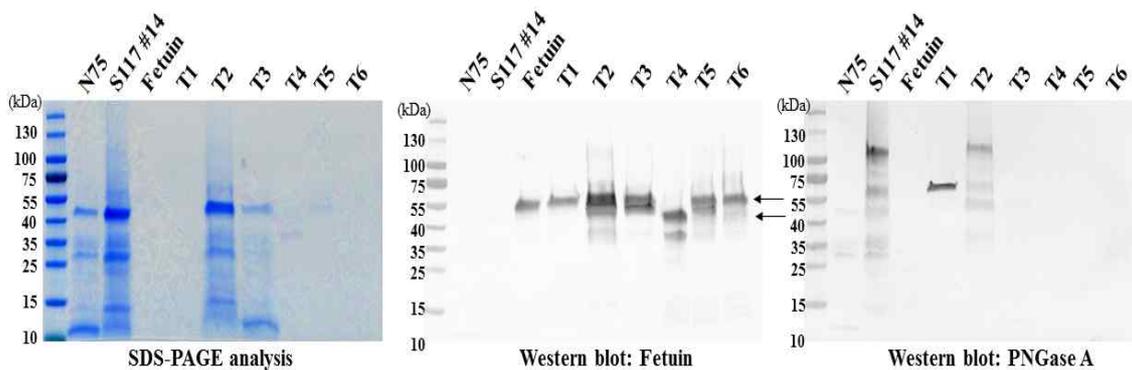


< 그림 328-1-34. 당 단백질 Fetuin의 western blot analysis >



< 그림 328-1-35. 당 단백질 Fetuin을 이용한 PNGase A 효소 활성 분석 >

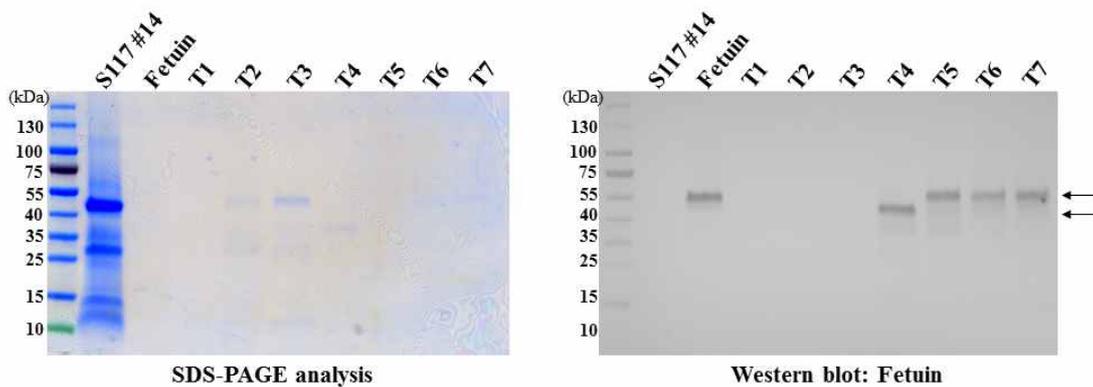
○ Fetuin 단백질과 베티 유래 PNGase A 반응에서 관찰된 band를 확인하기 위하여 fetuin 단백질과 vector control인 N75 켈러스로부터 분비된 단백질과의 반응 분석을 진행하였다 (그림 328-1-36). Western blot 분석 결과에서 아몬드 유래 PNGase A는 이전 결과와 동일하게 탈당화가 일어나지 않았고 (Treatment 1: T1) 베티 유래 PNGase A (S117#14)도 탈당화가 일어나지 않은 fetuin 사이즈의 band와 55kDa 이하에서 이전 결과와 동일하게 band가 확인 되었다 (Treatment 2: T2). 그리고 N75 켈러스 배양액과 fetuin과의 탈당화 반응 비교에서는 베티 유래 PNGase A와 비슷한 양상의 결과를 보였다 (Treatment 3: T3). 이 결과, 베티 유래 PNGase A의 결과에서 보였던 55kDa 이하의 band는 fetuin 단백질의 탈당화가 아닌 켈러스 분비 유도 배지와 반응으로 인한 결과로 사료된다. PNGase A의 결과와는 달리, PNGase F와 fetuin과의 반응에서는 (Treatment 4: T4) 약 40kDa 부근에서 fetuin이 관찰되어 PNGase F는 fetuin의 탈당화를 유도하는 것으로 확인 되었다.



< 그림 328-1-36 당 단백질 Fetuin을 이용한 PNGase A & PNGase F 효소 활성 분석 >

③ Pepsin-released glycopeptide fetuin 단백질의 탈당화

- PNGase A의 효소에 의해 유도되는 탈당화 반응은 펩타이드 형태의 당 단백질과의 효율이 높다고 보고되어 있다. 그래서 당 단백질 fetuin을 pepsin을 처리하여 펩타이드 형태의 fetuin에 PNGase A를 처리해 탈당화를 유도하였다. 먼저 펩타이드 형태의 fetuin을 이용하여 PNGase A의 탈당화 반응을 분석하기 위해, reaction sample 40ul와 4x reduce sample buffer 10ul를 혼합하여 western blot을 수행하였고, PNGase F 탈당화 반응 조건으로 아몬드 유래 PNGase A의 탈당화 활성 유무를 분석하기 위해 reaction sample 12ul와 4x reduce sample buffer 4ul를 혼합하여 western blot을 수행하였다 (그림 328-1-37).



< 그림 328-1-37. 펩타이드 Fetuin을 이용한 PNGase A & PNGase F 효소 활성 분석 >

- pepsin 처리에 의해 유도된 펩타이드 형태의 fetuin을 이용하여 PNGase A와 PNGase F의 효소활성을 관찰한 결과, 이전 결과와 동일하게 PNGase F 처리군 (T4)에서만 탈당화가 유도되었고, 나머지 처리군에서는 탈당화가 유도되지 않았다. 특히, pepsin처리를 한 T1, T2, T3 처리군은 SDS-PAGE analysis에서 band가 관찰 되었지만 fetuin western blot analysis에서는 band가 관찰되지 않았다. pepsin에 처리에 의해 protein 구조의 변화로 인해 fetuin의 항체가 결합하지 못한 것으로 사료된다.
- 종합적으로, 인간 유래 재조합 당 단백질 fetuin은 PNGase F에 의해서 탈당화가 일어나고 PNGase A에 의해 탈당화가 유도되지 않기 때문에 PNGase A 특이적 당 구조는 포함하지 않은 것으로 사료된다.

(3) RNase B 단백질을 이용한 PNGase A (S117 #14) 효소 활성 조사

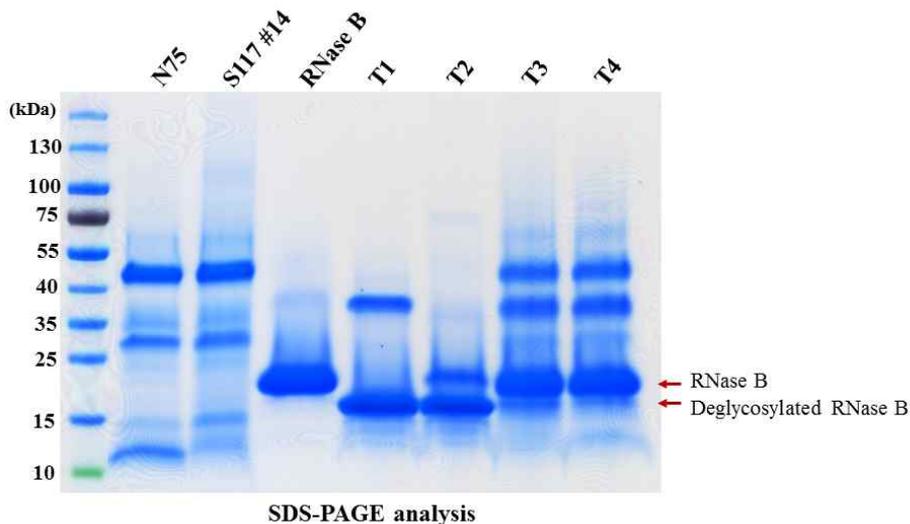
(가) Glycoprotein: RNase B

- Bovine pancreas에서 추출된 RNase B는 endoglycosidase에 의해 N-linked

carbohydrates를 자르는 positive control로 많이 사용되고 있는 high mannose glycoprotein (1-3)이다. 보통 SDS-PAGE analysis나 MALDI-MS 분석을 이용하여 PNGase F에 의해 deglycosylation을 관찰하는 기질로 많이 사용되고 있다. 이 RNase B 당 단백질을 이용하여 PNGase F와 PNGase A의 효소 활성을 관찰하고자 하였으며, NEB사의 RNase B (P7817S)를 구입하여 이후 실험을 진행하였다. Western blot 분석을 위한 RNase B의 항체는 없었기에 SDS-PAGE 분석으로 탈당화 분석을 실시하였다.

(나) PNGase A를 이용한 RNase B 당 단백질의 탈당화 유도 및 활성 분석

○ RNase B는 단백질 분자량이 1.7kDa 정도로 알려져 있고 deglycosylation 후 13.683kDa정도로 작아진다고 알려져 있다. PNGase 효소로 RNase B 탈당화를 유도하고 SDS-PAGE 분석을 통해서 탈당화 유무를 관찰하였다 (그림 328-1-38). RNase B는 1.7kDa 보다는 약간 큰 위치이지만 band가 관찰 되었고, 미생물 유래 PNGase F 처리군 (Treatment 1: T1)에서 RNase B의 탈당화가 관찰되었다. 그리고 아몬드 유래 PNGase A 처리군 (Treatment 2: T2)에서도 RNase B의 탈당화가 100%는 아니지만 80% 이상 유도되었다. 이는 PNGase F와 PNGase A의 효소가 당 사슬을 절단하는 부위가 서로 다른 부분이 있다는 것을 의미한다. 하지만 벼 유래 PNGase A 처리군 (Treatment 3: T3)에서는 탈당화 유도된 RNase B에 해당하는 band가 N75 control 처리군 (Treatment 4: T4) 보다는 진하게 나타났지만 효율이 낮게 나타났다. 실험에 사용된 아몬드 유래 PNGase A와 비교하면, 정제 전의 배지 상태로 실험을 진행하였기에 농도와 순도에서 많은 차이가 있다. 그래서 효율적인 면에서 많이 낮은 결과가 유도 될 수 있다고 예상되며, 추가적인 실험이 요구된다.



< 그림 328-1-38. RNase B를 이용한 PNGase A & PNGase F 효소 활성 분석 >

2. 식물 viral vector를 이용한 PNGase A 생산기술 개발

○ 연구수행기관 : 전북대학교

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) PNGase A 의 고발현 식물 발현벡터 구축

- ① PNGase A의 고발현 식물벡터로 클로닝
- ② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환
- ③ Western blot법을 이용한 고 발현 확인

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 최근 바이오시밀러연구와 분자농업 연구의 관심이 높아지면서 식물유래 및 곤충세포유래 당단백질의 구조분석 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있으며, 식물 특이적 당단백질의 당구조를 절단하는 *N*-Glycosidase로서 Almond 유래 *N*-Glycosidase인 PNGase A의 수요가 급격하게 증가하고 있는 단백질이나 현재는 전량 아몬드에서 추출하여 사용하므로 매우 고가(30만원/1mIU) 이므로 재조합 단백질로서의 생산이 이루어지는 즉시 산업화가 가능하다고 판단되어 식물 viral vector를 이용하여 PNGase A의 생산기술을 개발하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) PNGase A 의 고발현 식물 발현벡터 구축

(가) 연구개발 수행내용

- ① PNGase A의 고 발현 식물벡터로의 클로닝
 - TMV based vector인 pMYV150에 주관기관인 NBM으로부터 받은 아몬드 유래 PNGaseA 유전자를 삽입하여 pMYD411로 명명하였다.
- ② Electroporation을 이용한 Agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환
 - Electrocompetent agrobacteria cell을 만들기 위하여 agrobacteria (strain GV3101)을 50 mg/L rifampicin이 첨가된 5 ml의 LB medium에 접종하여 28℃, 암상태의 현탁배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후 agrobacteria 만을 수거하여 항생제를 제거하기 위하여 차갑게 준비된 500ul의 10% glycerol을 이용하여 2번 washing 하였다. Pellet에 차갑게 준비된 100 ul의 10% glycerol로 resuspension 한 후 25 ul를 취하여 미리 차갑게 준비된 EP tube에 분주하여

electrocompetent cell을 준비하였다. 25 ul의 electrocompetent cell에 상기에서 준비된 1 ul의 plasmid DNA를 첨가한 후 미리 차갑게 준비된 cuvette에 mixture를 넣고 ice에서 5분간 방치하였다. GenePulser를 이용하여 1800 kV, 25 uF 그리고 200 Ω 조건하에서 형질전환을 수행하였다. 형질전환 된 electorcompetent cell을 EP tube에 옮긴 후 신선한 1ml의 LB 배지를 첨가한 후 28°C에서 2-3시간 암 상태에서 현탁배양 하였다. 형질전환 된 세포를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에 도말하여 28°C에서 2-3일 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 항생제가 첨가된 배지에서 형성된 단일 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출 한 후 제한 효소 처리로 상기의 유전자들이 성공적으로 도입된 것을 확인하였다.

③ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYD411이 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재현탁하였다. Agrobacterium 현탁액은 OD600에서 0.6이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 vacuum을 이용하여 infiltration을 수행하였다. Vacuum을 이용한 vacuum infiltration은 전체 식물체를 화분에 있는 흙이 쏟아지지 않게 고정한 후 화분을 뒤집어서 5L의 상기의 아그로박테리아 혼합액에 잠기도록 한 후 -90 kPa에서 1분 동안 vacuum을 걸어서 현탁액 안에 있는 기포를 빼준 후 재빨리 vacuum을 대략 -10 kpa 까지 잠근다. 이때 아그로박테리아 현탁액이 식물체의 잎 안으로 침투되는 것을 육안으로 확인할 수 있다. Vacuum에 의해 infiltration 된 식물체는 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 3일 동안 배양하였다. 6일째 식물의 잎을 수확하여 Ni-NTA agarose를 이용하여 his-tagged PNGase정제를 수행하였다.

④ Ni-NTA agarose를 이용한 his-tagged PNGase A 의 정제

- Polyrep Chromatography Column (Bio-rad)에 800 ul의 Ni-NTA agrose (Qiagen)을 조심스럽게 부운 후 10mM의 imidazole이 첨가된 PBS buffer로 equilibration 한 후 추출한 잎 단백질을 조심스럽게 흘려보냈다. Flow through (FT)는 따로 모았으며, 이후 20mM의 imidazole이 첨가된 PBS buffer로 resin을 washing 하였으며, 250 mM의 imidazole이 첨가된 PBS buffer를 이용하여 his-tagged protein을 정제하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE와 Western blot analysis을 수행하였다.

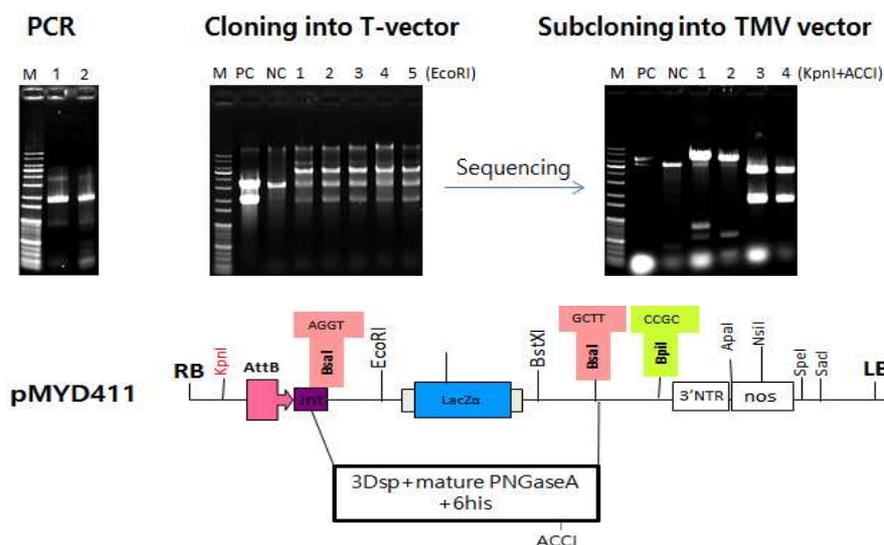
⑤ 분자생물학적 분석(SDS-PAGE와 Western blot analysis)

○ 아몬드 유래 PNGase 발현을 확인하기 위하여 6일째 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 μ g의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다. Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 anti-his antibody을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:500으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였으며 이차 항체로 anti-mouse IgG Ap conjugated 을 1:7000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① PNGase A 유전자의 transient expression vector에 클로닝

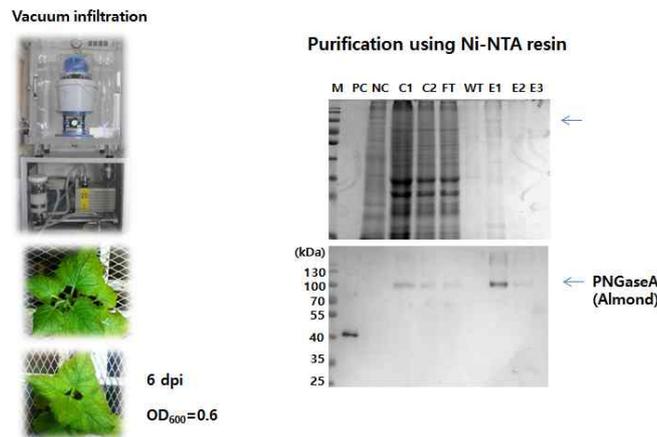
○ TMV based vector인 pMYV150에 3'말단에 정제를 용이하게 하기 위하여 6 his tag이 첨가된 PNGaseA를 삽입하여 pMYD411로 명명하였고 infiltration을 위해 agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환 하였다 (그림 328-2-1).



< 그림 328-2-1. PNGaseA의 TMV based vector로의 클로닝 >

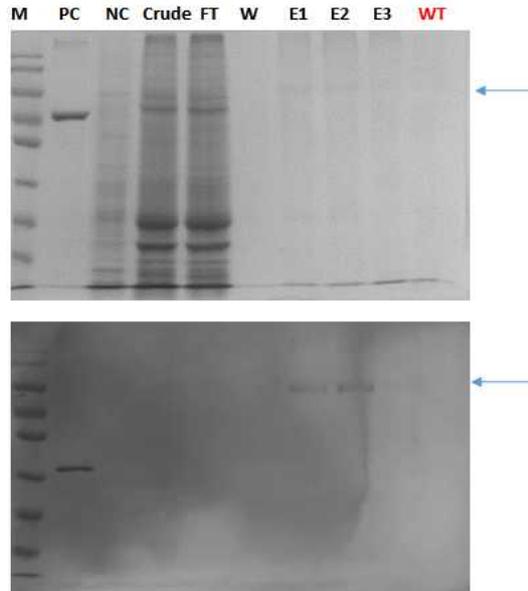
② PNGaseA의 정제 및 발현 확인

○ Agroinfiltration 법을 이용한 PNGaseA의 발현을 알아보기 위하여 vacuum을 이용하여 상기에서 기술한 바와 같은 방법을 이용하여 infiltration 하였으며 6일째 잎을 수확하여 단백질을 추출하여 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제를 수행한 후 SDS-PAGE, Western blot analysis를 수행하였다 (그림 328-2-2). 그 결과 아몬드 PNGase A의 예상 크기인 65 kDa보다 큰 약 100 kDa에서 확인이 되었으며, crude (C1, C2), flow through (FT)와 purified protein인 elute 1과 elute 2 (E1과 E2)에서 확인되었다. 이러한 결과는 아몬드 PNGaseA내에 예상되는 N-glycosylation site 가 11정도 존재하는 것에 기인하는 것으로 사료된다.



< 그림 328-2-2. PNGaseA의 고 발현 확인을 위한 vacuum infiltration 법과 SDS-PAGE 와 Western blot analysis >

○ *Nicotiana benthamiana*에서 PNGaseA의 발현 재현성을 확인하기 위하여 vacuum 으로 infiltration 한 후 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제한 후 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다. 또한 정제한 단백질에 Ni-NTA에 결합하는 non-specific한 단백질이 있는지를 알아보기 위하여 형질 전환되지 않은 담배 잎의 단백질 추출물도 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제하여 anti-his antibody를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다 (그림 328-2-3). 그 결과 형질 전환되지 않은 담배잎의 단백질 (WT)을 이용한 정제 샘플에서는 histag에 대한 결합력을 가지는 어떠한 단백질도 확인되지 않았으며 이를 통하여 pMYD411이 삽입된 아그로박테리아를 이용한 agroinfiltration이 성공적으로 이루어 졌으며 TMV based vector를 이용한 PNGaseA의 발현이 이루어 졌다고 사료된다.



< 그림 328-2-3. PNGaseA의 고 발현 확인을 위한 SDS-PAGE 와 Western blot analysis >

3. 고발현 핵 형질전환 시스템을 이용한 PNGase A 생산 GM작물 개발

○ 연구수행기관 : 순천대학교

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- (1) 토마토의 신규 PNGase T 유전자의 클로닝
 - ① 토마토의 PNGase T 유전자 분리
- (2) PNGase T 유전자 발현 조절 연구
 - ① 토마토 조직 내에서의 PNGase T 유전자 발현 조절 연구
- (3) PNGase T 유전자의 형질전환
 - ① PNGase T 유전자의 형질전환체 개발
 - ② PNGase T 단백질 발현 수율 및 특성 분석
 - ③ PNGase T 고생산 식물체의 안정적 발현 line 확립

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- 최근 바이오시밀러연구와 분자농업 연구의 관심이 높아지면서 식물유래 및 곤충세포유래 당단백질의 구조분석 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있음
- 식물유래 당단백질 당구조상 Fucose와 Xylose를 포함하고 있으므로 미생물 유래

PNGase F에 의하여 절단이 되지 않아 반드시 식물유래 효소인 PNGase A를 사용하여야 절단이 됨(Altman et al., 1998, Eur. J. Biochem. 252, 118-123)

- 상기와 같이 수요가 급격하게 증가하고 있는 단백질이나 현재는 전량 아몬드에서 추출하여 사용하므로 매우 고가(30만원/1mIU) 이므로 재조합 단백질로서의 생산이 이루어지는 즉시 산업화가 가능하다고 판단됨
- 본 연구는 고발현 핵 형질전환 시스템을 이용하여 PNGase A의 생산기술을 개발하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) 토마토의 신규 PNGase T 유전자의 클로닝

(가) 세부연구의 수행내용 (재료 및 방법)

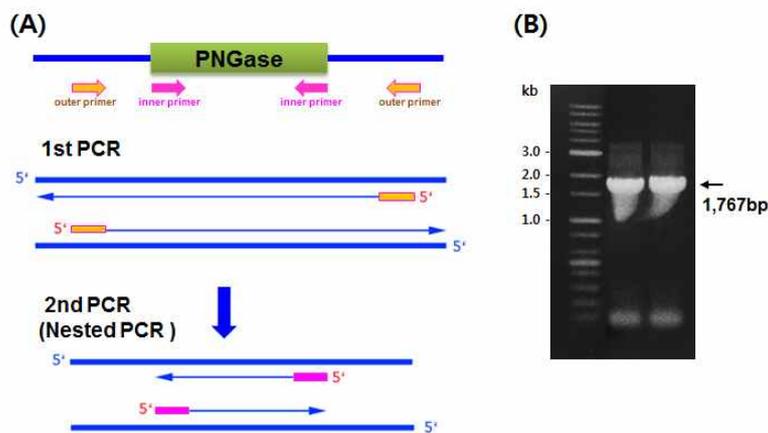
- 식물재료
 - 본 실험에서는 토마토 (*Solanum lycopersicum L. cv Micro Tom*) 잎에서 분리한 total RNA로부터 합성된 cDNA를 분양받아 토마토 *PNGase T* 유전자 분리에 사용하였다.
- Total RNA 분리
 - Total RNA 분리는 액체질소하에서 약 0.1 g의 조직을 막자사발로 완전히 마쇄한 후 1 ml의 TRI Reagent[®](Molecular Research Center, Inc.)와 30초간 혼합한 뒤 실온에서 5분간 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 얻는 상등액을 새 tube에 옮기고, 0.1ml의 BCP (1-bromo-3-chloropropane)를 첨가하여 30초간 혼합하고, 5분간 실온에 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리를 재차 수행하여 얻은 상등액을 새로운 tube에 옮기고 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 RNA를 침전시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전된 RNA pellet은 70% 에탄올로 세척하였고 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) 증류수에 녹여 spectrophotometer (UV-1601; Shimadzu, Japan)를 이용하여 RNA 순수도 및 양을 확인한 후 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.
- RT-PCR 및 cDNA 합성
 - 유전자 클로닝 및 유전자 발현 분석을 위해 필요한 1st strand cDNA는 PrimeScript[™] 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc. Japan) 를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 합성하였다. cDNA 합성의 주형으로는 1µg의 total RNA를 사용하였으며, oligo dT primer를 사용하여 1st strand cDNA를 합성하였다.
- cDNA 클로닝과 염기서열 분석
 - 합성된 cDNA를 이용하여 토마토 게놈 [Locus: LOC100316898 [3,613,961 nucleotid (nt) ~ 3,616,373 nt, GenBank accession No. NW_004194361] 에 위치해 있는 *PNGase T* 유전자를 outer primer (forward, 5'-TCTACAGTATATTTTAGTCA-3'; reverse, 5'-AGCTTTAGCAGCAAATGAGTG-3')와 inner primer (forward, 5'-CCATGGCTATGGCTGCCTCCTCTTCC-3'; reverse,

5'-TCTAGATCAACCAGGAAGAGACCGC-3)를 제조하여 nested PCR 반응을 통하여 증폭하였고 PCR[®]4-TOPO cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 plasmid에 삽입하였다. 완성된 plasmid를 열충격 방법으로 대장균 *DH5a*에 도입한 후, 항생제 screening을 거쳐 배양한 다음 plasmid midi kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 plasmid를 추출하였다. 추출한 plasmid는 전기영동으로 분리하고 염기서열을 확인하였으며 NCBI에 유전자를 등록하였다 (GenBank accession No. KM401550).

(나) 연구결과 및 고찰

○ 토마토 *PNGase* 유전자 (*PNGase T*)의 cDNA 분리 및 유전자 분석

- 토마토 게놈 (GenBank accession No. NW_004194361)의 정보를 활용하여 *PNGase T* 유전자의 특이적 primer를 주문 제조한 후 nested PCR을 수행하여 full-length의 *PNGase T*의 cDNA를 분리하였고 (그림 328-3-1), NCBI GenBank 등록하였다 (GenBank Accession number KM401550).



< 그림 328-3-1. Nested PCR을 이용한 토마토 *PNGase T* 유전자 합성과정 디자인(A)과 PCR 결과(B) >

○ 토마토 *PNGase* 유전자 (*PNGase T*) 분석

- *PNGase T*의 ORF는 총 1,767bp, 588개의 아미노산으로 이루어져 있었으며, 분자량은 65.8 kDa 이었으며 예상된 pI 값은 8.69로 조사되었다 (http://web.expasy.org/compute_pi/ 사이트) (그림 328-3-3)
- 그러나 cultivar Momotaro 토마토에서 분리된 *PNGase-Le* (GenBank accession No. FJ804752)의 유전자 염기서열과 비교해보면 ORF의 염기서열 1,767 bp 중 3개의 염기가 달랐으나 아미노산 서열은 588개 중 586개가 동일하여 99.7%의 동일성을 나타내었다(그림 328-3-2).
- *PNGase T*의 N 말단 부위에는 ribosome을 소포체로 표적시키는 21개의 아미노산으로 이루어진

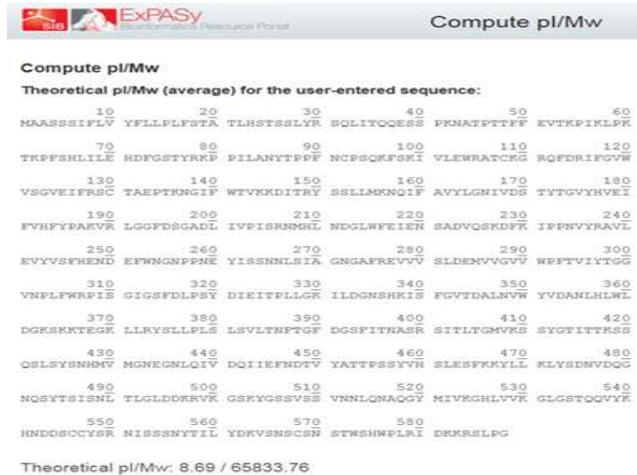
signal sequence가 존재하며 당단백질의 N-당질화 부위인 아스파라긴산-X-세린/트레오닌의 아미노산 서열 모티브 (NxS/T)는 총 9개 (아미노산 서열 부위 266, 386, 397, 447, 481, 489, 551, 556, 570)이며 이는 10개의 N-당질화 부위가 존재하는 *PNGase*-Le보다 한 개가 적었다.

```

ATGGCTGCCCTCCCTCTCCATTTCCTTAGTTTATTTCTTGCTACCCITATTTCCACAGCA      1
M A A S S S I F L V Y F L L P L F S T A      1
ACCTCCACAGTACTTCTTCTCTTATAGATCCCAACTCATCACTCAGCAAGAATCTTCA      61
T L H S T S S L Y R S Q L I T Q Q E S S      21
CCCAAAAATGCCACCACCACAACATTTTGAAGTCACAAAACCTATAAAAATTACCCAAA      121
P K N A T P T T F F E V T K P I K L P K      41
ACCAAACCTTTTTCACACCTAATCTTGAACATGATTTTGGTCCACCTACAGAAAACCC      181
T K P F S H L I L E H D F G S T Y R K P      61
CCAATTCTTGCTAACTACACACCCCTTTAATIGCCCATCTCAGAAAATTTCCAAAAT      241
P I L A N Y T P P F N C P S Q K F S K I      81
GTGCTGGAAATGGAGAGCAACTIGTAAAGGTAGACAATTTGATAGAATTTTGGTGTITGG      301
V L E W R A T C K G R Q F D R I F G V W      101
GITAGTGGGGTTGAGATTTTCAGAAGCTGCACCTGCTGAACCAACTAAAAATGGGATCTTT      361
V S G V E I F R S C T A E P T K N G I F      121
GGACTGTCAAGAAGGACATTACTAGGTATTTCTTCTTGTATGAAAAATCAAATCTTT      421
W T V K K D I T R Y S S L L M K N Q I F      141
GCTGTTTTATTTAGGGAATATTGTGATAGTACATACTGGTGTGTACCATGTGGAAAT      481
A V Y L G N I V D S T Y T G V Y H V E I      161
ITGTTTCACTTTTATCCTGCTAAAGTGAGATTGGGTGGATTGATCTGGGGCTGATTG      541
F V H F Y P A K V R L G G F D S G A D L      181
ATTGTTCCCATTTCAAGAAATATGCATITGAATGATGGGTTGGGTTTGGAGTTGAAAAT      601
I V P I S R N M H L N D G L W F E I E N      201
TCAGCAGATGTACAGTCAAAGGATTTCAAGATTTCCCAAAATGTGTATAGGGCTGTATTG      661
S A D V Q S K D F K I P P N V Y R A V L      221
GAAGTTTATGTTTCAITTCATGAGAATGATGAGTTTGGAAATGGGAATCCACCTAATGAG      721
E V Y V S F H E N D E F W N G N P P N E      241
TATATAAGTTCGAATAAICTTAGTATCGCGGGGAATGGAGCTTTCAGGGAGGTGGTGGT      781
Y I S S N N L S I A G N G A F R E V V V      261
AGTTTGGATGAAATGTTAGTTGGTGTAGTTTGGCTTTTACTGTGATCTATACTGGGGGT      841
S L D E M V V G V V W P F T V I Y T G G      281
GTTAATCCCCTCTTTTGGAGACCGATTAGTGAATGGATCGITCGATCTTCTTCTTAT      901
V N P L F W R P I S G I G S F D L P S Y      301
GACATTGAAATTACCCCGTTGTTAGGAAAGATTAGATGGAATAGTCATAAGATTTC      961
D I E I T P L L G K I L D G N S H K I S      321
TTGGAGTCACGGATGCTCTGAACGTGGTATGTTGATGCAAATTTGCATCTTGGTGG      1021
F G V T D A L N V W Y V D A N L H L W L      341
GACGGGAAAAGTAAGAAAACGGAAGGGAGTTGTTGAGATACAGCTTATTGCCCTTTCT      1081
D G K S K K T E G K L L R Y S L L P L S      361
TTATCGGTGCTGACCAATTTACAGGTTTGTGATGGATCCTTTATCACGAATGCTAGTAGG      1141
L S V L T N F T G F D G S F I T N A S R      381
TCCATCACATTGACCGAATGGTGAAGTCGCTTATGGAACCTACTACTAAGTCGCTCT      1201
S I T L T G M V K S S Y G T I T T K S S      401
CAAAGTTAAGTTATAGCAACCATATGGTAATGGGAAATGAAGGGAACCTGCAATAGTG      1261
Q S L S Y S N H M V M G N E G N L Q I V      421
GATCAGATAATCGAATTCATGATACTGTTTATGCCACGACGCCATCTTCTTATGTTTAC      1321
D Q I I E F N D T V Y A T T P S S Y V H      441
TCGCTTGAGTCCITCAAAAAGTATCTGTGAAGTTGTATCTGACAATGTAGATCAAGGA      1381
S L E S F K K Y L L K L Y S D N V D Q G      461
AACCAAAGCTATACTCGATAICAAACITGACGTTGGGATTAGATGACAAGAGGGTAAAG      1441
N Q S Y T S I S N L T L G L D D K R V K      481
GGTCCAAAGTATGGATCCTCAGTCAGCCTGTGAATAATTTGCAAAACCGCGCAGGGCTAT      1501
G S K Y G S S V S S V N N L Q N A Q G Y      501
ATGATTGTAAGGGCCACTTAGTAGTCAAGGACTTGGAAATACCAACAGTATATAAA      1561
M I V K G H L V V K G L G S T Q Q V Y K      521
CATAACGATGATTCGTTGCTACTCCAGGAACATAAGCAGCTCAAATTACACAATACTT      1621
H N D D S C C Y S R N I S S S N Y T I L      541
TACGATAAGGTAAGCAATAGCTGCAGCAATAGTACTTGGTCTCATTGGCCTTTGAGGATT      1681
Y D K V S N S C S N S T W S H W P L R I      561
GACAAAAGCGGCTCTTCTCTGGTTGA      1741
D K K R S L P G *      581

```

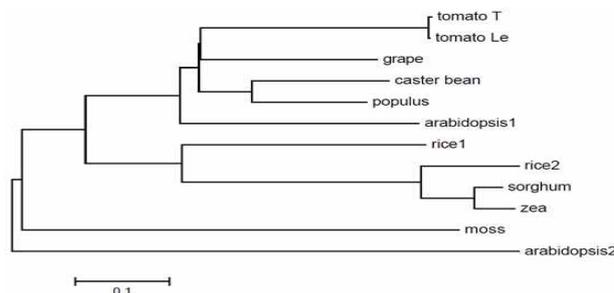
< 그림 328-3-2. 토마토 *PNGase* T 의 염기서열 및 아미노산 서열(밑줄: Signal sequence; 붉은 글씨: putative N-당질화 부위) >



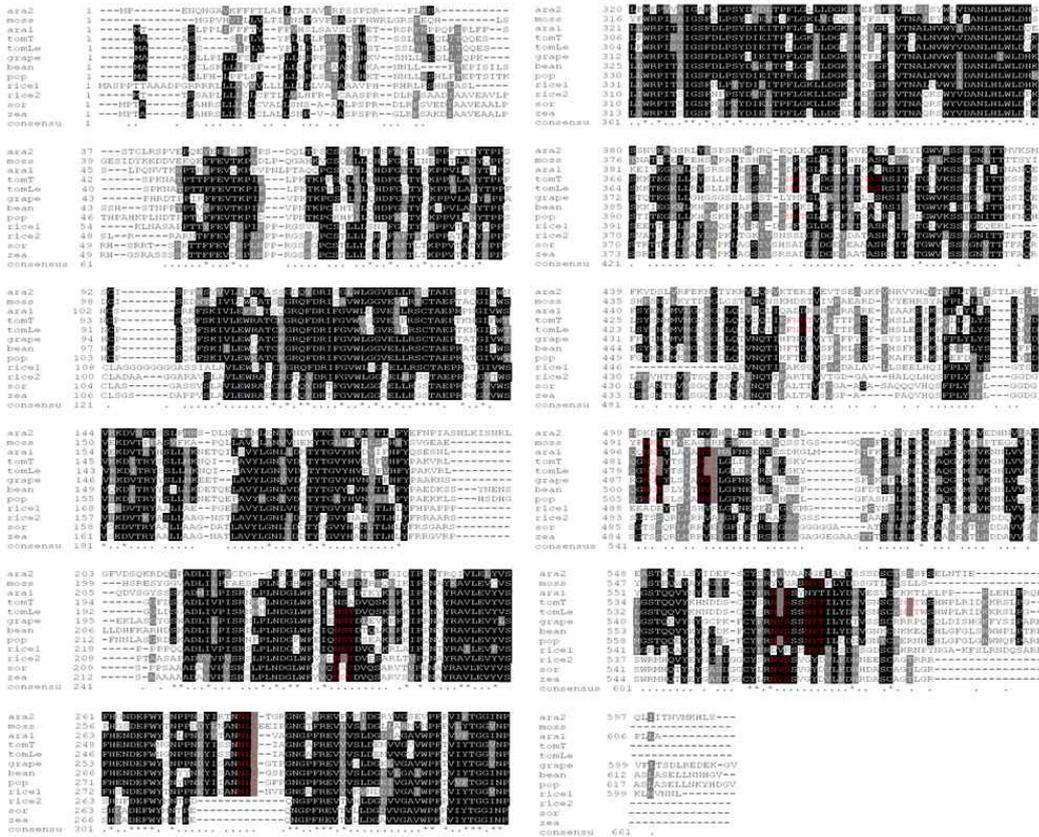
< 그림 328-3-3. 토마토 PNGase T T의 pI 값과 분자량 분석 결과 >

○ 다양한 식물체의 PNGase 유전자 multiple sequence alignment 분석

- 그동안 보고된 12개의 PNGase 유전자 member들의 N-당질화 부위를 비교해 보면 아미노산 서열에서 비교적 보존성이 높은 부위로는 6개가 존재하며 N-당질화 부위 주변으로 아미노산 서열의 유사성이 비교적 높은 부위가 존재하므로 이들 부위가 PNGase T의 활성부위일 것으로 판단되었다.
- 기존에 보고된 여러 식물체로부터 분리된 PNGase T 유전자를 비교해 본 결과 아미노산 서열상의 동일성은 castor bean, 포플라, 포도 등과는 약 61-62%의 동일성을 나타냈으며, 애기장대의 2개 gene members와는 각각 54%, 38%의 동일성을 나타냈고, 벼의 2개 PNGase T의 gene members와는 50%, 43%의 동일성을 나타냄. 다른 외떡잎 식물인 수수와 옥수수과 PNGase T와는 42%정도의 동일성을 나타내었다 (그림 328-3-5).
- 총 10종의 식물체로부터 분리된 12개의 PNGase 유전자의 단백질 서열을 분석한 계통수를 보면 PNGase T는 역시 PNGase-Le와 가장 높은 유연관계를 나타내었고 다음으로는 포도의 PNGase와 비교적 높은 유연관계를 나타내었다 (그림 328-3-4).



<그림 328-3-4. PNGase 아미노산 서열을 이용한 Neighbor-joining phylogenetic analysis >



< 그림 328-3-5. 토마토 PNGase T 와 다양한 식물종의 PNGase 유전자들의 multiple sequence alignment 분석 [붉은 글씨: putative N-당질화 부위; 검은 강조: conserved sequences; Arabidopsis 1,ara1(GenBank Accession No. NP188110); Arabidopsis 2,ara2 (NP568155); tomato,TomLe (FJ804752); PNGase T T;tomT (KM401550); moss (XP001764866); grape (XP002285454); castor bean (EEF37846); rice1 (EAZ10975); rice2 (BAB92157); popular,pop (XP002316856); sorghum,sor (XP002454967); zea (NP001152324)] >

(2) PNGase T 유전자 발현 조절 연구

(가) 세부연구의 수행내용 (재료 및 방법)

- 식물재료
 - Quantitative real time RT-PCR 분석을 위한 토마토 재료는 부여 토마토시험장에서 분양받은 토마토 (*Solanum lycopersicum L. cv Styx TY*) 과육으로부터 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 사용하였다.
- Total RNA 분리 및 cDNA 합성
 - Total RNA 분리는 TRI Reagent[®] (Molecular Research Center,Inc.)를 사용하여 4)항의 수행내용에 따라서 분리하여 cDNA 합성에 사용하였다. cDNA 합성은 1 μ g의 total RNA를 PrimeScript[™] 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc. Japan)를 사용하여 4)항의 수행내용과 동일하게 합성하였다.

○ Real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 분석

- Real time qRT-PCR 분석을 위하여 토마토 과육의 성숙 과정을 6단계의 stage를 나누어 조직을 수확하였는데 1단계는 mature green (MG), 2단계는 Turning (T), 3단계는 Orange (O), 4단계는 Orange-Red (OR), 5단계는 Light-Red (LR), 6단계는 Mature Red (MR) 로서 구분하였다. 각 단계의 토마토 과육에서 total RNA를 추출하여 cDNA 합성에 사용하였다. qRT-PCR을 이용하여 분석하고자 하는 유전자들의 특이적 primer는 제조사의 제작방법을 이용하여 제작하였고 (표 328-3-1), real-time qRT-PCR 분석은 Chromo 4™ Continuous Fluorescence Detector (MJ Research, MA, USA) 를 이용하여 수행하였다. Strip PCR tube에 iQ™ SYBR® Green supermix (2×, Bio-Rad, USA) 10 µl, Forward primer 0.25 µl, Reverse primer 0.25 µl, 합성한 cDNA 1 µl를 넣고 20 µl가 되도록 DEPC로 처리한 멸균수를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 15분 동안 holding 후 95°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초로 45 cycle 반응시킨 후 72°C에서 10분 처리하였으며, 95°C에서 65°C까지 0.2°C 간격으로 1초씩 melt curve stage를 진행하였다. 데이터 분석은 Opticon Monitor™ software version 3.1 (MJ Research, MA, USA) 을 이용하여 Applied Biosystems에서 제공한 Delta Delta CT 값을 기준으로 계산하여 비교하였다.

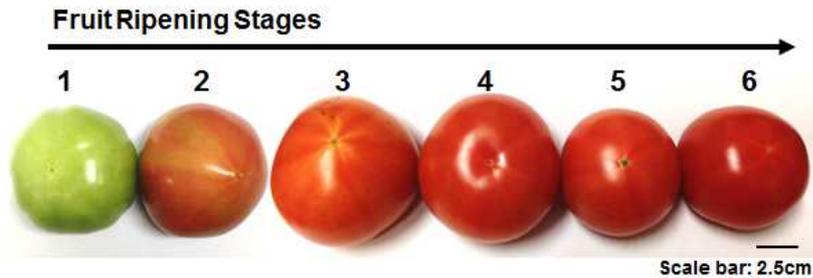
< 표 328-3-1. Real-time qRT-PCR 분석에 사용한 특이적 primer의 염기서열 >

Gene	Strand	Sequence
<i>LeActin</i>	Forward	CATGTTCCCTGGTATTGCTGA
	Reverse	ATCCTCCAATCCAGACACTGT
<i>PNGase T</i>	Forward	TGATGGGTTGTGGTTTGAGATT
	Reverse	ATTAGGTGGATTCCCATTTCAA
<i>LeMCA</i>	Forward	TCGTTACGGATTTGCTGAGGAAGACA
	Reverse	AGCAGGTAACCTAGTTCCATGTCCA
<i>LeACS2</i>	Forward	CGAGGATTCGGAGGTTTCGTAGGTGT
	Reverse	GGTGAGGGAGGAATAGGTGACGAAAG
<i>LeACS3</i>	Forward	CTATCCTGGATTCGATAGAGACCTCA
	Reverse	GGTTGGTCACTAGAACACCTTTCACT
<i>LeACS4</i>	Forward	GCAAGGATTCGGATGTTTATGGATGC
	Reverse	TGCTCGCACTACGAGCGAGGAATTG
<i>LeACS6</i>	Forward	TGATCCTGGTGATGCATTTCTAGTTC
	Reverse	CTTCTTCTAAGGCTTCTTTTGTTACC

나. 연구결과 및 고찰

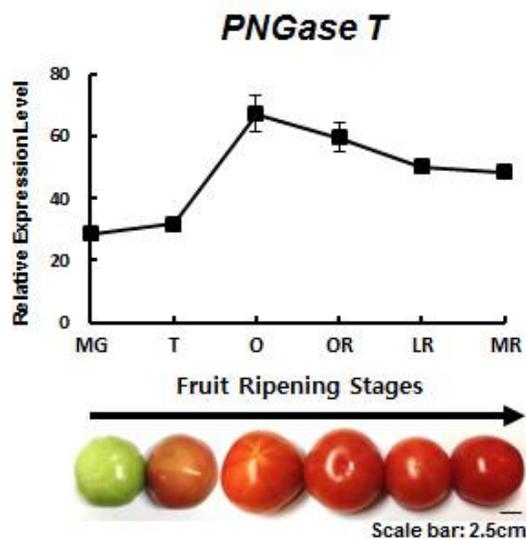
- N-glycanase로서 기존에 여러 식물체에서 유전자 분리가 보고된 *PNGase T*가 식물체의 발달과 분화 과정에서의 생리적 역할에 대하여 거의 연구된 바가 없기 때문에 이를 우선 조사하였다.
- 토마토 과육의 숙성에 따른 *PNGase T*의 전사 조절 분석

- 토마토 (*Solanum lycopersicum* L. cv Styx TY)의 과육의 성장이 완성된 이후 숙성 정도에 따라 녹색과에서부터 주황색 단계를 거치고 짙은 주황색을 거쳐 진행된 적숙과로 구분하여 6단계로 나누어 과육을 수확하였다. (그림 328-3-6)



< 그림 328-3-6. 토마토 과육 숙성의 6단계. 1단계, mature green(MG); 2단계, Turning(T); 3단계, Orange(O); 4단계, Orange-Red(OR); 5단계, Light-Red(LR); 6단계, Mature Red(MR) >

- 토마토 과육의 숙성과정에 따라 *PNGase T* 유전자의 발현은 비교적 높은 수준으로 constitutive하게 발현되는 양상을 보였다. 적색으로 전환되는 과정 (T 시기)에서 *PNGase T*의 전사체 양이 증가하여 오렌지색의 과육 (O 시기)에서 가장 높은 전사체 양을 보였다. 이후 적숙과로 이어지는 후숙되는 과정에서 *PNGase T*의 전사체 양은 점차 감소하였다 (그림 328-3-7).



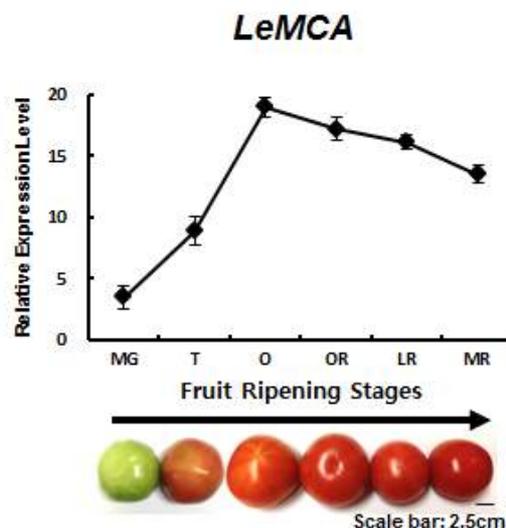
< 그림 328-3-7. 토마토 과육의 숙성 단계에 따른 *PNGase T* 유전자 발현의 qRT-PCR 분석 >

- *PNGase T*가 과육에서 비교적 높은 수준을 보일 정도로 constitutive 하게 발현되더라도 과육의 숙성과정에서 이의 전사체 양이 더욱 증가함으로써 과육의 숙성 및

노화과정에서 전사의 조절이 일어나는 것으로 여겨졌다.

○ 토마토 과육의 숙성에 따른 metacaspase 유전자의 발현 분석

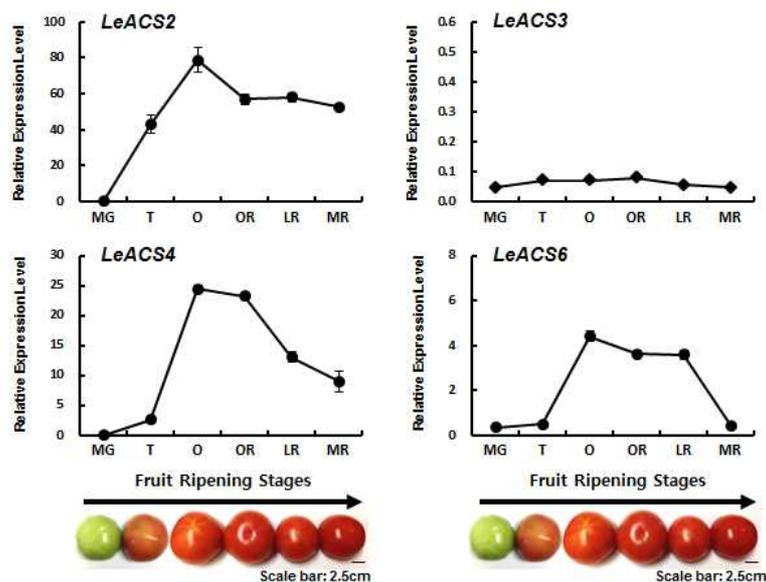
- 과육이 숙성되는 노화과정에서 작용하는 caspase-like proteolytic 활성 증가가 나타나게 되는데 이 때 관여하는 cysteine protease인 metacaspase type II 유전자의 전사체 양을 조사하였다.
- Metacaspase는 식물에서 병원균이 감염되었을 때 혹은 산화적 스트레스 등의 환경적 스트레스가 주어졌을 때 programmed cell death (PCD)를 초래하는데 관여할 뿐만 아니라 배발생 등 다양한 종류의 발달과정에도 관여하는 효소로서 세포 죽음의 마커로 활용된다.
- Metacaspase II의 유전자인 *LeMCA* 유전자는 역시 녹색과에서는 비교적 낮은 전사체 수준이었지만 과육이 숙성되어 노화되어 가는 과정에서 전사체량이 크게 증가하였다. 녹색과에서 오렌지색으로 전환되는 시기 (T 시기)에 *LeMCA*의 전사체량이 2.5배 증가하였으며, 이후 오렌지색(O 시기)에서 최대치를 기록하였는데 녹색과 시기에 비해 5.4배로 크게 증가하였다. 이후 점차 감소하였지만 적숙과에서 비교적 높은 수준의 *LeMCA* 전사체량을 보였다 (그림 328-3-8).
- 상기 결과는 protease일종인 metacaspase의 유전자 발현 패턴과 *PNGase T*의 발현패턴이 모두 오렌지과 상태에서 가장 높은 전사체량을 유지하는 점에서 서로 유사하였다. 따라서 *PNGase T*에 의해 당사슬이 절단되는 과정이 당단백질이나 그 외의 단백질 분자들이 노화나 PCD 등의 과정에서 분해되기 위해 일어나는 과정인지 혹은 이의 생성물인 당사슬이 어떤 의미있는 생리적 역할의 필요에 의해 일어나는 과정인지에 대한 보다 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 사료되었다.



< 그림 328-3-8. 토마토 과육의 숙성 단계에 따른 *LeMCA* 유전자 발현의 qRT-PCR 분석 >

○ 에틸렌 생합성 관련 유전자와의 상호관련성 분석

- *PNGase T*의 발현량이 토마토 과육의 숙성과정에서 크게 증가함으로 토마토 과육의 숙성과정에서 중요한 역할을 하는 식물호르몬인 에틸렌의 생합성에 관여하는 ACC synthase 유전자의 gene members와의 발현 패턴과 비교하였다.
- 토마토의 ACC synthase의 gene members는 최소한 7 isoform 이상이 존재할 것으로 여겨지며 토마토 과육에서는 과육이 숙성되는 과정에서 에틸렌의 생합성량이 증가하는데 특히 과육의 노화과정에는 *Le-ACS2*와 *Le-ACS6*가 관여하고 있으며 *Le-ACS3*은 과육이 성장하고 발달하는 과정에서 constitutive하게 발현되는 isoform으로 알려져 있다.
- 토마토 과육이 모두 녹색과에서는 *LeACS2*, *LeACS4*, *LeACS6* 거의 발현이 이루어지지 않다가 점차 숙성이 진행되면서 오렌지과 상태에서 3가지 isoform의 유전자가 모두 가장 높은 전사체량을 나타내었다 (그림 328-3-9).
- Reference 유전자인 *actin* 유전자와 비교한 상대적인 발현량이 가장 높은 isoform은 *LeACS2* 이었으며, 다음으로는 *LeACS4*와 *LeACS6* 순으로 나타났다.
- 과육의 발달 과정에서 작용하여 노화과정에서는 발현량이 급격히 감소하는 ACC synthase의 유전자 member인 *LeACS3*의 전사체는 토마토 과육에서는 거의 발현되지 않았다 (그림 328-3-9).
- 세포내에서 노화 특이적인 ACC synthase의 유전자 member들과 함께 거대분자의 가수분해가 수반되는 노화과정에서 특이적으로 발현이 증가하는 ACC synthase의 유전자 member들과 발현 패턴이 유사하였다.

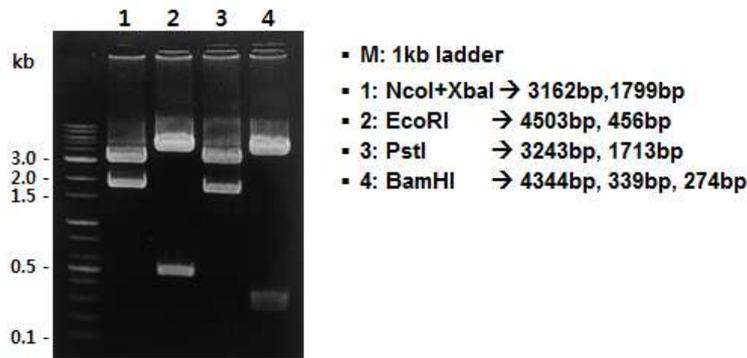


< 그림 328-3-9. 토마토 과육의 숙성 단계에 따른 에틸렌 생합성 유전자 발현의 qRT-PCR 분석 >

- 따라서 *PNGase T*의 전사체 발현량의 패턴은 세포 죽음과 관련된 가수분해 효소인 metacaspase의 전사체 발현과 과육의 숙성 및 노화와 관련된 ACC synthase의 유전자 members의 발현과 유사한 패턴을 나타내는 것으로 보아 *PNGase T*는 식물체에서 노화 특이적으로 발현되는 유전자인 것으로 사료되며 식물체 내에서 생성된 거대분자로서의 당단백질을 분해하는 효소로서도 작용하는 것으로 여겨졌다.
- 재조합 단백질을 생산하는 분자농업 과정에서 의학용 고부가가치 단백질을 생산하기 위하여 인체에서의 면역 부작용을 초래할 가능성이 있는 아스파라긴산 잔기에 부착되어 있는 당사슬을 제거하기 위해서 *PNGase T*를 활용할 때 *PNGase T*가 식물의 노화를 유도할 가능성이 있어 *PNGase T* 생산을 위한 재조합 단백질 생산용 식물체를 제조할 때 생산시기에 특이적으로 유도하여 발현되는 유도 프로모터를 사용하는 것이 더 바람직한 것으로 보였다.
- 다른 활용방안으로는 특정 시기에 발현되는 특이적 프로모터를 사용하여 일차적으로 형질전환함으로써 *PNGase T* 발현 유도 작물을 제조한 후 이에 다시 특정 의학용 재조합 단백질 유전자를 도입하여 *PNGase T*와 특정 의학용 단백질을 동시에 발현되는 식물체를 제조한다면 단백질 분리 후 N-당사슬을 제거하는 공정을 생략할 수 있을 것이며, 이는 재조합단백질의 처리 공정을 단순화시켜 보다 경제적으로 의학용 재조합 단백질을 생산할 수 있을 것으로 사료되었다.
- 특히 *PNGase T*의 유전자의 염기서열 유사성이 60% 정도에 불과하므로 가지과 식물로서 담배 식물체나 토마토 식물체에서 재조합단백질을 생산할 경우 N-당사슬을 절단하기 위해서 비교적 단백질의 유사성이 높은 토마토 유래 *PNGase T*를 활용하는 것이 아몬드 유래의 *PNGase A* 나 박테리아 유래의 *PNGase F*보다 더 효과적일 것으로 사료되었다.

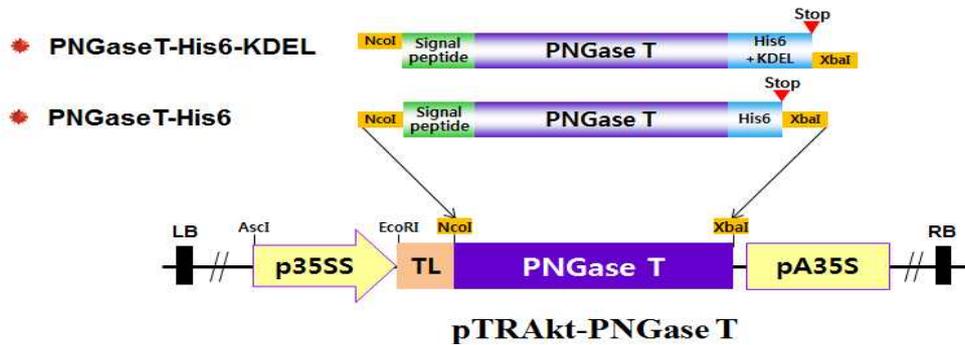
(3) *PNGase A* 고발현 형질전환체 확보

- ① 식물체 발현용 토마토 *PNGase T* 재조합 단백질 construct 제작
 - *PNGase T* 유전자의 5' -region의 ER signal peptide 서열은 그대로 사용하였다.
 - 3' -region은 단백질 정제 시 Ni-NTA를 이용한 affinity chromatography 정제하기 위하여 C-말단에 His6-taq 서열 (CATCATCATCATCATCAT)을 삽입하였으며, 단백질 생성 후 ER에 retention시키기 위해서 KDEL 서열 (AAGGATGAACTT)을 융합한 재조합 *PNGase T* construct를 제조하여 pBlunt TOPO 벡터에 클로닝하였다.
 - 추가적으로 3' -region에 KDEL 서열 없이 His6-tag 서열만 융합한 재조합 *PNGase T* 유전자를 pUC118 벡터에 삽입한 construct도 클로닝되었음을 확인하였다 (그림 328-3-10).
 - 이후 이들 constructs를 식물발현용 벡터에 삽입하는 실험을 진행하였다.

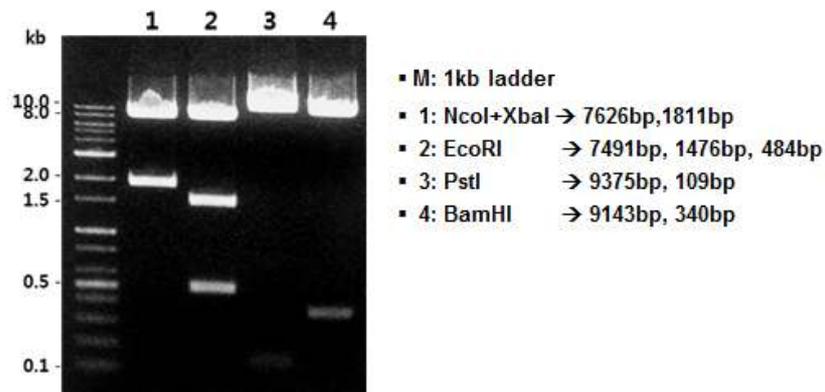


< 그림 328-3-10. KDEL 서열이 없는 PNGase T 의 pUC118 벡터로의 클로닝 >

- 1차년도에 확립된 식물에서 고효율로 발현되는 재조합 단백질 발현용 시스템 (pTRAKt vector)에 *PNGase T* 유전자를 도입하기 위한 construct를 디자인하였다 (그림 328-3-11).
- 제한효소 *Nco I*과 *Xba I* 사이에 *PNGase T* 유전자를 삽입하여 클로닝하여 최종적으로 염기서열까지 확인하여 식물 발현 벡터에 클로닝 되었음을 확인하였다 (그림 328-3-12).



< 그림 328-3-11. 재조합 PNGase T 유전자가 삽입된 2종의 식물 발현 벡터의 유전자 구조 >



< 그림 328-3-12. 식물체 발현용 벡터에 클로닝 후 합성된 토마토 PNGase T의 유전자에 대한 제한효소 mapping >

○ 재조합 토마토 유래 *PNGase T* 유전자 (*PNGase T*)의 식물발현 construct는 최종적으로 완성되었으며 형질전환식물체 및 형질전환 담배배양세포 개발을 위하여 사용하였다.

② 토마토 유래 *PNGase T* 단백질의 고발현 형질전환 담배 식물체의 확립

㉞ 세부연구의 수행내용 (재료 및 방법)

○ *Agrobacterium*-mediated 형질전환

- 담배 식물체의 형질전환은 야생형 담배의 잎 절편(0.5cm²)을 *Agrobacterium tumefaciens* 배양액에 1분 동안 감염시킨 후 MS shooting 유도배지 (MS salt+ 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BAP) 에 치상하여 2일 동안 암 배양하였다. 공조배양이 끝난 후 담배 잎 절편은 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 250mg/L cefotaxime이 첨가된 MS shooting 배지에 옮겨 일주일간 암 배양하였다. 그 이후 250mg/L cefotaxime과 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS shooting 배지로 옮겨 2주 간격으로 계대배양 하면서 형질전환된 라인을 선별하였다.
- 약 2~3달 후, 담배 잎 절편의 캘러스로부터 신초가 형성된 개체를 선별하여 호르몬이 첨가되지 않은 MS free 배지에 옮겨 뿌리를 유도하였으며 뿌리가 안정적으로 유도된 조직을 배양토에 옮겨 순화시킨 후 순화가 완성된 식물체를 온실에서 생육시켰다.

○ 도입유전자 확인을 위한 Genomic DNA 분리

- Genomic DNA는 NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel)를 사용하여 분리하였다. 100 mg의 잎 조직을 액체질소로 곱게 갈아 400μl의 PL1 buffer와 10 μl의 RNase A를 넣어 섞은 후 65°C에서 10분간 반응시켜 NucleoSpin Filter (violet ring)에 혼합액을 넣어 11,000×g 에서 2분간 원심분리한 후 상층액을 450 μl의 Buffer PC를 넣어 섞어주었다. 이 혼합액을 Nucleospin Plant II Column (green ring)에 넣어 11,000×g 에서 2분간 원심분리한 후 상층액을 PW1과 PW2 용액을 이용한 세척단계를 거쳐 마지막에 Nucleospin Plant II Column 중앙에 50μl의 Buffer PE를 넣어 10,000×g 에서 2분 원심분리하여 genomic DNA를 용출하여 분리하였다.

○ PCR 분석을 통한 *PNGase T* 유전자 삽입 확인

- 상기 방법에서 분리한 genomic DNA를 이용하여 특이적 primer를 사용하여 genomic DNA PCR을 실시해 토마토 *PNGase T* 유전자 (1,767bp) 가 담배 식물체에 삽입되었는지 확인하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension 과정을 35 cycle로 수행한 후 72°C에서 10분간 final extension을 수행하였고, PCR product는 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동 함으로써 목적 DNA의 증폭 여부를 확인하였다.

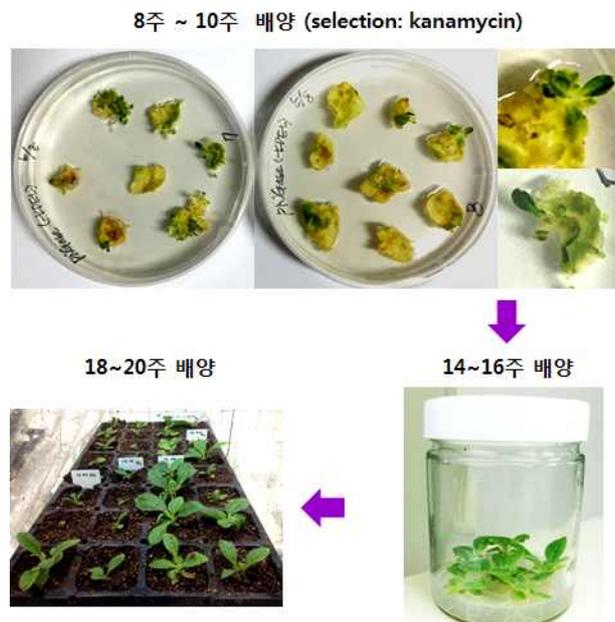
○ 광합성능 및 표현형 조사

- 광합성능은 잎의 광계II 복합체의 최대효율 (F_v/F_m)을 엽록소 형광측정기 (PAM-2100, Walz, Germany)를 이용하여 진동폭 조절방식을 통해 측정하였다. $1,500\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광량을 4초로 조절하여 최소 엽록소형광 (F_0), 최대 엽록소형광 (F_m) 및 광계II의 광화학적 효율 (F_v/F_m)을 측정하였다. F_v 는 $F_m - F_0$ 로 계산하는데 F_m 은 최대 형광도로 포화광 파동에 의해 결정되어지며, F_0 는 최소 형광도로 조절빔에 의해 결정된다. 그리고 PamWin3 소프트웨어(Walz)를 이용하여 데이터를 분석하였다.
- 야생형 식물체와 토마토 유래 *PNGase T* 유전자의 형질전환 담배식물체를 온실에서 생육하는 동안 이들 식물체에의 표현형을 조사하였다. 식물체 신장(cm), 마디의 개수, 잎의 면적을 조사하였고, 잎의 면적은 엽면적계(model 3100; LI-COR, Lincoln, NE)를 이용하여 측정하였다.

㉞ 연구결과 및 고찰

○ KDEL 서열이 포함된 재조합 *PNGase T (+His6+KDEL)* 유전자의 담배식물체로의 형질전환

- 토마토 유래 재조합 *PNGase T (+His6+KDEL)* 유전자가 도입된 *Agrobacterium* 균주를 배양하여 담배 잎 절편에 감염시켜 형질전환 시켰다.
- 250 mg/L cefotaxime과 50 mg/L kanamycin이 포함된 MS shooting 배지에서 지속적으로 계대배양 하였으며 항생제 선발로부터 살아남은 형질전환체는 뿌리 유도배지에 옮겨 흙에 순화시켰다 (그림 328-3-13).

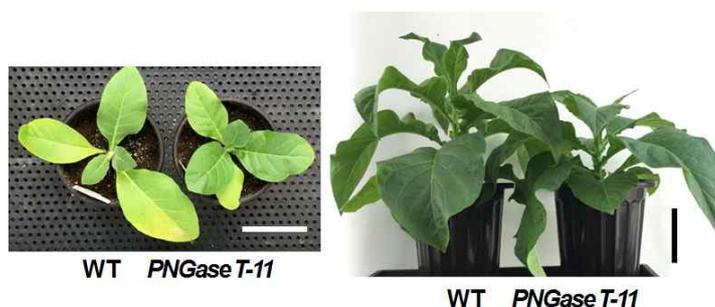


< 그림 328-3-13. 재조합 *PNGase T* 유전자의 형질전환 담배 식물체 제조 과정 >

- 지속적으로 형질전환 실험을 반복하였으며 531개의 담배 잎 절편을 감염시켜 항생제 선발로부터 신초가 형성되어 살아남은 형질전환체는 25개로서 형질전환 효율이 4.7% 이었다.
- 살아남은 형질전환체중 15개를 뿌리유도배지에 옮겨 뿌리가 유도된 2개의 독립적인 형질전환 담배 식물체 (*PNGase T-10*, *PNGase T-11*)를 최종 선발하였다 (그림 328-3-14, 328-3-15).

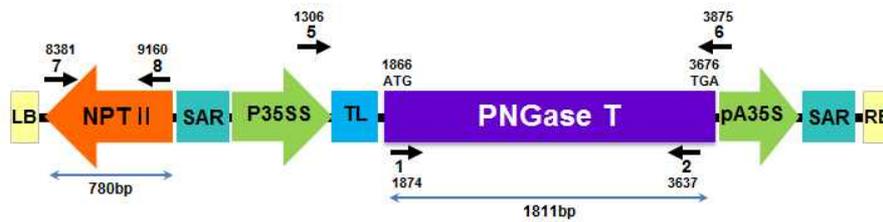


< 그림 328-3-14. 온실에서 생육중인 *PNGase T-10* 형질전환 식물체. (좌: 흡에서 배양 6주째 생육, 우: 흡에서 배양 12주째 생육) >



< 그림 328-3-15. 온실에서 생육중인 *PNGase T-11* 형질전환 식물체. (좌: 흡에서 배양 4주째 생육, 우: 흡에서 배양 8주째 생육) >

- 재조합 *PNGase T* 형질전환 식물체에서의 genomic DNA PCR 분석
 - Genomic DNA PCR 확인을 위하여 그림 328-3-16과 같이 재조합 *PNGase T (+His6+KDEL)* 유전자 construct 내의 6개의 특이적 primer region을 디자인하여 PCR 분석에 이용하였다.
 - 1번과 2번의 primer는 담배 식물체에 삽입한 토마토 *PNGase T* 유전자의 full-length가 증폭될 수 있는 부위이고 3번 ~ 6번 primer는 *pTRAkt* 벡터 내의 부위였다 (그림 328-3-16, 표 328-3-2).



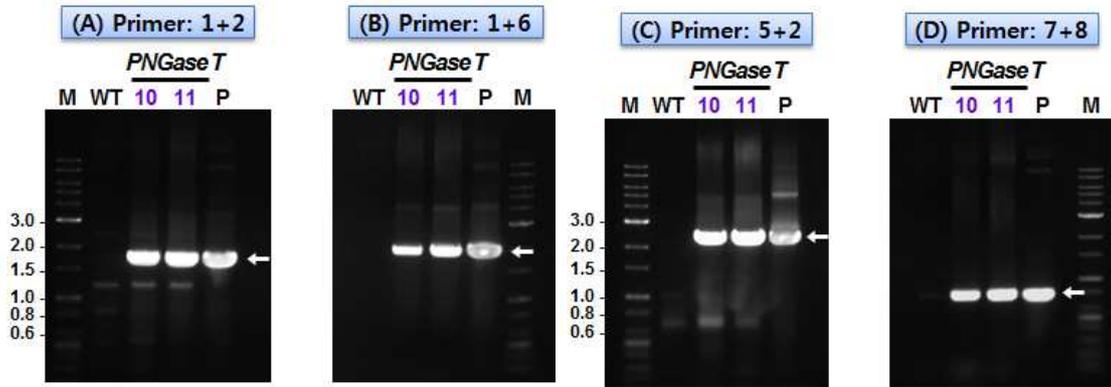
< 그림 328-3-16. pTRAkt 벡터에 삽입된 PNGase T 유전자 construct와 특이적 primer 위치 >

< 표 328-3-2. Genomic DNA PCR에 사용한 특이적 primer 서열 >

Primer	Sequence
1: PNGase T-S1	GGA TGG CTG CCT CCT CTT CC
2: PNGase T-AS1	GGC AGG AAG AGA CCG CTT TTT G
3: pTRAkt-AS	CTA AGG GTT TCT TAT ATG CTC AAC
4: P35SS-F	ATA CAT GGT GGA GCA CGA CA
5: NPTII-F	GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG
6: NPTII-R	GAT GGA TTG CAC GCA GGT TCT

- 라인 *PNGase T-10*과 라인 *PNGase T-11*의 형질전환 담배 식물체의 잎 조직에서 genomic DNA를 분리한 후 각각의 primer를 사용하여 genomic DNA PCR을 실시해 *PNGase T* 유전자가 담배 식물체에 잘 삽입되었는지 agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.
- 1번과 2번 primer로 PCR을 수행한 경우 토마토 *PNGase T* 유전자의 full-length 절편이 증폭되었으며 라인 *PNGase T-10*과 라인 *PNGase T-11*의 형질전환 담배 식물체에서 1,811bp의 밴드가 확인되었다 (그림 328-3-17A).
- pTRAkt 벡터에 삽입된 *PNGase T* 유전자 주변 벡터 서열의 primer로 이용하여 PCR 한 경우 라인 *PNGase T-10*과 라인 *PNGase T-11*의 형질전환 담배 식물체에서 모두 2,001bp와 2,332bp의 PCR 밴드를 각각 확인되었다 (그림 328-3-17B, 17C).
- 항생제 kanamycin 저항성 유전자인 neomycin phosphotransferase II (NPT II) 유전자의 primer로 PCR 한 경우 라인 *PNGase T-10*과 라인 *PNGase T-11*의 형질전환 담배 식물체에서 모두 780bp의 밴드를 확인하였다 (그림 328-3-17D).

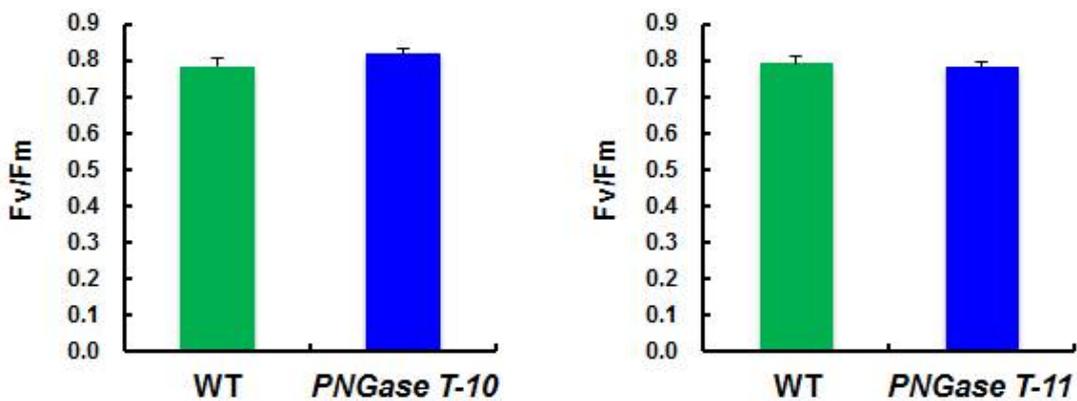
Plant \ Primer	1 & 2 (1,811bp)	1 & 6 (2,001bp)	5 & 2 (2,332bp)	7 & 8 (780bp)	Transgenic plant 판단 (확정)
WT	X	X	X	X	
# 10 (<i>PNGase T-10</i>)	O	O	O	O	O
# 11 (<i>PNGase T-11</i>)	O	O	O	O	O



< 그림 328-3-17. 형질전환 담배 식물체에서 (라인 PNGase T-10과 라인 PNGase T-11)에서 genomic DNA PCR 확인 >

○ 재조합 *PNGase T* 형질전환 식물체의 광합성능 및 표현형 조사

- 식물세포에서 당단백질의 당사슬의 생리적 기능에 대해 연구된 내용은 거의 없는 편이며 최근 연구 결과를 보면 병원균 인지를 비롯하여 세포간의 상호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지면 조직의 분화 등에도 생리적 기여를 할 것으로 예상되고 있다 (Haweker et al. 2010).
- 생리학적 관점에서 광합성능을 조사한 결과 토마토 유래 *PNGase T* 유전자가 도입된 라인 *PNGase T-10*과 라인 *PNGase T-11* 과 야생형 식물체 사이의 큰 차이를 보이지는 않았다 (그림 328-3-18).



< 그림 328-3-18. 형질전환 담배 식물체에서 (라인 PNGase T-10과 라인 PNGase T-11)에서 광합성률 측정 >

- 이들 형질전환 식물체 라인 라인 *PNGase T-10* 는 야생형 보다 성장 정도가 약간 증가하였고 빠르게 개화되었으며 라인 *PNGase T-11*은 비교적 야생형과 성장속도가 유사하였으므로 표현형에서는 큰 차이가 발생하지는 않았다 (표 표 328-3-3).

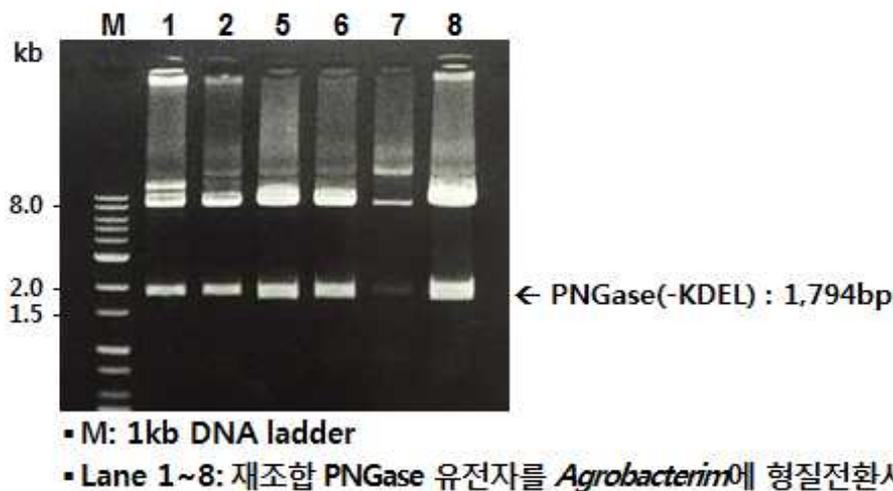
< 표 328-3-3. Wild type과 PNGase T 형질전환 식물체에서 생물량 조사

	WT	<i>PNGase T-10</i>
Plant height (cm)	64	69
Leaf area (cm ²)	383	202
Number of node	27	21
	WT	<i>PNGase T-11</i>
Plant height (cm)	37	26
Leaf area (cm ²)*	342	262
Number of node	16	14

*잎면적은 아래부터의 순서로 10, 11, 12번째 잎면적의 평균값임

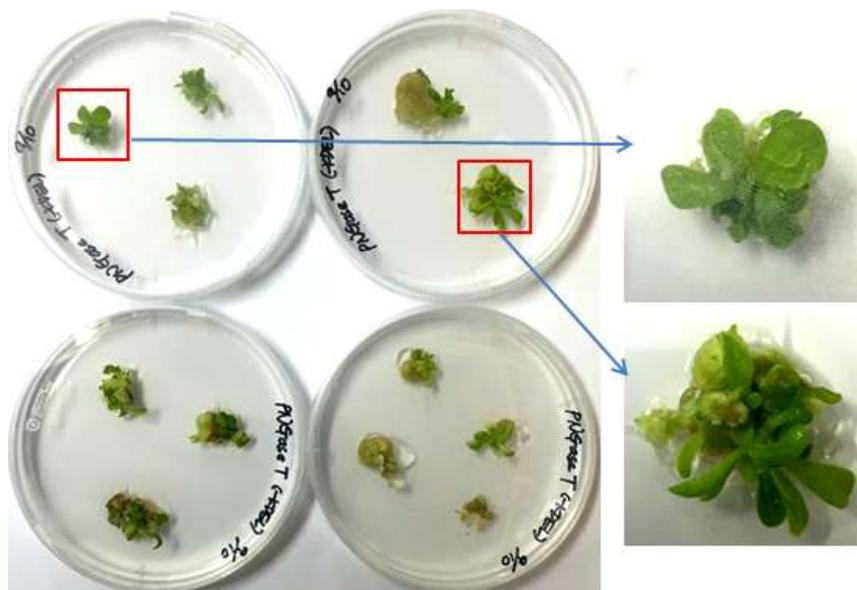
○ KEDL 서열이 없는 재조합 *PNGase T (+His6)* 유전자의 *Agrobacterium* 내로의 형질전환 및 형질전환 균주 선발

- 식물발현 벡터에 삽입된 KEDL 서열이 없는 재조합 *PNGase T (+His6)* 유전자를 *Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환을 위해 Triparental mating을 방법을 통하여 *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101)에 형질전환 하였다.
- 형질전환 균주 8개를 배양하여 plasmid DNA를 분리한 후 제한효소 *Nco* I과 *Xba* I을 처리하여 KEDL 서열이 없는 1,794bp의 *PNGase T (+His6)* 유전자의 삽입을 확인하였다 (그림 328-3-19).



< 그림 328-3-19. KDEL 서열이 없는 재조합 *PNGase T (+His6)* 유전자의 형질전환 균주 선발 >

- KDEL 서열이 없는 재조합 *PNGase T (+His6)* 유전자의 담배식물체로의 형질전환
 - 토마토 유래 재조합 *PNGase T (+His6)* 유전자가 *Agrobacterium*에 도입된 균주 #8의 배양액을 담배 잎 절편에 감염시켜 형질전환 시켰다 (그림 328-3-20).
 - 지속적으로 형질전환 실험을 반복하였으며 430개의 담배 잎 절편을 감염시켜 항생제 선발로부터 신초가 형성되어 살아남은 형질전환체는 70개로서 형질전환 효율이 16.3%이었다.



< 그림 328-3-20. 항생제 포함 배지에서 KDEL 서열이 없는 재조합 *PNGase T (+His6)* 유전자가 도입된 담배 잎 절편 선발 (8주째 배양) >

- 재조합 *PNGase T* 유전자의 형질전환 효율면에서 보면 KDEL 서열이 없는 재조합 *PNGase T (+His6)* 유전자의 형질전환 효율이 16.3%로서 KDEL 서열이 포함된 *PNGase T (+His6+KDEL)* 유전자의 형질전환 효율보다 3.5배 증가하였다.
- ER에서는 정확하게 folding된 단백질을 ER 밖으로 내보내는 역할을 하는데 folding이 제대로 이루어지지 않은 많은 단백질이 ER에서 유지되고 단백질의 aggregation이 촉진되어 결국 ER이 수행하는 여러 기능들의 항상성이 붕괴되어 ER stress가 일어나 결국 이 stress 신호는 ER 밖으로 전달되어 세포 전체의 스트레스 반응을 초래하게 되므로 형질전환 효율이 낮은 것으로 판단된다.
- 따라서 *PNGase T (+His6+KDEL)* 유전자의 담배 잎 절편의 형질전환 효율이 낮은 이유는 KDEL 서열의 유무에 따른 ER stress 영향으로 보여졌다.

(3) PNGase T 단백질 발현 수율 및 특성 분석

(가) 세부연구의 수행내용 (재료 및 방법)

○ 식물재료

- 토마토 유래 *PNGase T (+His6+KEDL)* 유전자가 도입된 형질전환 담배식물체 라인 *PNGase T-10*과 *PNGase T-11*의 잎 조직을 수확하여 total RNA 분리와 total 단백질 분리에 사용하였다.

○ Total RNA 분리

- Total RNA 분리는 액체질소에서 약 0.1 g의 조직을 막자사발로 완전히 마쇄한 후 1 ml의 TRI Reagent[®](Molecular Research Center, Inc.)와 30초간 vortex하여 혼합한 뒤 실온에서 5분간 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻는 상등액을 새 tube에 옮기고, 0.1ml의 BCP (1-bromo-3-chloropropane)를 첨가하여 30초간 vortex하여 혼합하고, 5분간 실온에 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리를 재차 수행하여 얻은 상등액을 새로운 tube에 옮기고 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 RNA를 침전시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전된 RNA pellet은 70% 에탄올로 세척하였고 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) 증류수에 녹여 spectrophotometer (UV-1601; Shimadzu, Japan)를 이용하여 RNA 순수도 및 양을 확인한 후 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

○ RT-PCR 및 cDNA 합성

- 유전자 클로닝 및 유전자 발현 분석을 위해 필요한 1st strand cDNA는 PrimeScript[™] 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc. Japan) 를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 합성하였다. cDNA 합성의 주형으로는 1µg의 total RNA를 사용하였으며, oligo dT primer를 사용하여 1st strand cDNA를 합성하였다.

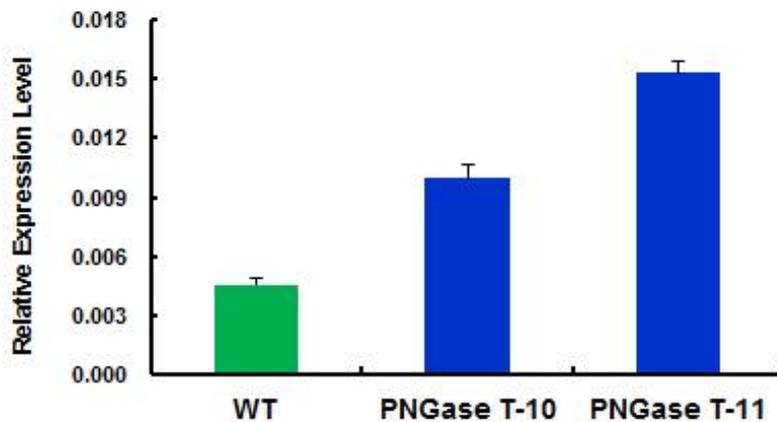
○ Real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 분석

- Real time qRT-PCR 분석을 위하여 상기 명시한 방법으로 total RNA를 추출하여 cDNA 합성에 사용하였다. qRT-PCR을 이용하여 분석하고자 하는 유전자들의 특이적 primer는 제조사의 제작방법을 이용하여 제작하였다. Real-time qRT-PCR 분석은 Chromo 4[™] Continuous Fluorescence Detector (MJ Research, MA, USA) 를 이용하여 수행하였다. Strip PCR tube에 iQ[™] SYBR[®] Green supermix (2×, Bio-Rad, USA) 10 µl, Forward primer 0.25 µl, Reverse primer 0.25 µl, 합성한 cDNA 1 µl를 넣고 20 µl가 되도록 DEPC로 처리한 멸균수를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 15분 동안 holding 후 95°C에서 15초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초로 45 cycle 반응시킨 후 72°C에서 10분 처리하였으며, 95°C에서 65°C까지 0.2°C 간격으로 1초씩 melt curve stage를 진행하였다. 데이터 분석은 Opticon Monitor[™] software version 3.1 (MJ Research, MA, USA) 을 이용하여 Applied Biosystems에서 제공한 Delta Delta CT 값을 기준으로 계산하여 비교하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

○ 형질전환 담배 식물체에서 토마토 *PNGase T* 전사체 생성량 분석

- 토마토 유래 *PNGase T (+His6+KDEL)* 유전자가 도입된 형질전환 담배 식물체 2개 라인 (*PNGase T-10*, *PNGase T-11*)에서 발현된 토마토 *PNGase T* 유전자의 전사체 양을 확인하기 위하여 담배와 토마토의 *PNGase* 유전자의 multiple alignment 분석에 의해 3' 말단 region에서 토마토 *PNGase*의 특이적 primer를 디자인하였다(그림 328-3-22).
- 형질전환 담배 식물체에서 토마토 *PNGase* 유전자의 특이적 primer 정보
 - o Forward primer : 5'- GAT GAT TCG TGC TGC TAC TCC - 3'
 - o Reverse primer : 5'- TCA ACC AGG AAG AGA CCG CTT - 3'
- 상기 확보한 *PNGase T* 형질전환 담배 식물체 2개 라인에서 토마토 *PNGase T* 유전자의 전사체 양을 확인하기 위해 RNA 분리 후 cDNA를 합성하여 real-time qRT-PCR을 수행하였다.
- Reference gene으로는 house keeping gene인 actin을 증폭하여 토마토 *PNGase T* 유전자의 전사체 양을 확인한 결과 라인 *PNGase T-10* 형질전환 담배 식물체는 WT에 비해 토마토 *PNGase T* 유전자의 전사체 양이 2.2배 증가하였고, 라인 *PNGase T-11* 형질전환 담배 식물체는 WT 보다 3.3배 증가하였다 (그림 328-3-21).
- 따라서 토마토 유래 *PNGase* 유전자가 형질전환된 담배 식물체 2종 (*PNGase T-10*, *PNGase T-11*)은 토마토 *PNGase* 유전자 (*35S::PNGase T-His6-KDEL*)가 담배 식물체 chromosome 내에 안정적으로 잘 도입되었으며 mRNA의 발현 수율이 WT 보다 더욱 증가됨을 확인하였고 특히 라인 *PNGase T-11* 형질전환 담배 식물체에서 *PNGase T* 유전자의 발현 효과가 더 좋았다.



< 그림 328-3-21. *PNGase T* 형질전환 담배 식물체에서 토마토 *PNGase* 유전자 발현의 qRT-PCR 분석 >

```

tobacco  TGTAAGGGCCAGTTAGTAGTCAAAGGACTTGGGAGTACTCAACAAGTATATAAATATAA
tomato    tgtaagggccact tagt agt caaaggact t ggaagtacccaacaagt at at aaacataa
*****

tobacco  CGAAGATTCATTGTGCTACTCGAGGAACATAAGCAGCTCAAATTACACGATACTTTACGA
tomato    cgat gat t cgt gct gct act cc aggaacat aagcagct caaat tacacaatact t tacga
*****
F
tobacco  TAAAGTGAGCAATAGCTGCAGCAAAGTACCAGGTCTCGCTTTCCTTTGAGGGATCTTTC
tomato    taaggt aagcaat agct gcagcaat agt act t ggt ct cat tggcct t t gaggat t gacaa
*****

tobacco  TGCAATCTAATCTTGGTGATGATAATGTTGGTAATTGACTTTGCTCCATGCGATTATCTT
tomato    aaagcgg t c t c t t c c t t g g t l g a -----
*****
R

```

< 그림 328-3-22. 토마토와 담배 PNGase 유전자의 multiple alignment 분석 >

○ 형질전환 담배 식물체에서 담배 *PNGase* 유전자의 전사체량 분석

- 토마토 *PNGase T*의 유전자 발현이 내생적인 담배 *PNGase* 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.
- 토마토와 담배의 *PNGase* 유전자의 염기서열을 이용하여 multiple alignment 분석을 해보면 85.4%의 동일성을 나타내는데 primer 디자인은 담배와 토마토의 *PNGase* 유전자의 5' 말단과 3' 말단 region에서 담배의 *PNGase*의 특이적 primer를 디자인하여 토마토 *PNGase T*가 증폭되지 않도록 설계하였다 (그림 328-3-23).
- 담배 *PNGase* 유전자의 특이적 primer 정보
 - o Forward primer : 5'- CTA TCA TCA ATG GCT ATT TCT - 3'
 - o Reverse primer : 5'- TCA TCA CCT AGA TTA GAT TGC - 3'

```

tobacco  TTTACTCTACATCTACACTATATTCACCTGCTTATGCTCAAACTATCATCAATGGCTAT
tomato    -----atg gct g c t c
*****

tobacco  TTCITTAATTTTCTTAGCTTATTTCTTACTACTGCAACAACCCCTTTTTCACAGCAAA
tomato    ctcttccattttcttagtttatttcttg-----ctacccttattttccacagcaacct
*****

tobacco  TCTCCACACTTCTTCTCTTTAGACCACAACCTCATCACTCAGCTAAATCTTTACAAA
tomato    ccacagtacttcttctttatagatcccaactcatcactcagcaagaatcttcaoccaa
*****

tobacco  CGAAGATTCATTGTGCTACTCGAGGAACATAAGCAGCTCAAATTACACGATACTTTACGA
tomato    cgatgat t cgt gct g c t c t c t a c t c c a g g a a c a t a a g c a g c t c a a a t t a c a c a a t a c t t t a c g a
*****

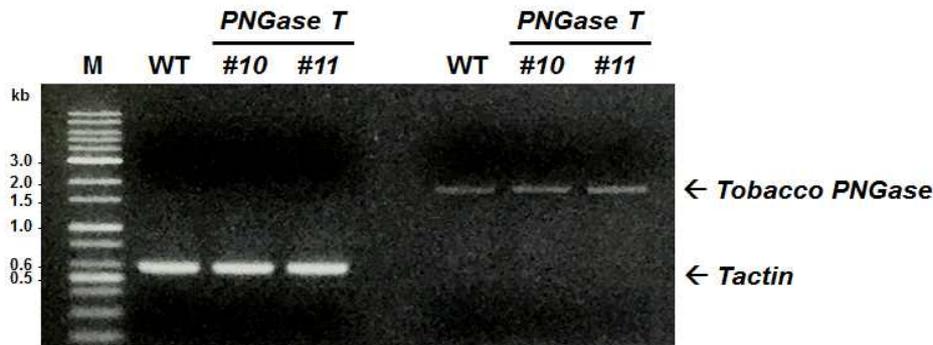
tobacco  TAAAGTGAGCAATAGCTGCAGCAAAGTACCAGGTCTCGCTTTCCTTTGAGGGATCTTTC
tomato    taaggt a a g c a a t a g c t g c a g c a a a a g t a c c a g g t c t c g c t t t c c t t t g a g g g a t c t t t c
*****

tobacco  TGCAATCTAATCTTGGTGATGATAATGTTGGTAATTGACTTTGCTCCATGCGATTATCTT
tomato    aaagcgg t c t c t t c c t t g g t l g a -----
*****
R

```

< 그림 328-3-23. 토마토와 담배 PNGase 유전자의 multiple alignment 분석 >

- RT-PCR을 수행한 결과 야생형 식물체에 비해 토마토 *PNGase T*의 형질전환 식물체에서 담배 *PNGase* 유전자의 발현이 다소 증가하였으나 큰 차이는 보이지 않았지만 토마토 *PNGase T* 유전자의 발현도 일부 증폭이 된 것으로 보여졌다 (그림 328-3-24).



< 그림 328-3-24. PNGase T 형질전환 담배 식물체에서 담배 PNGase 유전자 발현의 RT-PCR 분석 >

(4) PNGase T 고생산 식물체의 안정적 발현 line 확립

(가) 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

○ 단백질 분리 및 정제

- 재조합 *PNGase T* construct가 도입된 *PNGase T-10*, *PNGase T-11* 형질전환 담배식물체의 잎 조직에서 10g을 채취하여 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's 방법을 사용하여 정량하였다.
- 추출한 전체 단백질을 Ni-NTA agarose를 이용하여 His-tagged protein 정제를 수행하였는데 마지막 단계로서 250mM imidazole이 첨가된 elution buffer로 0.5ml씩 4개 tube에 받아 정제된 단백질은 정량하여 SDS-PAGE와 Western blot 분석에 사용하였다.

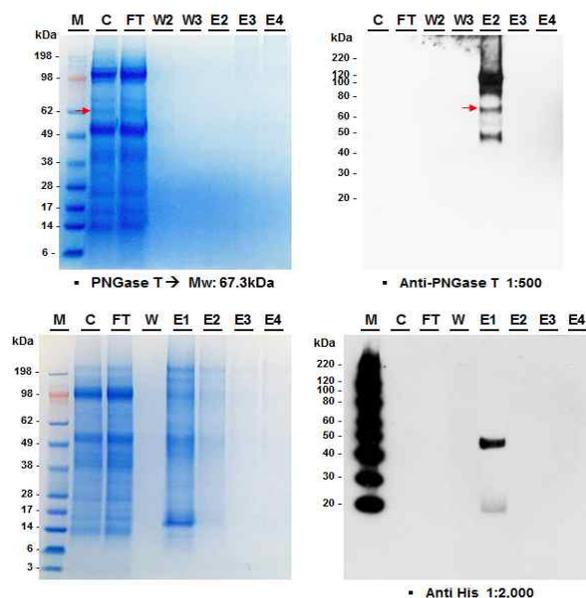
○ Western 분석

- 분리된 단백질을 4~12% Bis-Tris Plus gel (novex by Life technologies)에 전기영동한 후 iBlot[®]2 gel Transfer Device (novex by Life technologies)을 이용하여 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이후 iBind[™] Westen Device (novex by Life technologies)을 사용하여 iBind[™] Card에 nitrocellulose membrane을 올려놓은 다음 PNGase antibody와 6×His Tag monoclonal antibody (ThermoFisher, Cat #MA1-21315)와 Secondary antibody Enzyme conjugate anti-mouse IgG:HRP (Santa cruz)를 1×iBind[™] Solution (novex by Life technologies)에 각각 적당한 비율로 희석하여 실온에서 3시간 반응한 후 증류수로 세척하였다. 이후 nitrocellulose membrane을 SuperSignal West Substrate Working Solution (Thermo)에 blot을 5분

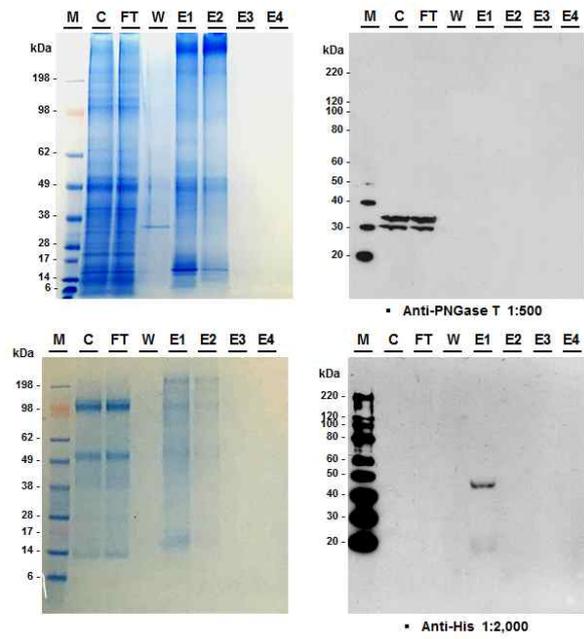
동안 반응시켰다. 시약을 제거한 후 깨끗한 랩으로 blot을 덮어 X-ray 필름에 exposure 한 후 검출된 단백질을 확인하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

- 토마토 유래 *PNGase T* 유전자가 도입된 형질전환 담배 식물체 2개 라인 (*PNGase T-10*, *PNGase T-11*) 최종 확립하였다.
- *PNGase T* 유전자가 고발현된 형질전환 담배 식물체 (*PNGase T-10*, *PNGase T-11*)에서 *PNGase T* 단백질의 발현 확인하였다.
- *PNGase T-10* 형질전환 담배식물체 잎에서 단백질을 추출하여 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제를 수행한 후 SDS-PAGE, Western blot 분석을 수행한 결과 anti-*PNGase T* antibody에 의해 결합된 *PNGase T* 단백질의 예상 크기인 66 kDa에서 밴드를 확인하였다.
- *PNGase T* 유전자가 고발현된 형질전환 담배 식물체 (*PNGase T-10*, *PNGase T-11*)에서 *PNGase T* 단백질의 발현 확인하였다 (그림 328-3-25, 328-3-26).
- 또한 66 kDa보다 좀 더 큰 100 kDa에서 *PNGase T* 발현이 확인되었는데 이러한 결과는 토마토 *PNGase T* 내에 예상되는 N-glycosylation site가 9개 정도 존재하는 것에 기인하는 것으로 사료된다.
- Anti-His antibody를 이용한 western blot을 수행해본 결과 *PNGase T-10*, *PNGase T-11* 두 형질전환 식물체에서 *PNGase T*로 예상되는 45 kDa과 20 kDa에서 밴드를 확인하였다 (그림 328-3-25, 328-3-26).



< 그림 328-3-25. *PNGase T-10* 식물체; *PNGase T* 발현 확인을 위한 SDS-PAGE와 Western blot 분석(위,anti-*PNGase T*; 아래,anti-His) >



< 그림 328-3-26. PNGase T-11 식물체; PNGase T 발현 확인을 위한 SDS-PAGE와 Western blot 분석(위,anti-PNGase T; 아래,anti-His) >

3-2-9. 식물유래 activin A 생산기술 확립

1. 벼 현탁세포를 이용한 activin A 생산기술 개발 및 고순도 분리정제 체계 확립

○ 연구수행기관 : 한국생명공학연구원, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

(1) 고발현을 위한 activin A 유전자의 코돈 최적화 및 유전자 합성

① Activin A 유전자의 코돈 최적화 및 유전자 합성

(2) Activin A 발현벡터 제작 및 형질전환

① 벼 현탁세포 특이적 프로모터를 이용한 Native activin A 고발현 식물발현벡터의 제작

② 벼 형질전환

③ 분자생물학적 분석을 통한 고발현 세포주의 선발 및 분석

(3) EK site가 도입된 activin A의 생산 기술개발

① EK site가 도입된 activin A 유전자를 포함하는 식물벡터 제작

② 벼 형질전환

③ 형질전환체의 분자생물학적 분석

(4) 벼 현탁세포 유래 activin A의 고순도 분리정제

① 분리 정제를 위한 배양액의 필터 및 농축

② 양이온 교환 크로마토그래피 정제

③ 음이온 교환 크로마토그래피 정제

(5) 벼 현탁세포 유래 activin A의 활성 확인

① pH에 따른 Activin A 단백질의 안정성 조사

② 열 처리에 따른 Activin A의 안정성 조사

③ 보관 버퍼, 보관 온도 및 기간에 따른 Activin A 단백질의 안정성 조사

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

○ ActivinA가 임신-특이적병인 자간전증(子癰前症)의 biomarker로 보고되고 있어 이를

이용한 진단키트 개발이 가능함(The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2012, 97:8, E1370-E1379)

- Activin A는 TGF- β family로 신장, 췌장 및 전립선 등 다양한 조직에서 발견되며, 여러 세포들에 작용하여 분화 및 발생을 유도하는 역할을 한다. 특히 췌장 형성을 유도하고, 췌장 세포 내의 PAX4와 neurogenin 3(Ngn3)의 발현을 조절하여 내분비 세포 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있음(Li L., Yi Z., Seno M. and Kojima I., (2004) "Activin A and Betacellulin." *Diabetes*. **53**:608-615).
- 최근에는 줄기세포배양의 인자로서 수요가 늘고 있으나 단백질의 특성상 미생물에서의 재조합 단백질의 생산이 불가능한 상황으로 대부분을 동물세포(Pangas and Woodruff, 2002, J. Endocrinol. 172:199-210) 및 곤충세포(Ciaran et al., 1998, The Intern'l J. Biochem. & Cell Biol. 30: 1129 - 1145)배양을 통하여 생산하고 있음
- Activin A에 대한 물질특허는 만료되었으며, 식물에서의 재조합 Activin A 생산 관련 특허는 출원되지 않은 상태로 본 연구결과는 국내 및 국제특허확보가 가능함
- Activin A는 homo dimer의 형태로 이루어지는 관계로 미생물에서의 생산이 되지 않아 현재 동물세포에서 생산하여 사용되는 매우 고가 단백질 임(1200만원/mg)
- Activin A는 non-glycoprotein 이므로 식물유래 당에 의한 문제가 없어 향후 의료용으로 사용가능성이 매우 높음
- 본 연구는 상기와 같은 이유로 산업화 가능성이 매우 높은 activin A를 벼의 현탁배양 특이적 고발현 프로모터를 이용한 생산기술을 개발하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) 고발현을 위한 activin A 유전자의 코돈 최적화 및 유전자 합성

(가) human Activin A (hActivin A) 유전자 분석 및 코돈 최적화

- 인간 유래의 Activin A (hActivin A) 유전자를 단자엽 고발현 시스템인 벼에서 발현하기 위하여 유전자 분석을 수행하였다. 본 연구에서 목적으로 하는 Activin A 유전자 (GenBank #. M13436.1)는 인간 유래이며, 단백질 발현 시스템으로는 단자엽 식물인 벼를 사용하고 있다. 일반적으로 이와 같은 경우에, 인간과 벼에서 사용하는 codon usage의 차이에 의해, 벼에서 낮은 빈도로 사용되는 codon usage가 목적 유전자에 사용되었을 경우, 그 유전자의 단백질 발현 효율 또는 정밀도가 낮아진다고 보고되어 있으므로, Activin A의 codon usage를 확인하고 벼에서 사용되어지는 codon usage로 codon 최적화를 하기 위하여 <http://pombe.kaist.ac.kr/codon/> 의 database에서 제공하는 SynBioCodonOpt 프로그램을 이용하여 *Oriza sativa*에 맞게 codon을 최적화하였다. 그림 329-1-1에서 볼 수 있듯이, native Activin A (hActivin A) 염기서열을 위쪽에, 벼에서 효율적으로 작용 가능한 코돈으로 최적화하여 설계한 synthetic Activin A (shActivin A) 염기서열을 아래쪽에 나열하였으며, 치환되어야

하는 염기서열은 붉은색 소문자로 표시하였다. 그 결과, 낮은 사용빈도의 codon은 전체 codon 426개중 111개로, 이는 전체 codon의 26.06%에 해당되며, 전체 1278개의 염기서열 중에서 128개의 염기서열이 치환되어야 하는 것으로 확인되었다. Activin A 유전자 염기 사용빈도 분석결과는 표 329-1-1에, codon 사용 빈도 분석결과를 표 329-1-2에 나타내었다.

original Activin A	1	10	20	30	40	50	60	70	771	780	790	800	810	820	830	840					
synthetic Activin A	5'	ATGCCCTTGC	TTTGGCTGAGAGGATTCT	GTGGCAAGTTGCTGGATTATAGT	GAGGAGTTCCCCACCC	GGCAAGAAGAAGAAGAAGAGGAGGGGGAAGGGAAGGGAAGGCGGAGGTGAAGTGGGGCAGGA															
	1	10	20	30	40	50	60	70	771	780	790	800	810	820	830	840					
	71	80	90	100	110	120	130	140	841	850	860	870	880	890	900	910					
	CAGGATCCGAGGGGCA	CGCGCCCGACTGTC	CGTCCGCTGCGCTGGCCGCCCTCCAAAGGATGT	CGATGAGGAAGAGGACAGTCCGACAGCTTTCCTCATGCTGCAGCCCGCAGTCTGAAGACCACC																	
	71	80	90	100	110	120	130	140	841	850	860	870	880	890	900	910					
	CAGGATc	GAGGGGcAc	cGCGcAc	cCGcGACTGc	cCGCTGCTGCGCTc	GCCGcGcTCCcT	AAGGATGT	GcT	GATGAGGAG	AAGGAc	CAcGTCGc	CACAGc	CTTTCCTCATGc	Ta	CAAGGcGc	Gc	CAcGCTCTGAAGACCACC				
	141	150	160	170	180	190	200	210	911	920	930	940	950	960	970	980					
	ACCCAACTCTCAGCC	AGAGTGGAGGCGCTC	AGAGGACACATTTTAAACATCGCTGCATTTGAAGAAG	CTCATCGCGCGCTCGGGGGCTGGAGTGTGATGGCAAGGTCAACATCTGCTGTAAAGAACAGTTCCT																	
	141	150	160	170	180	190	200	210	911	920	930	940	950	960	970	980					
	GCCCAACTCTCa	AcCAGAGATGGTGGAGCGGT	TAAAGACACATa	TAAACATCGCTGCA	TTTGAAGAAG	CTCATGgAg	GACGc	CgC	CGGGc	CcTc	GAAc	Tc	GAc	Gc	GAAGGTCAACATCTGCTGc	GAAGAACAGTTCCT					
	211	220	230	240	250	260	270	280	981	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050					
	AGACCCGATGT	CACCCAGCGGTACCC	AGGCGCGCTTCTGAAAGGATCAGAAAGCTTCATGTGGCA	TGTCAGTTCAAGGACATCGGCTGGAATGACATGGATGATTCCTCCCTCTGCATGATGCCAATCTACTGC																	
	211	220	230	240	250	260	270	280	981	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050					
	cGc	CCCGATGT	AcAc	CAGC	AcAGGC	CGCTCTGAAAGGATCAGAAAGCT	CATGTGGc	A	TGTCAGTTCAAGGACATCGGCTGGAATGACATGGATGATTCCTCCCTCTGCATGATGCCAATCTACTGC												
	281	290	300	310	320	330	340	350	1051	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120					
	AAGTCGGGGAGAA	Igc	TAc	GTGGAGATc	GAGGATGACATTTGGAAGGAGGGC	cGAc	ATGAATGc	CTTAT	GAGGTGAGTGGCGGAGCCATATAGCTGGCAC	TC	CGGc	aTc	TC	CACTGTc	TC	CACTCAACAGTCTATCA					
	281	290	300	310	320	330	340	350	1051	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120					
	AAGTCGGGGAGAA	Igc	TAc	GTGGAGATc	GAGGATGACATTTGGAAGGAGGGC	cGAc	ATGAATGc	CTTAT	GAGGTGAGTGGCGGAGCCATATAGCTGGCAC	TC	CGGc	aTc	TC	CACTGTc	TC	CACTCAACAGTCTATCA					
	351	360	370	380	390	400	410	420	1121	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190					
	GGAGCAGc	CCCGAGATc	ATc	AGTTGGCGAGTCAGGAAC	CGcGc	AcAGC	Gc	CAc	TTc	GAGAT	ACCACCTACCGc	ATGcGAc	GGCCAc	AGCCc	CTTGGCCAc	TC	CAATc	TGCTGTGc	CCc	ACCAAGCTc	cG
	351	360	370	380	390	400	410	420	1121	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190					
	GGAGCAGc	CCCGAGATc	ATc	AGTTGGCGAGTCAGGAAC	CGcGc	AcAGC	Gc	CAc	TTc	GAGAT	ACCACCTACCGc	ATGcGAc	GGCCAc	AGCCc	CTTGGCCAc	TC	CAATc	TGCTGTGc	CCc	ACCAAGCTc	cG
	421	430	440	450	460	470	480	490	1191	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260					
	TCCAAGGAAGGc	cGAc	CTc	GTGAGTGGTGGAGCGTGC	AGc	GTc	TGc	CTc	CTc	AAAGTCCc	CAAGG	ACCCATGTCCATGTTGATGATGATGGTCAAAACATCAAAAGGACATTGAGAACATGATCGTG									
	421	430	440	450	460	470	480	490	1191	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260					
	TCCAAGGAAGGc	cGAc	CTc	GTGAGTGGTGGAGCGTGC	AGc	GTc	TGc	CTc	CTc	AAAGTCCc	CAAGG	ACCCATGTCCATGTTGATGATGATGGTCAAAACATCAAAAGGACATTGAGAACATGATCGTG									
	491	500	510	520	530	540	550	560	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	CCAACAGGAC	CAGGACCAAGTCCACCTCCGCTCTCCAGCAGCAAGACCCCGCAGGCGAGTGTGA	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'																		
	491	500	510	520	530	540	550	560	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	CCAAT	AGGAc	aAGGACCAAGTCCACCTCCGCTCTCCAGCAGCAAGACCCCGCAGGAc	AGC	cTGA	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'															
	561	570	580	590	600	610	620	630	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	CACAGGGAGAGGCGG	CAGGAGTGGCGCTAAAGGGGAGAGGAGTGA	CTCTCTGAAAAAGTA	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'																	
	561	570	580	590	600	610	620	630	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	CACAGGc	GAAGAGGc	GAGGAGTGGCGc	Tc	AAGGGGAc	AGGAGTGA	ACTc	TGCTCTCTGAc	AAAGTA	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'											
	631	640	650	660	670	680	690	700	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	GTAGACGCTCGAA	GACACCTGGCATGTTCCCTGTCTCCAGCAGCATCCAGCGGTTGCTGGACcAGG	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'																		
	631	640	650	660	670	680	690	700	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	GTAGACGCTCGAA	GACACCTGGCATGTTCCCTGTCTCCAGCAGCATCCAGCGGTTGCTGGACcAGG	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'																		
	701	710	720	730	740	750	760	770	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	GCAAGAGCTCCCT	GACGTTCCGATTGCCTGTGAGCAGTGC	CAGGAGTGGGCGCAGCTTGGTTCTCCT	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'																	
	701	710	720	730	740	750	760	770	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	GCAAGAGc	ITCCCTGAc	GcGTTCCGATTGCCTGTGAGCAc	TGc	CAGGAGTGGc	Gc	CAGc	Ta	GTT	IT	Gc	CT	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'								
	701	710	720	730	740	750	760	770	1261	1270	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'										
	GCAAGAGc	ITCCCTGAc	GcGTTCCGATTGCCTGTGAGCAc	TGc	CAGGAGTGGc	Gc	CAGc	Ta	GTT	IT	Gc	CT	GAGGAGTGTGGTGTCTCA 3'								

< 그림 329-1-1. shActivin A코돈 최적화 염기서열 >

(나) Activin A 유전자 유전자 합성

- 상기의 코돈 최적화된 염기서열을 기본으로 하여 hActivin A의 5'- region에 식물세포에서 단백질 번역 효율 증진이 확인된 5`UTR 서열을 부착하여 5`UTR/Activin A signal peptide/Activin A mature peptide 융합 유전자 서열을 설계하여 AA로 명명하였고 NBMAA의 3'- region에 Histidine 6개를 추가로 부착하여 5`UTR/Activin A signal peptide/Activin A mature peptide/His6로 구성된 융합 유전자 서열을 설계하여 AAH로 명명하였다. NBMAA와 NBMAAH의 유전자 합성을 바이오니아에 의뢰하여 pGEM-B1 vector에 클로닝하였고 XbaI과 KpnI을 이용한 제한효소 mapping을 통해 당초의 설계대로 정확하게 합성되었음을 확인하였고(그림 329-1-2),

각각의 플라스미드를 NBMAA와 NBMAAH로 명명하였다(그림 329-1-2). 합성된 유전자는 각각의 협동기관에 분양하였다.

< 표 329-1-1. Activin A 유전자 염기 사용빈도 분석 >

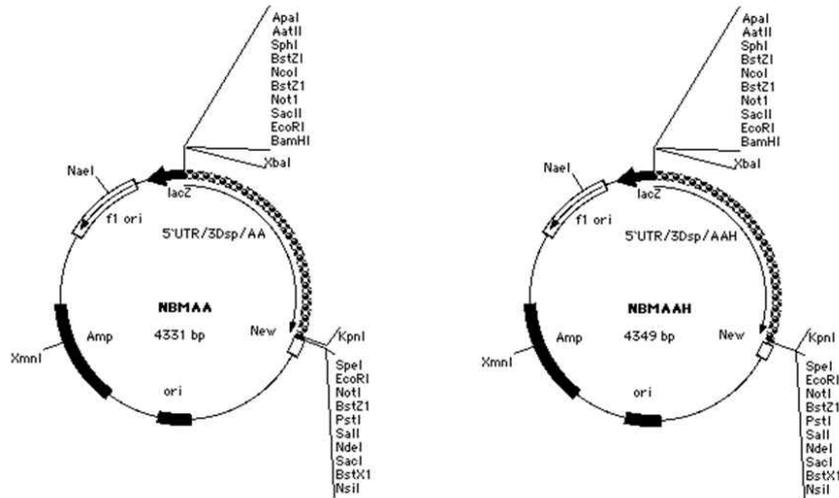
Base	hActivin A	shActivin A
	count (%)	count (%)
A	324 (25.35)	322 (25.19)
C	322 (25.19)	312 (24.41)
G	391 (30.59)	381 (29.81)
T(U)	241 (18.85)	263 (20.57)

< 표 329-1-2. Activin A 유전자 코돈 사용빈도 분석 >

Codon	hActivin A	shActivin A	Codon	hActivin A	shActivin A
	count (%)	count (%)		count (%)	count (%)
TTT-Phe	4 (0.93)	4 (0.93)	TAT-Tyr	3 (0.70)	2 (0.46)
TTC-Phe	8 (1.87)	8 (1.87)	TAC-Tyr	3 (0.70)	4 (0.93)
TTA-Leu	2 (0.46)	2 (0.46)	TAA-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TTG-Leu	9 (2.11)	6 (1.40)	TAG-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TCT-Ser	4 (0.93)	7 (1.64)	TGT-Cys	7 (1.64)	4 (0.93)
TCC-Ser	10 (2.34)	6 (1.40)	TGC-Cys	7 (1.64)	10 (2.34)
TCA-Ser	5 (1.17)	6 (1.40)	TGA-***	0 (0.00)	0 (0.00)
TCG-Ser	3 (0.70)	6 (1.40)	TGG-Trp	6 (1.40)	6 (1.40)
CTT-Leu	4 (0.93)	5 (1.17)	CAT-His	6 (1.40)	7 (1.64)
CTC-Leu	7 (1.64)	12 (2.81)	CAC-His	9 (2.11)	8 (1.87)
CTA-Leu	1 (0.23)	3 (0.70)	CAA-Gln	1 (0.23)	7 (1.64)
CTG-Leu	14 (3.28)	9 (2.11)	CAG-Gln	16 (3.75)	10 (2.34)
CCT-Pro	3 (0.70)	5 (1.17)	CGT-Arg	2 (0.46)	1 (0.23)
CCC-Pro	11 (2.58)	4 (0.93)	CGC-Arg	3 (0.70)	7 (1.64)
CCA-Pro	3 (0.70)	7 (1.64)	CGA-Arg	0 (0.00)	1 (0.23)
CCG-Pro	4 (0.93)	5 (1.17)	CGG-Arg	8 (1.87)	6 (1.40)
ATT-Ile	7 (1.64)	7 (1.64)	AAT-Asn	2 (0.46)	6 (1.40)
ATC-Ile	12 (2.81)	12 (2.81)	AAC-Asn	11 (2.58)	7 (1.64)
ATA-Ile	3 (0.70)	3 (0.70)	AAA-Lys	9 (2.11)	7 (1.64)
ATG-Met	10 (2.34)	10 (2.34)	AAG-Lys	26 (6.10)	28 (6.57)
ACT-Thr	0 (0.00)	3 (0.70)	AGT-Ser	6 (1.40)	6 (1.40)
ACC-Thr	8 (1.87)	5 (1.17)	AGC-Ser	9 (2.11)	6 (1.40)
ACA-Thr	3 (0.70)	4 (0.93)	AGA-Arg	5 (1.17)	4 (0.93)
ACG-Thr	3 (0.70)	2 (0.46)	AGG-Arg	7 (1.64)	6 (1.40)
GTT-Val	2 (0.46)	6 (1.40)	GAT-Asp	7 (1.64)	8 (1.87)
GTC-Val	11 (2.58)	8 (1.87)	GAC-Asp	11 (2.58)	10 (2.34)
GTA-Val	4 (0.93)	2 (0.46)	GAA-Glu	13 (3.05)	9 (2.11)
GTG-Val	9 (2.11)	10 (2.34)	GAG-Glu	25 (5.86)	29 (6.80)
GCT-Ala	2 (0.46)	8 (1.87)	GGT-Gly	4 (0.93)	6 (1.40)
GCC-Ala	13 (3.05)	9 (2.11)	GGC-Gly	14 (3.28)	13 (3.05)
GCA-Ala	6 (1.40)	1 (0.23)	GGA-Gly	6 (1.40)	8 (1.87)
GCG-Ala	5 (1.17)	8 (1.87)	GGG-Gly	10 (2.34)	7 (1.64)

(나) Activin A 유전자 유전자 합성

○ 상기의 코돈 최적화된 염기서열을 기본으로 하여 hActivin A의 5'- region에 식물세포에서 단백질 번역 효율 증진이 확인된 5'UTR 서열을 부착하여 5'UTR/Activin A signal peptide/Activin A mature peptide 융합 유전자 서열을 설계하여 AA로 명명하였고 NBMAA의 3'- region에 Histidine 6개를 추가로 부착하여 5'UTR/Activin A signal peptide/Activin A mature peptide/His6로 구성된 융합 유전자 서열을 설계하여 AAH로 명명하였다. NBMAA와 NBMAAH의 유전자 합성을 바이오니아에 의뢰하여 pGEM-B1 vector에 클로닝하였고 XbaI과 KpnI을 이용한 제한효소 mapping을 통해 당초의 설계대로 정확하게 합성되었음을 확인하였고, 각각의 플라스미드를 NBMAA와 NBMAAH로 명명하였다(그림 329-1-2). 합성된 유전자는 각각의 협동기관에 분양하였다.



< 그림 329-1-2. Activin A 유전자가 삽입된 플라스미드 >

(2) Activin A 발현벡터 제작 및 형질전환

□ 연구수행 내용

(가) 5'UTR/3Dsp/Activin A 발현 벡터 제작

① 제 1 세부과제로부터 제공받은 Activin A 유전자를 이용하였고, XbaI과 KpnI enzyme digestion을 통해 pJKP15 vector에 도입을 수행 하였다. 먼저 제공받은 Activin A가 포함되어 있는 vector 로부터 XbaI과 KpnI enzyme을 이용하여 37°C에서 3시간동안 incubation을 진행하였고 1316 bp에 해당하는 5'UTR/3Dsp/Activin A 단편을 확보 하였다. XbaI 과 KpnI enzyme digestion 된 pJKP15 vector와 5'UTR/3Dsp/Activin A 단편을 T4 DNA ligase를 이용하여 16°C에서 48h ligation 과정을 거친 후 TOP10에 E.coli transformation을 수행 하였다.

(나) 5'UTR/3Dsp/Activin A/His6 발현 벡터 제작

- ① Activin A/His6 유전자를 XbaI과 KpnI 제한효소로 37°C에서 3시간동안 처리하여 1334bp에 해당하는 5'UTR/3Dsp/Activin A/His6 단편을 확보 하였다. T4 DNA ligase를 이용하여 enzyme digested pJKP15 vector와 5'UTR/3Dsp/Activin A/His6 단편을 16°C에서 48h 동안 ligation 과정 후 TOP10에 transformation 하였다. 카나마이신 저항성 배지에서 획득한 총 10개의 콜로니를 colony PCR 방법을 통해 확인 하였다.

(다) 식물발현벡터 (pJKS 110, pJKS111)의 *Agrobacterium* 형질전환

- ① 리팜피신과 카나마이신 저항성을 가진 5개의 콜로니 (#1-5)를 분석 하였고, pJKS111은 4개의 콜로니 (#6-9)를 분석 하였다. pJKS110과 pJKS111 모든 콜로니에서 5'UTR 부분부터 Activin A에 해당하는 1316bp band를 확인하였다.

(라) Total RNA extraction & cDNA synthesis

- ① *Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환 방법을 사용하여 hygromycin B가 첨가된 배지에서 유도된 벼 캘러스를 선별하였고 Tri-regent와 액체질소를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 150ul DEPC water에 RNA pellet을 녹인 후 농도를 측정하였고 그 결과를 바탕으로 30ug의 RNA에 DNase를 37°C에서 40분간 처리하였다. 순수한 RNA를 추출 하기 위하여 phenol extraction & EtOH precipitation을 수행하였고, Purified RNA pellet을 40ul DEPC water에 녹이고 nanodrop으로 농도를 측정하였다. 1ul purified RNA를 template로 하여 oligo-dT primer를 첨가해 70°C에서 5분간 denaturation을 실시하고 ice에 5분간 fixing 하였다. 그리고 enzynomics사의 TOPscript™ cDNA Synthesis Kit를 이용해서 50°C 60min간 incubation 후 95°C 5min의 조건으로 cDNA를 합성하였다.

(마) Northern blot analysis

- ① 벼 캘러스로부터 Tri-regent 방법으로 추출한 total RNA를 사용하여 RNA level에서 고발현 Activin A elite line을 선별하기 위해 Northern blot analysis를 수행하였다. 각각 20ul의 total RNA를 formaldehyde gel에 40 volt로 3시간정도 loading하여 gel 1ea는 18S, 28S RNA를 확인하기 위해 EtBr staining을 수행하였고 다른 1ea gel은 positive charged nylon membrane에 transfer를 수행하였다. Membrane에 Transfer RNA는 PNGase A probe를 사용하여 hybridization을 수행하였고 1시간~2시간의 exposure time 조건으로 Activin A RNA 발현 분석을 진행 하였다.

(바) Suspension culture

- ① 30g/L sucrose, 2mg/L, 2,4-D, 0.2mg/L kinetin, 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지

(N6SE)에 pJKS111, pJKS110 line callus를 넣고 28°C에서 150rpm으로 암배양을 수행하였다. 1주일 후 어느 정도 자란 callus를 mesh망을 이용하여 잘게 sieving을 하여 새로운 N6SE배지에 액체 배양을 하였다. 1주일 간격으로 계대 배양을 수행 하면서 항생제 포함 배지에서 캘러스 입자의 굵기가 잘게 유지하면서 증식을 유도하였다. 잘게 유도된 벼 캘러스를 무균상태에서 진공펌프를 이용하여 기존 배양액(N6SE)을 제거하고 D.W로 washing 후에 sucrose가 제외되고 40mM fumaric acid가 포함된 N6-S 배지를 10ml/g 비율로 접종하고 당 결핍 상태로 28°C에서 150rpm으로 1주일간 암배양을 수행하였다. 배지내로 분비된 Activin A 단백질을 분석하기 위하여 각각의 배양액을 취한 뒤 12,000rpm에서 30분간 원심분리를 한 상등액으로 단백질 분석을 진행하였다.

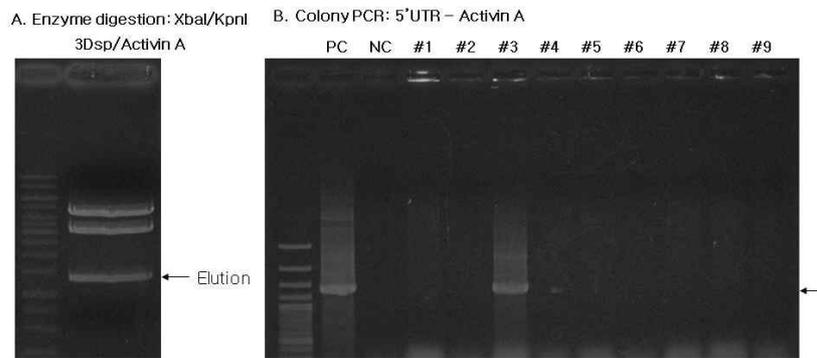
(사) SDS-PAGE & western blot analysis

- ① 당 결핍 배양에서 벼 캘러스로부터 취한 배양액을 SDS-PAGE & western blot analysis를 위한 재료로 사용하였다. 각각의 캘러스로부터 분비된 40ul의 배양액을 4x reduce sample buffer 10ul를 혼합하여 5분간 97°C에서 denaturation 시킨 후 50ul를 4-20% TGX PAGE-Gel (Bio-rad)에 200v로 전기영동을 실시하였다. 전기영동 한 gel 1개는 coomassie blue 염색약을 넣어서 SDS-PAGE analysis 실시하였고, 나머지 gel은 PVDF western blotting membrane (03 010 040 001, Roche)에 200mA로 90분간 transfer 하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 5% skim milk로 RT에서 40분간 3회 blocking 하고 0.1% tween 20이 첨가된 TBS buffer (TBST)로 15분간 3회 세척 한 후 Activin A 1차 항체 (SantaCruz, sc-166503) 사용하여 4°C에서 O/N 하였다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, 2차 항체로 anti-mouse IgG AP (SantaCruz)를 사용하여 4°C에서 2시간동안 반응시켰다. TBST buffer로 15분간 3회 세척 한 후, NBT/BCIP (Roche)용액으로 PVDF membrane을 detection하여 Activin A 단백질의 발현을 확인 하였다.

□ 연구결과

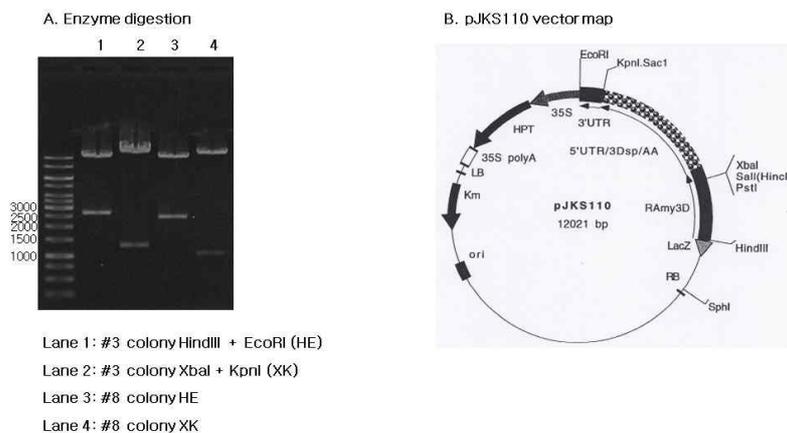
(가) 5'UTR/3Dsp/Activin A 발현 벡터 제작

- ① 목적 단백질의 고발현 유도를 위하여 RAmy3D promoter를 사용하고 당 결핍 조건의 배지에서 목적 단백질의 분비 효율을 더 높이기 위해 RAmy3D promoter 유래 signal peptide (3Dsp)를 포함하는 Activin A를 사용하였다. 그리고 Activin A translation 효율을 더욱 높이기 위하여 3Dsp/Activin A의 5'-region에 untranslation region을 추가로 도입한 5'UTR/3Dsp/Activin A를 식물 발현 벡터에 도입 하고자 하였다 (그림 329-1-3A). PC는 제공받았던 Activin A gene을 사용하였고, 카나마이신 저항성 배지에서 획득한 9개의 white 콜로니를 colony PCR 방법으로 #3, #8 콜로니를 선별하여 inoculation을 진행 하였다 (그림 329-1-3B).



< 그림 329-1-3. RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/Activin A 단편 확보를 위한 클로닝 >

② #3, #8 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출하여 2689bp에 해당하는 RAmy3D promoter부터 3'UTR부분까지의 단편을 확인 할 수 있는 HindIII+EcoRI과 1316bp에 해당하는 Activin A를 확인 할 수 있는 XbaI+KpnI의 2가지 방법으로 제한효소 처리하여 확인 하였다. Activin A #3 콜로니에서 각각 해당하는 크기의 band를 확인 하였고 (그림 329-1-4A), 콜로니 3번을 pJKS110이라 명명하였다 (그림 329-1-4B).

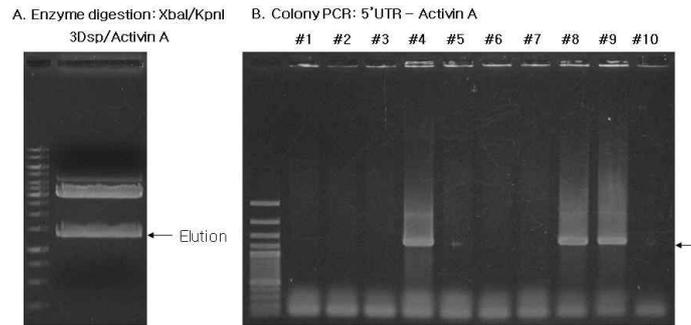


< 그림 329-1-4. RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/Activin A가 삽입된 식물 발현 벡터 >

(나) 5'UTR/3Dsp/Activin A/His6 발현 벡터 제작

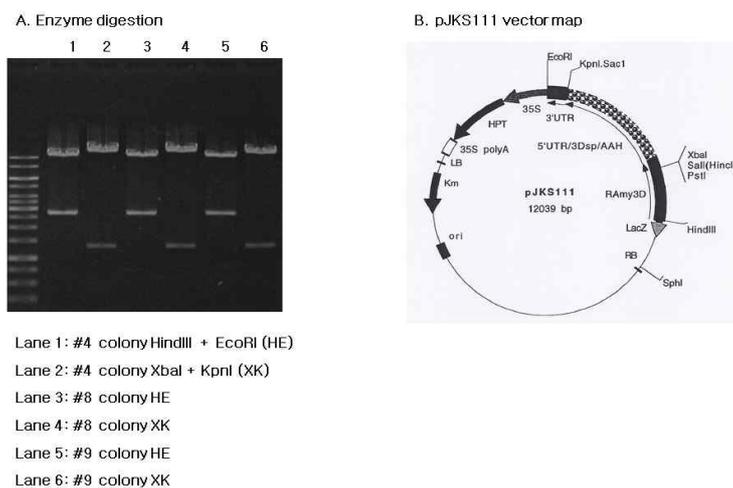
① 상기 확보한 pJKS110 식물 발현 벡터와 동일한 방법으로 고발현 유도 RAmy3D promoter, 분비 효율을 높이기 위한 3Dsp, 그리고 Activin A translation 효율을 높이기 위한 5'UTR region을 도입하고 Activin A 발현 확인 후 정제를 위한 목적으로 Activin A의 3'-region에 His6 region을 추가로 도입하여 5'UTR/3Dsp/Activin A/His6을 식물 발현 벡터에 도입 하고자 하였다 (그림 그림 329-1-5A). T4 DNA ligase를 이용하여 enzyme digested pJKP15 vector와 5'UTR/3Dsp/Activin A/His6 단편을 16°C에서 48h

동안 ligation 과정 후 TOP10에 transformation 하였다. 카나마이신 저항성 배지에서 획득한 총 10개의 콜로니를 colony PCR 방법을 통해 확인 하였다. #4, #8, #9 콜로니에서 5'UTR부분부터 Activin A부분까지 해당하는 1316bp의 band를 확인 하였고 (그림 그림 329-1-5B), enzyme digestion 방법으로 추가적으로 확인하기 위해 각 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출하였다.



< 그림 329-1-5. RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/Activin A/His6 단편 확보를 위한 클로닝 >

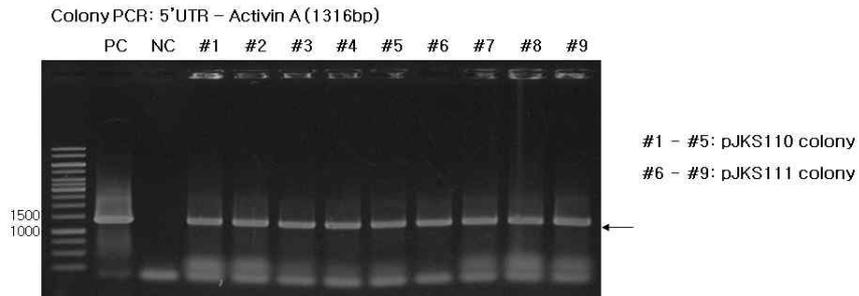
② 콜로니 선별을 위하여 각각의 확보된 plasmid DNA를 이용하여 제한효소 처리를 실시 하였다. XbaI과 KpnI을 처리하여 1316bp에 해당하는 Activin A를 확인하였고, HindIII와 EcoRI을 처리하여 2689bp에 해당하는 RAmy3D promoter부터 3'UTR 부분까지 확인하였다 (그림 329-1-6A). 각각의 제한효소 처리하여 #4, #8 콜로니를 선발하여 His-taq 유무를 확인하기 위하여 3'UTR primer로 시퀀싱 방법을 통해 확인하였다. 두 콜로니 모두 His-taq이 존재하는 것을 확인하였고 콜로니 4번을 pJKS111이라 명명하였다 (그림 329-1-6B).



< 그림 329-1-6. RAmy3D promoter/5'UTR/3Dsp/Activin A가 삽입된 식물 발현 벡터 >

(다) 식물발현벡터 (pJKS 110, pJKS111)의 *Agrobacterium* 형질전환

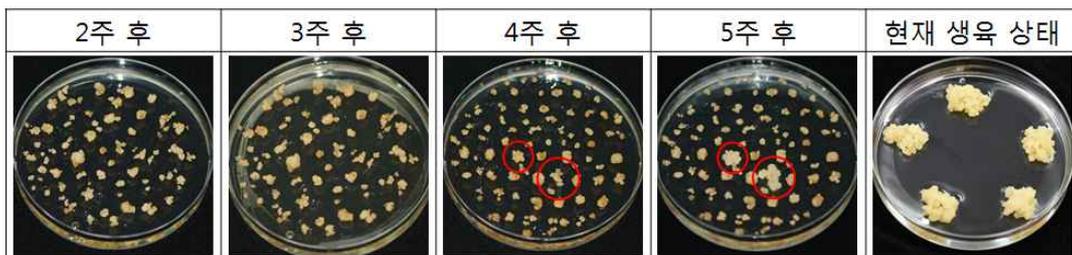
① 상기 확보한 pJKS110과 pJKS111 식물발현 벡터를 tri-parent mating 방법으로 *A. tumefaciens* LBA4404 에 형질전환 하였으며 colony PCR 방법을 통해 1316bp band를 확인하였다 (그림 329-1-7). pJKS110은 콜로니 #1을 선별하여 pJKS110(LBA4404)로 명명하였고, pJKS111은 콜로니 6번을 pJKS111(LBA4404)로 명명하였다.



< 329-1-7. pJKS110과 pJKS111 의 LBA4404 형질전환 >

(라) Activin A (pJKS110, pJKS111)의 형질전환체 확보

① 동진벼 캘러스를 이용하여 *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법으로 pJKS110과 pJKS111 형질전환을 진행 중에 있으며 현재 항생제 저항성을 보이는 캘러스를 각각 약 20여개 확보 하였고 (그림 329-1-8), 추가로 계속 확보 될 예정이며 각각의 biomass가 확보되는 대로 분석을 수행할 예정이다.



< 그림 329-1-8. 항생제 포함 배지에서의 Activin A 형질전환 캘러스 선별 >

(마) 5`UTR/3Dsp/Activin A/His6 (pJKS111) 고발현 형질전환체 선별

① *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 확보된 항생제 저항성 캘러스를 이용하여 mRNA에서 ActivinA 유전자 발현 확인을 위한 Northern blot 분석을 수행하였다. 총 18개의 pJKS111(S111) cell line에서 total RNAmf 추출 하였고 각각 추출된 total RNA를 nanodrop으로 농도를 측정하였다 (그림 329-1-9).

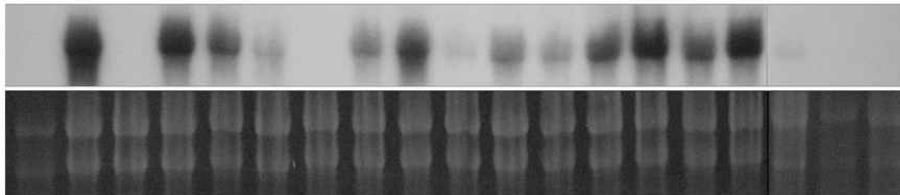
Sample	ng/ul	Sample	ng/ul
N75	794.51	S111-10	1101.56
S111-01	1182.69	S111-11	997.63
S111-02	1232.66	S111-12	1113.97
S111-03	1194.87	S111-13	1057.28
S111-04	1229.93	S111-14	882.1
S111-05	816.91	S111-15	1116.06
S111-06	1059.56	S111-16	1020.69
S111-07	907.38	S111-17	1147.39
S111-08	955.68	S111-18	1267.94
S111-09	1038.38		

< 그림 329-1-9 pJKS111(S111) total RNA 농도 >

② 각각의 30ug의 RNA를 Northern blot 분석에 사용하였고, NC (negative control)은 vector control인 N75 형질전환 캘러스를 사용하였다. 1.2% formaldehyde gel에 loading 한 후 EtBr에 염색하여 18S와 28S에 해당하는 band를 확인 하였다. 각각의 total RNA를 membrane에 transfer하여 northern blot 분석한 후 확인된 band 중에서 높은 발현을 보이는 S111 #1, #3, #13, #15 개체를 선별하였다 (그림 329-1-10).

Northern blot analysis: S111 (ActivinA)

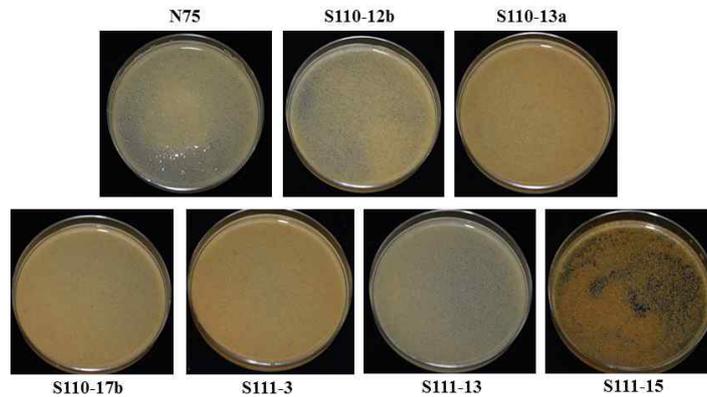
NC #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #10 #11 #12 #13 #14 #15 #16 #17 #18



<그림 329-1-10. 5`UTR/3Dsp/Activin A/His6 (pJKS111) northern blot analysis >

(바) Suspension culture

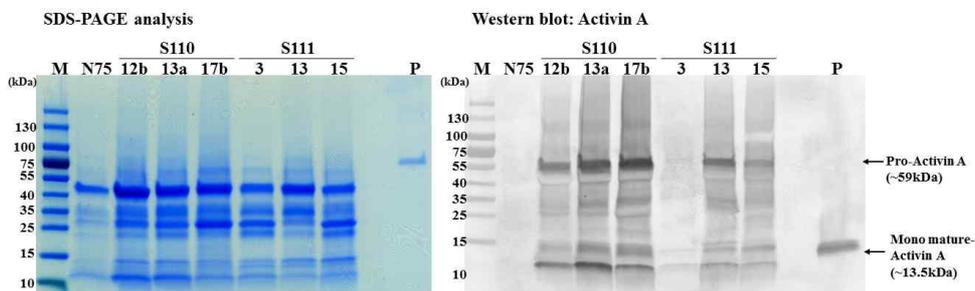
① Northern blot analysis을 통해 선별된 pJKS111 #1, #3, #13, #14 4개 callus line과 제 1세부과제 NBM으로부터 전달받은 형질전환체 5`UTR/3Dsp/Activin A (pJKS110) #12b, #13a, #17b 3개 callus line으로부터 Activin A 단백질의 분비를 유도하기 위한 적합한 캘러스를 유지 및 증식하기 위하여, cell suspension culture를 수행 하였다. 항생제 포함 배지에서 캘러스의 증식을 유도하였고, 항생제가 포함된 액체배양에서 3개의 S110 cell line (#12b, #13a, #17b)과 3개의 S111 cell line (#3, #13, #15)개체가 지속적인 항생제 저항성을 나타내었고 총 6개의 개체를 선별하였다. (그림 329-1-11).



< 그림 329-1-11. Suspension culture를 이용한 Activin A 형질전환 벼 캘러스 증식 >

(사) Western blot analysis를 이용한 Activin A 발현 분석

① 항생제 저항성 배지에서 선별된 총 6개의 activin A 캘러스 라인으로부터 N6-S배지를 이용하여 secretion을 수행하여 배지 내 activin A 단백질의 분비를 유도하였다. Activin A의 발현 및 분비 유무를 확인하기 위하여 western blot analysis를 reaction sample 40ul와 4x reduce sample buffer 10ul를 혼합하여 4-20% SDS-gradient PAGE Gel을 이용하여 수행하였다 (그림 329-1-12). R&D systems사의 CHO cell 유래의 recombinant Human/Mouse/Rat Activin A (338-AC-010)을 Positive control로 10ng을 사용하였고 negative control은 vector control인 N75가 분비 배양된 배지를 사용하였다. Activin A 1차 항체로 western blot 분석한 결과, 총 6개의 캘러스 모두 약 59kDa의 propeptide와 mature activinA가 결합된 크기의 band를 확인하였다. Mature 상태의 Activin A는 약 13kDa에 해당하고 activin A가 활성을 가지려면 homodimer 형태로 되어야 한다 (Walton et al., 2011). Activin A의 homodimer를 유도하는 것이 propeptide인데 western blot 분석 결과에서 관찰된 band가 propeptide와 mature activin A가 furin 인식 서열에 의해 연결되어 있는 상태이다. positive로 사용한 CHO cell 유래 Activin A는 reducing 환경에서 monomer 형태 크기인 13.5kDa로 관찰되었다. 총 6개의 캘러스 라인 중에서 Activin A 단백질의 발현율이 높은 S110 #17b 캘러스 선별하였고 이후 실험을 진행하였다.



< 그림 329-1-12. 벼 유래 재조합 Activin A (S110 & S111)의 western blot analysis >

(아) Furin을 이용한 fusion protein (propeptide + Activin A) digestion

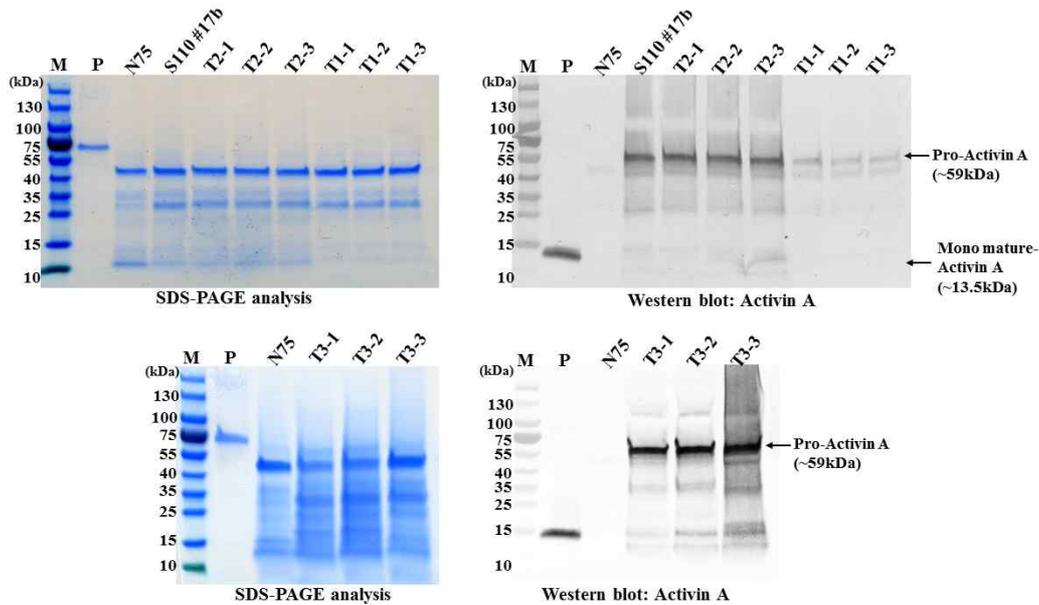
① 앞서 western blot analysis에서 확인된 pro-Activin A (propeptide + mature activin A)에서 activin A의 활성을 위해 propeptide와 mature activin A의 분리를 진행하였다. 각각의 peptide가 furin 인식 서열로 연결되어 있는 점을 감안하여 furin 처리를 하여 분리하고자 하였다. Fusion protein의 분리를 위해 furin 처리방법은 총 3가지 방법으로 진행하였다 (그림 329-1-13). Method 1은 filter column을 사용하여 pro-Activin A가 분리된 배지를 1x digestion buffer로 buffer change를 하여 furin 처리를 진행하였다. Method 2는 filter column 사용 시 단백질의 손실을 줄이기 위하여 10x digestion buffer를 첨가시켜서 furin 처리를 진행하였고, 마지막 method 3은 activin A 단백질을 유도하는 secretion 과정에서 10x digestion buffer와 furin 효소를 배지에 첨가시켜서 분비와 절단을 같이 유도하는 방법으로 진행하였다.

Method 1: 1x digestion buffer change				Condition
	Treatment 1-1	Treatment 1-2	Treatment 1-3	Incubation: 25℃ 16hr
Pro-Activin A in digestion buffer	600ul	599ul	598ul	
Furin (2000U/ml)	-	1ul	2ul	
Total	600ul	600ul	600ul	
Method 2: 10x digestion buffer				
	Treatment 2-1	Treatment 2-2	Treatment 2-3	
Pro-Activin A	540ul	539ul	538ul	
Furin (2000U/ml)	-	1ul	2ul	
10x digestion buffer	60ul	60ul	60ul	
Total	600ul	600ul	600ul	
Method 3: 10x digestion buffer in secretion culture				Condition
	Treatment 3-1	Treatment 3-2	Treatment 3-3	Incubation: 28℃ with shaking
Pro-Activin A	media	media	media	
Furin (2000U/ml)	-	10	10	
10x digestion buffer	10% of media	10% of media	10% of media	
Secretion 기간	7 days	7 days	12 days	

< 그림 329-1-13. Fusion protein digestion을 위한 furin 처리 reaction mixture >

(자) Western blot analysis를 이용한 fusion protein digestion 분석

① 여러 조건에서 furin 효소를 이용하여 propeptide와 mature activin A의 분리를 수행하였고 western blot analysis를 통해 digestion 확인분석을 진행하였다. 40ul의 reaction sample을 사용하여 분석한 결과, 모든 furin 처리 방법에서 13.5kDa mature activin A에 해당하는 band가 없거나 약하게 관찰되었다 (그림 329-1-14). Western blot 분석 결과를 바탕으로 식물 유래 재조합 Activin A에서 furin 효소 처리에 대한 fusion 단백질 분리 효율이 없거나 매우 낮은 효율을 보이는 것으로 사료된다.



< 그림 329-1-14. 벼 유래 재조합 Activin A (S110 #17b)의 fusion protein digestion >

(3) EK site가 도입된 activin A의 생산 기술개발

□ 연구수행 내용

(가) EK site가 도입된 activin A(pMYD317)의 형질전환을 위한 벡터 확보

① 위의 결과에서 furin 인식 서열 (RRRRR)에 의해 연결된 벼 유래 재조합 Activin A (S110 #17b)의 fusion protein은 furin에 의해서 절단되지 않는 것으로 확인 하였다. 그래서 활성이 있는 Activin A의 분리를 위하여, furin 인식 서열 (RRRRR)을 enterokinase 인식서열 (DDDDK)로 변경하여 진행하도록 하였다. Enterokinase 서열로 연결 된 Activin A 벡터를 NBM으로부터 제공받아서 사용하였다.

(나) 식물발현벡터 (pMYD317)의 *Agrobacterium* 형질전환

① 식물발현벡터를 tri-parent mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 형질전환 하였으며 리팜피신과 카나마이신 저항성을 가진 콜로니 중 2개를 선별하여 RAmY3Dpro_F: 5`-GTC ATT CGC CAC GAA CAC ATC GAT C-3` 와 3`UTR_R: 5`-GCC GTG TAG AAA CTG GTT TGA GCA TGA C-3` 프라이머를 이용하여 1425bp에 해당하는 RAmY3Dpromoter - 3`UTR을 PCR 방법을 사용하여 확인 하였다.

(다) *Agrobacterium*-mediated plant transformation

① 형질전환을 위한 준비과정으로 종피를 제거한 동진벼를 70% 에탄올에 표면소독을 하고, 3% sodium hypochloride에 10분씩 3회 소독, N6배지(sucrose 30g, casamino acid 0.3g, proline 0.5g, 2,4-D 2mg/l)에 10개씩 치상하여 벼 캘러스를 유도하였다. 3~4주 후 유도된

캘러스만 동일 배지에 옮겨준 후 3일간 28°C에서 암배양을 하였고, 3일 뒤 벼 캘러스와 Activin A가 도입된 식물발현벡터 (pMYD317)를 공동 배양을 수행하기 위해 100uM acetosyringone이 포함된 N6CO배지에 3일간 25°C에서 암배양 하였다. 벼 캘러스를 250mg/l cefotaxime 용액에 세척한 다음 500mg/l cefotaxime, 50mg/l hygromycin이 포함된 N6SE 배지에 치상하였고, 항생제 저항성 캘러스를 선별하였다.

(라) Total RNA extraction & cDNA synthesis

- ① *Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환 방법을 사용하여 hygromycin B가 첨가된 배지에서 유도된 벼 캘러스를 선별하였고 Tri-regent와 액체질소를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출방법과 cDNA는 이미 Activin A (furin)의 실험에서 언급된 조건으로 진행하였다.

(마) Quantitative real-time PCR

- ① 선별된 항생제 저항성 캘러스로부터 합성된 cDNA를 이용하여 RNA level에서 고발현 Activin A elite line을 선별하기 위해 real-time PCR (qPCR) 방법을 수행하였다. 각각의 합성된 cDNA 1ul를 template로 사용하였고, normalized expression level을 확인하기 위한 reference gene으로는 벼 actin 유전자(GeneBank: X15865.1)를 사용하였다. Actin은 forward: 5'-AGC TTC CTG ATG GAC AGG TTA TC-3', reverse: 5'-ACC ACT GAG AAC GAT GTT GCC-3' primer를 이용하여 증폭하였고, Activin A는 Activin A(qPCR)_F: 5'-TCG AAT GCG ACG GCA AGG TCA AC-3', Activin A(qPCR)_R: 5'-TGA GTG GAA CGA CAG TGA AGA TC-3' 을 이용하여 증폭하였다. Real-time dye는 SYBR Green을 사용하였고, PCR 조건은 Pre-denaturation은 95°C 15min이며 denaturation 95°C 10sec, annealing 60°C(activin A) & 54°C(Actin) 15sec, synthesis 72°C 30sec를 총 40cycle로 하여 3반복으로 분석을 진행하였다.

(바) Suspension culture, SDS-PAGE & Western blot analysis

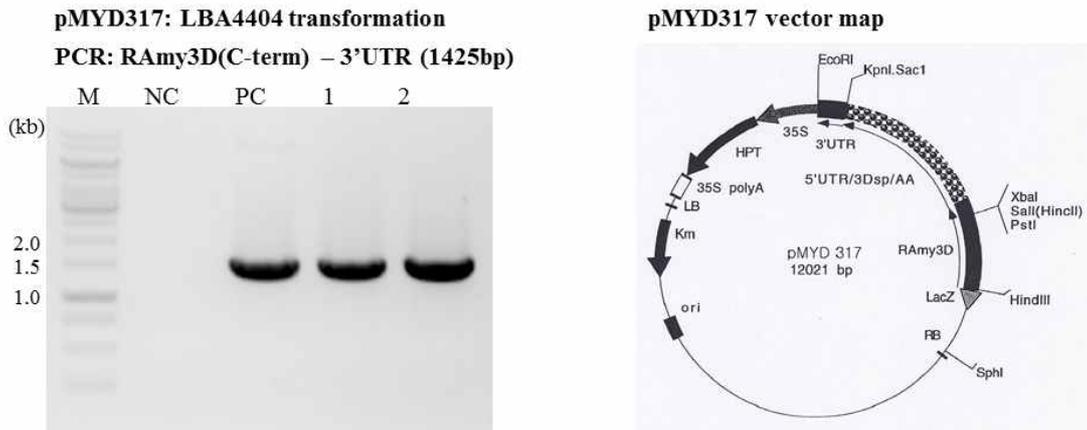
- ① qPCR 방법을 통해 선별된 캘러스를 SDS-PAGE & western blot 분석을 진행하기 위해 배지 내로 단백질 분비를 유도하기 위한 suspension culture를 진행하였다. 이후 실험 방법은 이미 Activin A(furin) 실험에서 언급된 방법과 동일하게 진행 되었다.

□ 연구결과

(가) *Agrobacterium*-mediated plant transformation

- ① NBM으로부터 제공받은 pMYD317 vector를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 하였으며, 항생제 저항성 2개의 콜로니를 PCR로 분석하였다. PC는 제1세부과제로부터 제공 받았던 Activin A 유전자를 사용하였고, pMYD317 모든

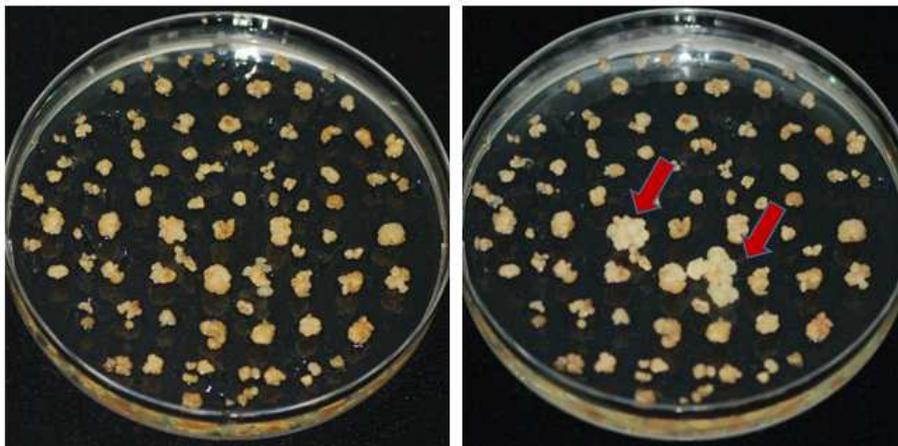
클로니에서 RAmy3D promoter(C-term) 부분부터 3'UTR까지 1425bp에 해당하는 band를 확인하였다. 콜로니 #1을 선별하여 pMYD317(LBA4404)로 명명하였다 (그림 329-1-15).



< 그림 329-1-15. RAmy3D promoter/5` UTR/3Dsp/Activin A (pMYD317)의 LBA4404 형질전환 >

② pMYD317의 형질전환 식물체를 얻기 위하여, pMYD317(LBA4404)와 동진벼 캘러스를 이용하여 공동배양을 통한 *Agrobacterium*-mediated plant transformation을 수행하였다. 벼 캘러스를 500mg/l cefotaxime, 50mg/l hygromycin이 포함된 N6SE 배지에 치상하여 항생제 저항성을 나타내는 캘러스 라인을 선별 하였다 (그림 329-1-16).

***Agrobacterium*-mediated plant transformation: pMYD317**



< 그림 329-1-16. pMYD317 벼 캘러스 형질전환 >

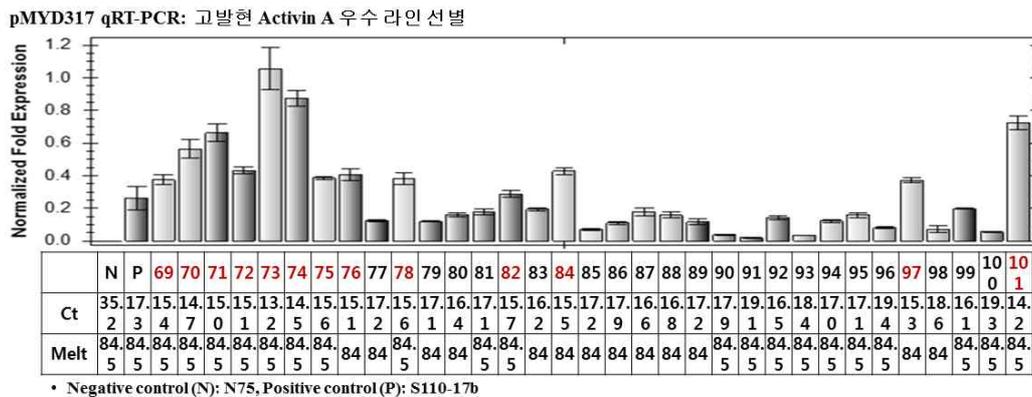
(나) 5` UTR/3Dsp/Activin A (pMYD317) 고발현 형질전환체 선별

① *Agrobacterium*-mediated plant transformation 방법을 통하여 확보된 항생제 저항성 캘러스를 이용하여 mRNA에서 Activin A 유전자 발현 확인을 위한 Northern blot 분석을 수행하였다. 총 33개의 5` UTR/3Dsp/Activin A (pMYD317) cell line에서 total RNA를 추출하였고, nanodrop을 이용하여 RNA 농도를 측정하였다 (그림 329-1-17).

Sample	ng/ul	Ratio (260/280)	Sample	ng/ul	Ratio (260/280)	Sample	ng/ul	Ratio (260/280)
N75	2572.4	2.02	pMYD317 #79	4723.9	2.00	pMYD317 #91	3134.0	1.98
pJKS110 #17b	3245.4	2.00	pMYD317 #80	4104.5	1.99	pMYD317 #92	3488.6	2.00
pMYD317 #69	3902.4	1.97	pMYD317 #81	4132.5	2.02	pMYD317 #93	2718.1	1.94
pMYD317 #70	2746.7	2.00	pMYD317 #82	3769.6	1.98	pMYD317 #94	3292.3	2.00
pMYD317 #71	3383.8	1.98	pMYD317 #83	3097.8	2.02	pMYD317 #95	3682.5	2.01
pMYD317 #72	3474.7	1.99	pMYD317 #84	3685.9	1.99	pMYD317 #96	2979.1	2.01
pMYD317 #73	4063.8	1.94	pMYD317 #85	3264.3	2.00	pMYD317 #97	2016.4	2.00
pMYD317 #74	3348.1	2.02	pMYD317 #86	2047.8	2.01	pMYD317 #98	2346.8	1.96
pMYD317 #75	3113.3	2.01	pMYD317 #87	3420.0	2.02	pMYD317 #99	3270.4	1.96
pMYD317 #76	4239.4	1.94	pMYD317 #88	3301.4	2.03	pMYD317 #100	2714.7	1.97
pMYD317 #77	3960.1	1.99	pMYD317 #89	3106.8	1.98	pMYD317 #101	3848.7	1.95
pMYD317 #78	3666.2	2.01	pMYD317 #90	3808.1	1.98			

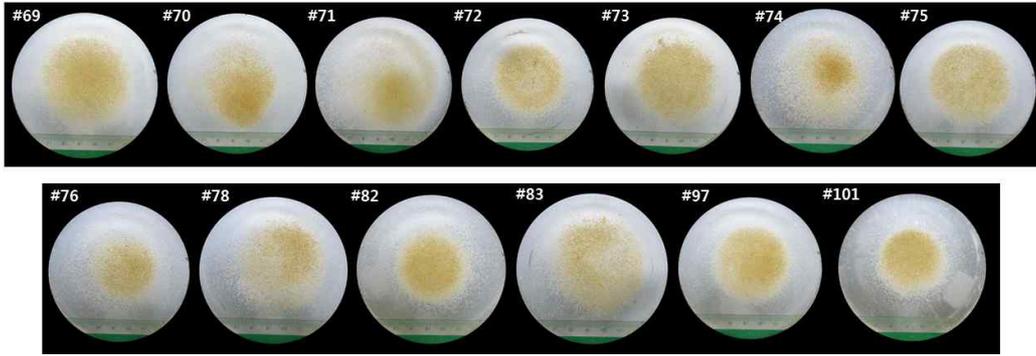
< 그림 329-1-17. 5`UTR/3Dsp/Activin A (pMYD317)의 total RNA 정량측정 >

② 추출된 1ug의 total RNA를 사용하여 cDNA를 합성하고 1ul의 cDNA를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다. Vector control인 N75를 negative control(NC), positive control (PC)를 기존 activin A의 S110 #17으로 설정하고 RNA level에서 pMYD317의 Activin A mRNA 발현양을 비교하였다 (그림 329-1-18).



< 그림 329-1-18. 5`UTR/3Dsp/Activin A (pMYD317)의 Activin A mRNA expression level >

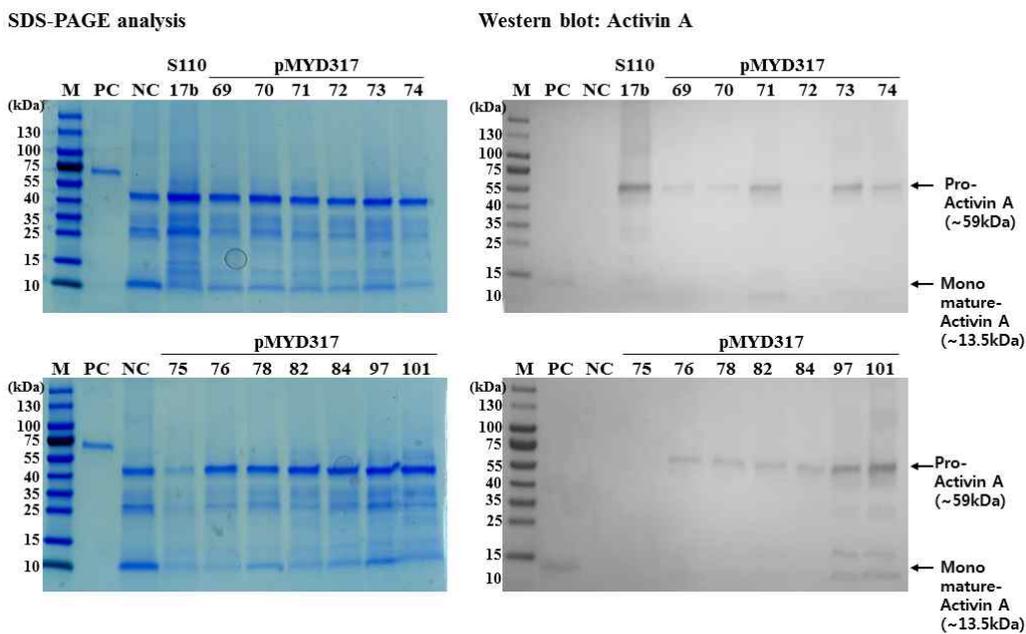
③ N75를 제외한 나머지에서 20 이하의 Ct값을 확인하였고, 멜팅온도도 84~84.5도로 Activin A의 증폭이 잘 이루어 졌다는 것을 확인하였다. PC와 비교하여 Activin A mRNA의 발현율이 높은 총 13개의 pMYD317 #69, #70, #71, #72, #73, #74, #75, #76, #78, #82, #84, #97, #101 캘러스를 선별하였고, Activin A 단백질의 분비 유도과 분석을 위해 suspension culture를 진행하였다 (그림 329-1-19). 각각의 캘러스 라인 모두 액체배양에서 항생제 저항성을 나타내고 증식이 잘 이루어지는 것을 확인하였고, 캘러스로부터 Activin A의 단백질 분비를 유도하기 위해 secretion을 진행하였다.



< 그림 329-1-19. Suspension culture를 이용한 Activin A (pMYD317) 형질전환 벼 캘러스 증식 >

(라) Western blot analysis를 이용한 Activin A (pMYD317) 발현 분석

① 항생제 저항성 배지에서 선별된 총 13개의 activin A (pMYD317) 캘러스 라인으로부터 N6-S배지를 이용하여 secretion을 수행하여 배지 내 activin A 단백질의 분비를 유도하였다. Activin A의 발현 및 분비 유무를 확인하기 위하여 western blot analysis를 reaction sample 40ul와 4x reduce sample buffer 10ul를 혼합하여 4-20% SDS-gradient PAGE Gel을 이용하여 수행하였다 (그림 329-1-20). PC는 30ng CHO cell 유래 Activin A를 사용하였고, furin 인식서열이 포함된 S110 #17b를 식물 유래 Activin A PC로 사용하였다. Activin A western blot 결과에서 NC (N75)를 제외한 모든 pMYD317 라인에서 S110 #17b와 동일한 pro-Activin A에 해당하는 단백질이 확인 되었다. 단백질 발현율이 높은 pMYD317 #71을 선별하여 이후 실험을 진행하였다.



< 그림 329-1-20. 벼 유래 재조합 Activin A (pMYD317)의 western blot analysis >

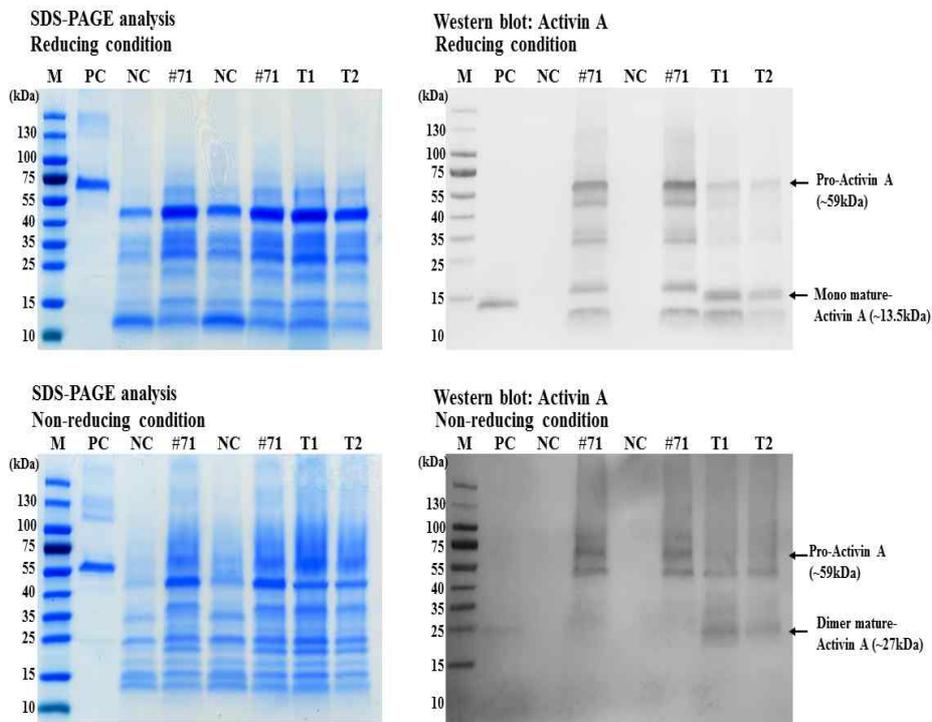
(마) Enterokinase를 이용한 fusion protein (propeptide + DDDDK + Activin A) digestion
 ① 앞서 western blot analysis에서 확인된 pro-Activin A (propeptide + mature activin A)에서 activin A의 활성을 위해 enterokinase 인식서열(DDDDK)로 연결되어 있는 propeptide와 mature activin A fusion protein을 enterokinase를 이용하여 분리를 진행하였다 (그림 329-1-21).

Method: 10x digestion buffer		
	Treatment 1	Treatment 2
Pro-Activin A (pMYD317 #71)	178ul	89ul
Enterokinase (100IU)	2ul	1ul
10x digestion buffer	20ul	10ul
D.W	-	100ul
Total	200ul	200ul
<ul style="list-style-type: none"> • 10x digestion buffer: 200mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 20mM CaCl₂ • Incubation: 23 °C 12hr 		

< 그림 329-1-21. Fusion protein digestion을 위한 enterokinase 처리 reaction mixture >

(바) Western blot analysis를 이용한 fusion protein digestion 분석

① Enterokinase 효소를 이용하여 propeptide와 mature activin A의 분리를 수행하였고 western blot analysis를 통해 digestion 확인분석을 진행하였다. 40ul의 reaction sample을 사용하여 reducing condition에서 pro-Activin A와 denature된 monomer 형태의 activin A를 확인 하고자 하였고, non-reducing condition에서 pro-activin A와 dimer 형태의 activin A를 확인하고자 하였다 (그림 329-1-22). Positive control (PC)은 30ng CHO cell 유래의 Activin A를 사용하였고, negative control (NC)는 N75를 사용하였다. Treatment 1(T1), treatment 2 (T2)의 western blot 결과 reducing condition에서는 enterokinase가 처리된 pMYD317 #71 샘플은 효소 처리가 되지 않은 샘플과 비교하여 pro-Activin A의 양이 현저히 줄어들었고, positive control과 동일한 monomer 타입의 mature activin A에 해당하는 band가 확인되었다. non-reducing condition에서도 enterokinase가 처리된 T1 & T2 샘플 모두 현저히 줄어든 pro-activin A와 positive control과 동일한 dimer 형태의 mature-Activin A에 해당하는 band가 관찰되었다. 이 결과로 활성을 가지는 Activin A 단백질이 베타 칼레르스 분비 시스템에 의해 발현과 분비가 유도 된다는 것을 확인 하였다.



< 그림 329-1-22. 벼 유래 재조합 Activin A (pMYD317 #71)의 fusion protein digestion >

(4) 벼 현탁세포 유래 activin A의 고순도 분리정제

(가) 연구수행 내용

① 분리 정제를 위한 배양액의 필터 및 농축

- Lab scale system을 이용한 단백질 농축 및 단백질 커팅 SOP 방법에 따라 1.6L의 배양액을 최종 0.1L로 농축함. 농축액 100 mL에 20 mM sodium phosphate, pH 6.0, 10 mM NaCl을 넣고 cold room에서 2시간 동안 stir 함. 이후 0.45 um 필터로 여과하고 HiPrep SP sepharose와 Hiprep Q sepharose를 각각 수행함.

② Cation-exchange chromatography

- Activin A의 pI 값이 pH 7.0에 근접하기에 일반적인 CM sepharose나 DEAE sepharose 를 사용하는 것보다 strong ion exchange chromatography를 위한 mono Q나 SP sepharose가 적합 할 것으로 판단하였음.
- GE healthcare사의 HiPrep 16/20 SP sepharose의 pre-packing column을 AKTA prime plus, FPLC 기기에 연결하고 3mL/min의 유속으로 200 mL의 buffer A를 흘려줌. 이후 AKTA prime plus내에 존재하는 pump를 사용하여 약 100 mL를 column에 loading 함. 50 mL의 buffer A를 사용하여 wash 하고, buffer A와 buffer B의 gradient를 사용하여 elution 한 후 fraction을 각각 10 mL씩 모음. 사용한 buffer는 아래 표에 명시하였음.

buffer	buffer 조성(1L)
Buffer A	20 mM sodium phosphate, pH 6.0, 10 mM NaCl
Buffer B	20 mM sodium phosphate, pH 6.0, 1M NaCl

- BPX 50/500 column (빔스바이오)에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column을 RO수로 equilibration.
- sample, 약 150 mL을 column에 loading하고 flow rate는 10 mL/min, fraction size는 12 mL 로 수행함

③ Anion exchange chromatography

- D317-71의 5 kDa 농축액을 사용하여 strong anion-exchange chromatography를 수행하기 위해 Q sepharose resin을 사용함. 하지만 배양액의 경우 conductivity가 높아서 resin에 target 단백질이 결합하지 못하는 경향이 있기 때문에 desalting을 수행 후 anion-exchange chromatography 수행 함.
- Gel filtration 수행 : D317-71의 5 kDa 농축액을 BPX 50/500 column (빔스바이오)에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column에 loading. flow rate는 10 mL/min, fraction size는 12 mL 로 수행함.

④ Anion-exchange chromatography 수행

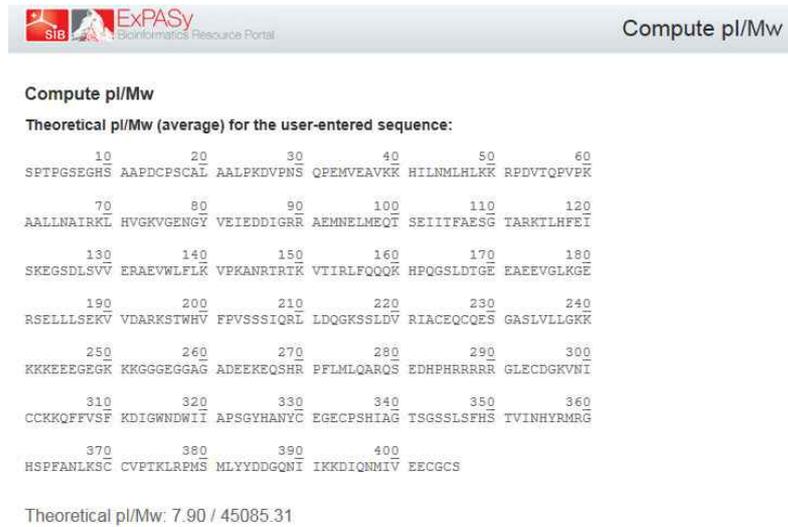
- D317-71의 5 kDa 농축액을 BPX 50/500 column (빔스바이오)에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column에 loading하여 desalting 한 후 #7-32를 모아 50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 10 mM NaCl로 보정하고 0.45 um로 filter후 loading.
- GE healthcare사의 HiPrep 16/20 Q sepharose의 pre-packing column을 AKTA prime plus, FPLC 기기에 연결하고 3mL/min의 유속으로 200 mL의 buffer A를 흘려줌. 이후 AKTA prime plus내에 존재하는 pump를 사용하여 약 100 mL를 column에 loading 함. 50 mL의 buffer A를 사용하여 wash 하고, buffer A와 buffer B의 gradient를 사용하여 elution 한 후 fraction을 각각 10 mL씩 모음. 사용한 buffer는 아래 표에 명시하였음.

(나) 연구결과

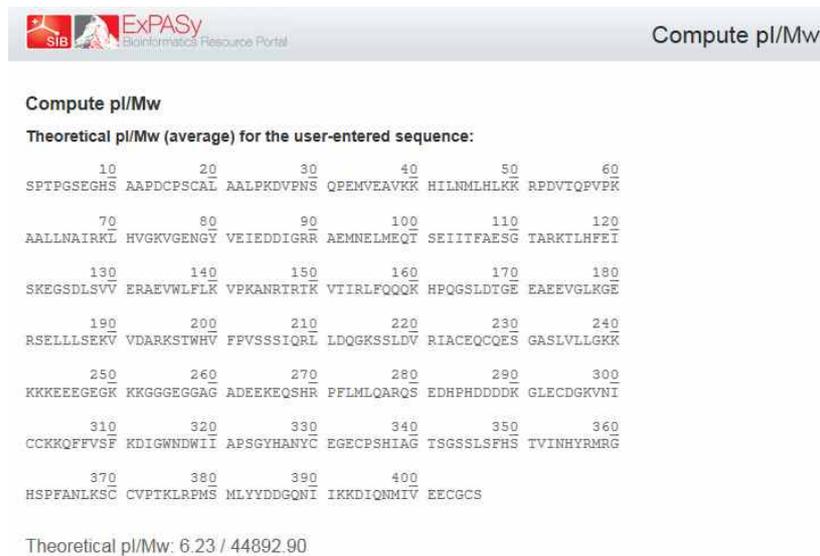
① 식물유래 Human Activin A 분리정제 프로세스 확립

- Human activin A를 분리정제를 위한 특성 분석
 - Human Activin A에 대한 pI, 분자량 계산: native human activin A에 대한 pI값 및 분자량을 컴퓨터 분석 툴을 이용하여 확인한 결과 pI 값은 약 7.9이고, 분자량은 45 kDa으로 확인 됨.
 - Enterokinase cleavage site를 첨가한 human activin A에 대한 pI 값 및 분자량 계산

결과 pI 값은 약 6.2이고 분자량은 44.8 kDa로 확인 됨



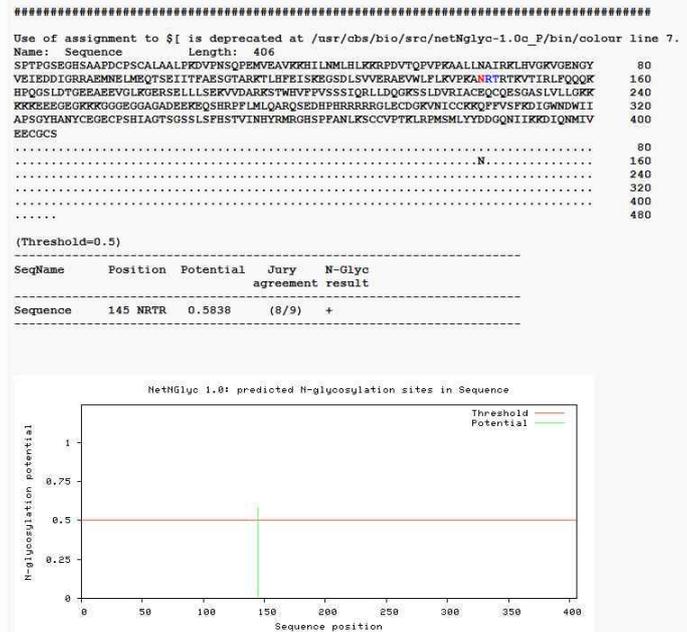
< 그림 329-1-23. Human Activin A에 대한 pI, 분자량 계산 >



< 그림 329-1-24. Enterokinase cleavage site를 첨가한 human activin A에 대한 pI 값 및 분자량 계산 >

○ 식물유래 human activin A의 N-glycosylation site 예측

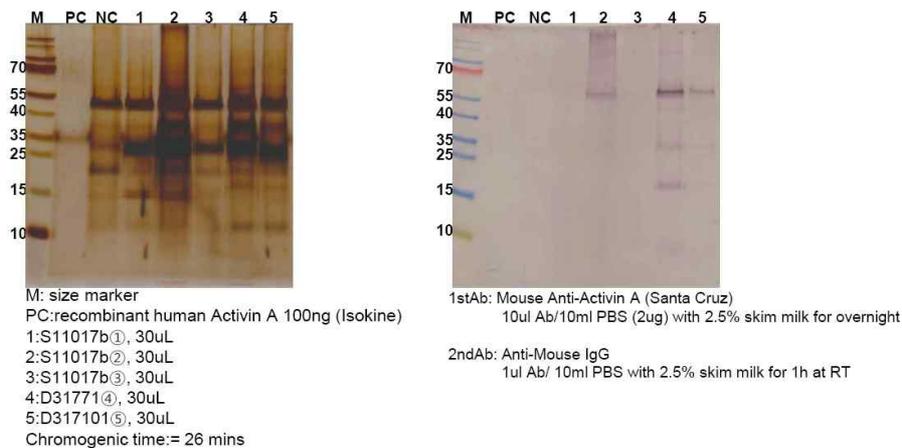
- 식물에서 N-glycosylation이 한군데 일어날 수 있지만 pro-activin A에서만 존재 하고 실제 active 한 activin A에서는 N-glycosylation site가 존재 하지 않음을 확인하였음. pro-activin A는 dimer를 이뤄야 active한 activin A로 modification이 일어나기에 분리 정제에 다소 영향을 미칠수 있을 것으로 판단 하였음.



< 그림 329-1-25. human activin A의 N-glycosylation site 예측 >

② 식물 유래 human activin A의 분리정제를 위한 필터 및 농축

- 각각의 배양액을 농축한 결과 5kDa에서 모든 단백질이 농축되는 것을 SDS-PAGE 이후 CBBR 염색으로 확인하였음.

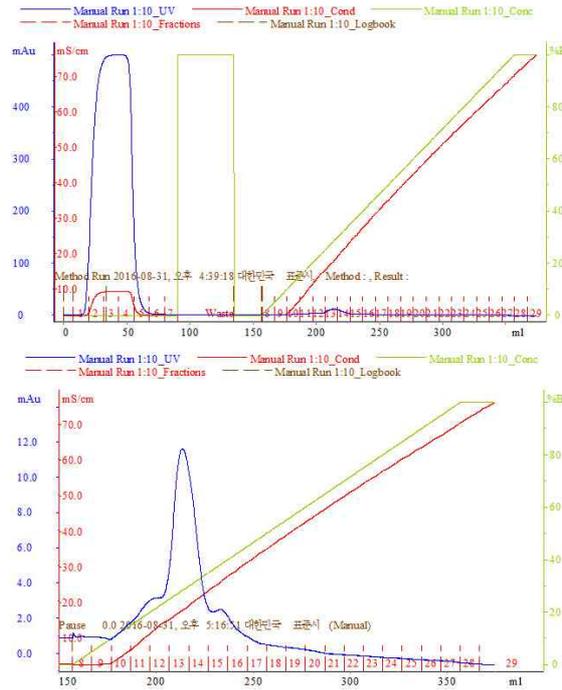


< 그림 329-1-26. 식물유래 human activin A 농축 및 cut-off >

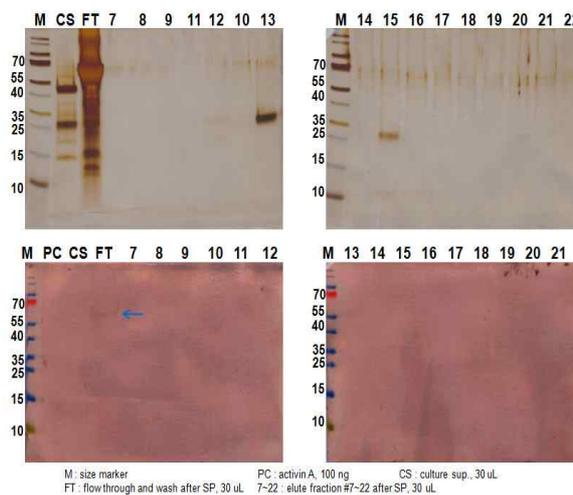
③ Cation-exchange chromatography

- Cation-exchange chromatography 수행
 - activin A의 pI 값이 pH 7.0에 근접하기에 일반적인 CM sepharose나 DEAE sepharose를 사용하는 것보다 strong ion exchange chromatography를 위한 mono Q나 SP sepharose가 적합 할 것으로 판단하여 GE healthcare사의 HiPrep 16/20 SP sepharose의

pre-packing column을 AKTA prime plus, FPLC 기기에 연결하고 실시하였음
 - 상기 activin A를 분리정제 한 후 크로마토그램을 GE healthcare사의 PrimeView Evaluation 프로그램을 사용하여 분석함. 거의 모든 단백질이 붙지 않고 flow through로 빠져 나오는 것을 A280nm의 흡광도를 통해 확인하였으며, 각각의 fraction을 모두 SDS-PAGE와 western blot을 수행한 결과 SP sepharose resin에 결합하지 못하고 flow through에 activin A가 존재하는 것을 확인 함.



< 그림 329-1-27. SP sepharose를 이용한 cation-exchange chromatography 결과 >

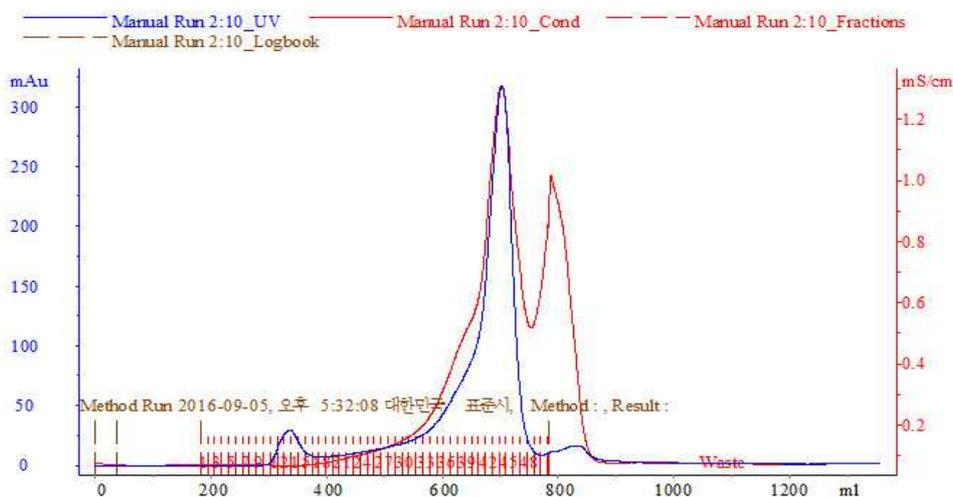


< 그림 329-1-28. SP sepharose를 이용한 cation-exchange chromatography의 Western blot analysis >

- Gel filtration 수행 : activin A가 SP sepharose resin에 결합하지 않고 flow through에 존재하기 때문에 모든 flow through를 모아 desalting 수행하였음
- BPX 50/500 column (빔스바이오)에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column을 RO수로 equilibration한 후에 sample, 약 150 mL을 column에 loading하고 flow rate는 10 mL/min, fraction size는 12 mL 로 수행하였음
- Gel filtration수행 결과 main peak가 salt 및 buffer 뒤에 나오는 것을 확인.
- Sephadex G-25를 사용하여 desalting 수행할 경우 효과적으로 activin A fraction을 분리하기 어려웠음.
- Desalting 이후 fraction #1-8, #9-20, #21-30과 #31-55를 각각 모아 이후 실험을 진행하였음

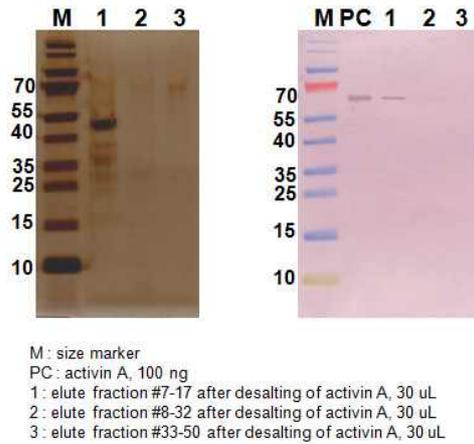
④ Anion exchange chromatography

- Anion exchange chromatography 수행을 위한 gel filtration 수행
- chromatography : D317-71의 5 kDa 농축액을 사용하여 strong anion-exchange chromatography를 수행하기 위해 Q sepharose resin을 사용하나 배양액의 경우 conductivity가 높아서 resin에 target 단백질이 결합하지 못하는 경향이 있기 때문에 desalting을 수행 후 anion-exchange chromatography 수행하였음
- D317-71의 5 kDa 농축액을 BPX 50/500 column에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column에 loading하고 flow rate는 10 mL/min, fraction size는 12 mL 로 수행하였음
- D317-71 cell line의 5 kDa 농축액을 desalting 한 결과 main peak가 buffer 보다 뒤에 나타났음. fraction #7-17, #8-32와 #33-50을 모두 모아 SDS-PAGE 와 western blot 수행하여 activin A의 fraction을 확인하였음.



< 그림 329-1-29. D317-71 cell line의 5 kDa 배양액의 Gel filtration 수행 후 chromatography >

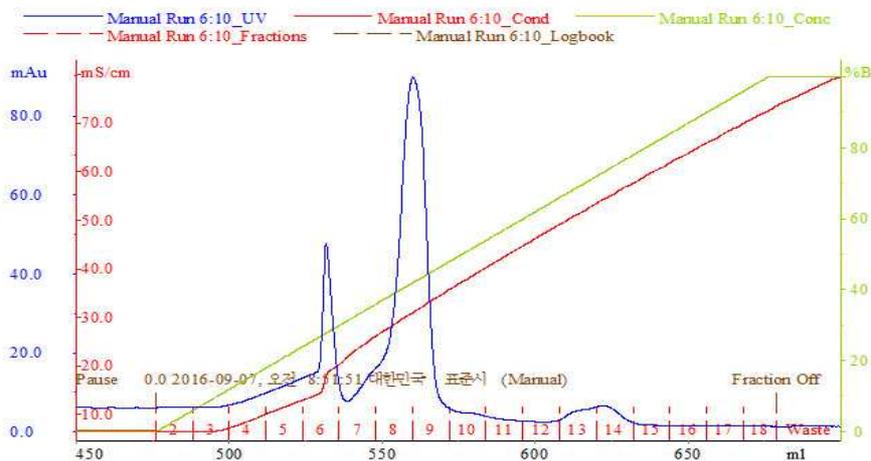
- Western blot analysis에서 fraction #7-17에서 activin A band 확인 함. 따라서 #7-32 모두 모아 strong anion-exchange chromatography 수행하여 밴드를 확인하였음



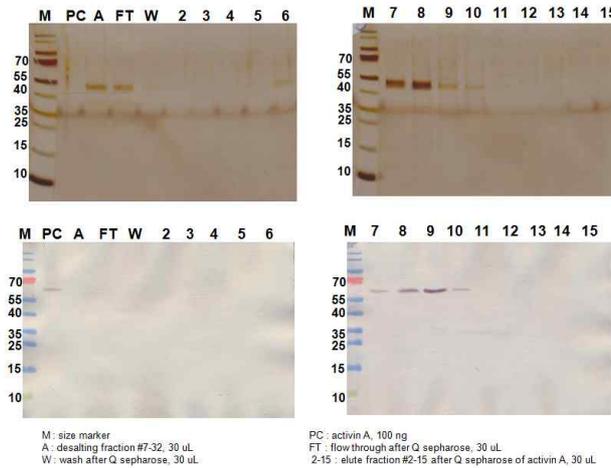
< 그림 329-1-30. D317-71 cell line의 5 kDa 배양액의 Gel filtration 수행 후 SDS-PAGE와 western blot analysis 수행 >

○ Anion exchange chromatography 수행

- D317-71의 5 kDa 농축액을 BPX 50/500 column (빔스바이오)에 sephadex G25 약 1L가 packing 되어 있는 column에 loading하여 desalting 한 후 #7-32를 모아 50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 10 mM NaCl로 보정하고 0.45 um로 filter후 loading.
- Q sepharose를 이용한 Anion exchange chromatography 수행하고 각각의 fraction을 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 이용하여 확인한 결과 fraction #7,8,9,10에서 activin A의 band를 확인 하였고 #7-10을 모아 desalting을 수행함.



< 그림 329-1-31. Q sepharose를 이용한 anion exchange chromatography >



< 그림 329-1-32. Q sepharose를 이용한 anion exchange chromatography의 SDS-PAGE와 western blot >

(5) 벼 현탁세포 유래 activin A의 활성 확인

□ 연구수행 내용

(가) Suspension culture & secretion

① western blot analysis를 이용하여 선별된 Activin A 고발현 켈러스 라인 중에서, pMYD317 #71 벼 켈러스로부터 생화학적 분석을 위한 실험을 수행하기 위하여 잘게 배양된 pMYD317 #71 callus를 진공펌프를 이용하여 기존 배양액을 제거하고 sucrose가 제거되고 50mg/L hygromycin을 첨가한 N6 액체배지 (N6-S)에 10ml/g 비율로 접종하여 7일간 배양 하였다. 당 결핍 상태에서 Activin A 단백질의 분비를 유도하였고 배양액을 취한 뒤, 생화학적 분석을 진행 하였다.

(나) Western blot analysis & Quantitation

① 벼 켈러스로부터 생산되는 Activin A 양 비교를 위하여 여러 켈러스 라인(pMYD317 #69, #70, #71)으로부터 Activin A 단백질을 유도하였다. 당 결핍상태에서 분비된 pro-activin A (propeptide + mature activin A) 단백질에 enterokinase 효소 처리를 하여 propeptide와 mature activin A protein을 분리하였다.

(다) pH에 따른 Activin A 단백질의 안정성 조사

① 안정성 비교 control 및 샘플 확보

○ 벼 유래 재조합 Activin A 안정성은 당 결핍 액체배지에서 유도된 분비 단백질이 포함된 배양액을 이용하여 확인 하였다. 보관 버퍼에 의한 pH 안정성을 진행하기 위하여 총 4가지 pH별로 (pH 4, pH 7, pH 9, pH 11) 테스트 하였다. pH 4는 Acetate buffer, pH 7은 PBS buffer, pH 9는 Tris-HCl buffer, 그리고 pH 11는 Glycine-NaOH buffer를 사용하였다.

각 pH에 해당하는 buffer를 2000 MWCO membrane을 이용하여 dialysis를 O/N동안 진행하였고, 버퍼 교체된 activin A를 이후 pH 안정성 실험에 적용하였다. 이후 단백질 안정성 조사는 버퍼 및 온도의 영향이 단백질의 안정성에 영향이 있다고 보고된 자료를 참고하여 진행되었다 (Ugwu et al., 2004).

② pH dependence

- 버 유래 재조합 Activin A 안정성은 당 결핍 액체배지에서 유도된 분비 단백질이 포함된 배양액을 이용하여 확인 하였다. pH에 따른 Activin A 단백질의 안정성을 조사하기 위해 pH별로 37°C에서 48h 동안 반응 시켰다. 각각의 반응의 반복 횟수는 3회 실시 하였다 (그림 329-1-33).

온도	4°C		23°C		40°C		60°C		단위
	P.C	pMYD317	P.C	pMYD317	P.C	pMYD317	P.C	pMYD317	
P.C	1 (10ng)	-	1 (10ng)	-	1 (10ng)	-	1 (10ng)	-	ul
pMYD317 #71	-	16	-	16	-	16	-	16	ul
10x phosphate buffer	15	-	15	-	15	-	15	-	ul
Total vol.	16	16	16	16	16	16	16	16	ul

- 10x phosphate buffer: phosphate buffer saline (Sigma P5368) + 10mM DTT
- P.C: positive control, Activin A (338-AC-010) from CHO cell
- Incubation time: 37°C, 48h
- Triplicate

< 그림 329-1-33. Activin A의 pH dependence 분석을 위한 reaction mixture >

(라) 열 처리에 따른 Activin A (pMYD317 #71)의 안정성 조사

① 안정성 비교 control 및 샘플 확보

- 버 유래 재조합 분비 단백질 Activin A의 열처리에 따른 안정성을 조사하기 위해 현재 판매되고 있는 R&D systems사의 CHO cell 유래의 recombinant Human/Mouse/Rat Activin A (338-AC-010)와 비교하였다.

② Thermal dependence

- 버 유래 재조합 Activin A 안정성은 당 결핍 액체배지에서 유도된 분비 단백질이 포함된 배양액을 이용하여 확인 하였다. 열처리에 따른 Activin A 단백질의 안정성을 조사하기 위해 pH별로 4°C, 23°C, 40°C, 60°C 각각에서 48h 동안 반응 시켰다. 각각의 반응의 반복 횟수는 3회 실시 하였다 (그림 329-1-34).

온도	4°C		23°C		40°C		60°C		단위
	P.C	pMYD317	P.C	pMYD317	P.C	pMYD317	P.C	pMYD317	
P.C	1 (10ng)	-	1 (10ng)	-	1 (10ng)	-	1 (10ng)	-	ul
pMYD317 #71	-	16	-	16	-	16	-	16	ul
Buffer*	15	-	15	-	15	-	15	-	ul
Total vol.	16	16	16	16	16	16	16	16	ul

- 10x phosphate buffer: phosphate buffer saline (Sigma P5368) + 10mM DTT
- P.C: positive control, Activin A (338-AC-010) from CHO cell
- Incubation time: 48h
- Triplicate
- *Buffer: Acetate buffer (pH 4), PBS (pH 7), Tris-HCl (pH 9), Glycine-NaOH buffer (pH 11)

< 그림 329-1-34. Activin A의 Thermal dependence 분석을 위한 reaction mixture >

③ SDS-PAGE 및 western blot을 통한 활성 측정

- 보관 샘플 20ul와 4X reduce sample buffer 5ul를 혼합하여 5분간 97°C에서 denaturation시킨 후 20ul를 4~20% gradient SDS-PAGE gel에 loading하여 전기영동을 수행하였고, western blot analysis를 수행하여 단백질 안정성을 분석하였다. 확인된 Western blot analysis band를 앞서 언급된 GelDoc XR+ system (Bio-Rad)를 사용하여 정량화를 비교 분석 하였다. 각 조건마다 실험은 3반복으로 진행하였다.

(라) 보관 버퍼, 보관 온도 및 기간에 따른 Activin A 단백질의 안정성 조사

① 재조합 Activin A의 투석 및 보관

- 형질전환 벼 캘러스로부터 분리된 재조합 Activin A(pMYD317) 단백질이 포함된 배지를 30,000MWCO Centrifugal concentrator(VS0122, Satorius)를 이용하여 제품 매뉴얼대로 30kDa 이하 size protein의 cut off를 진행하였다. Cut-off된 단백질이 포함된 배지를 Thermo사의 Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes 3.5K MWCO를 이용하여 4°C에서 이틀간 Tris-HCl buffer, phosphate buffer를 이용한 투석을 진행하여 Activin A의 보관 버퍼를 변경 하였다.
- 각각의 버퍼에 포함된 Activin A 단백질을 20ul씩 aliquot하여 room-temperature(RT), 4°C, -20°C, -75°C에 보관하였고, freeze-thaw recycle(FT)에 따른 안정성을 측정하기 위해 1회 RT에서 녹인 후 4°C, -20°C, -75°C에 각각 보관하였다. 비교군으로 CHO cell 유래 재조합 Activin A 단백질은 Tris buffer와 phosphate buffer(PBS) 19ul에 1ul(10ug)씩 희석하여 위와 같은 동일한 조건으로 보관하였다.

② SDS-PAGE 및 western blot을 통한 활성 측정

- 보관 샘플 20ul와 4X reduce sample buffer 5ul를 혼합하여 5분간 97°C에서 denaturation시킨 후 20ul를 4~20% gradient SDS-PAGE gel에 loading하여 전기영동을 수행하였고, western blot analysis를 수행하여 단백질 안정성을 분석하였다. 확인된 Western blot analysis band를 앞서 언급된 GelDoc XR+ system (Bio-Rad)를 사용하여 정량화를 비교 분석 하였다. 각 조건마다 실험은 3반복으로 진행하였다.

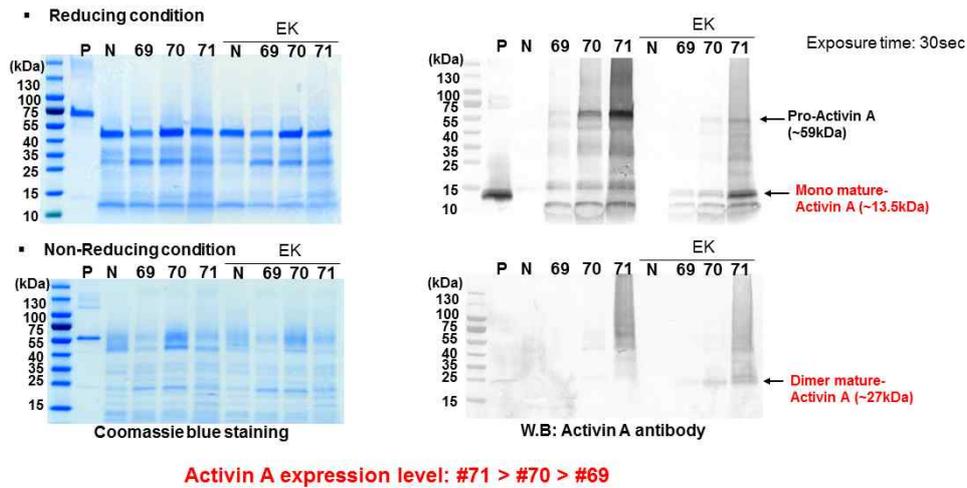
□ 연구수행 내용

(가) 생화학적 분석을 위한 Activin A 단백질 확보

① Suspension culture & secretion

- 3개의 캘러스 라인 (#69, #70, #71)으로부터 분리된 mature activin A과 pro-activin A 형태의 단백질을 reducing 조건과 non-reducing 조건으로 western blot analysis를 진행하여 mature activin A의 monomer형태 (~13.5kDa)와 dimer형태 (~ 27kDa)를 확인하였다. CHO cell 유래 activin A를 positive control로 사용하였고, 이와 동일한 위치에서 모든 캘러스라인으로부터 분리된 mature activin A band를 확인하였다(그림

329-1-35). 이 중에서 #71번 캘러스라인이 activin A의 발현율이 가장 높은 것으로 조사되었고 그 뒤로 #70번 라인이 중간의 발현율을 보였다.



< 그림 329-1-35. 벼 캘러스 샘플별 activin A 발현을 비교 >

- 확인된 Western blot band를 GelDoc XR+ system (Bio-Rad)를 사용하여 visualization 진행하였고, Image Lab™ software (ver. 5.1, Bio-Rad)을 이용한 the method outlined online (<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>) 방법으로 Activin A band를 이용하여 양 비교를 하였다 (Gassmann et al., 2009; Tan and Ng, 2008). 이후 양 측정을 포함하여 진행한 실험에서는 앞에 언급된 방법으로 진행 하였다.
- Enterokinase 효소 처리된 #69, #70, #71의 Monomer형태인 mature-activin A western blot band를 양 비교 한 결과, #71번 샘플에서 분리된 mature activin A는 positive control 양과 비교하였을 때 약 7.02 mg/g의 양이 확인되었다 (그림 329-1-36).

Mono mature-Activin A band									
No.	Label	Type	Std. Dev.	Quant.(ng)	Loading sample vol.(ul)	Total secretion vol.(ml)	Total Quant. (mg/40ml)	Callus (g)	Quant. (mg/g)
1	ActivinA #69EK	Unknown	96.054742	4.9	32.913	40	5.96	4	1.49
2	ActivinA #70EK	Unknown	137.312906	7.0	32.913	40	8.51	4	2.13
3	ActivinA #71EK	Unknown	454.89204	23.1	32.913	40	28.07	4	7.02
P	ActivinA Std	Standard	590.26338	30.0					

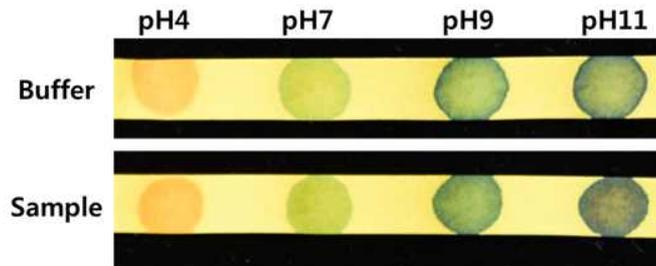
< 그림 329-1-36. Mature-activin A 양 비교 >

(나) pH에 따른 Activin A 단백질의 안정성 조사

①) 안정성 비교 control 및 샘플 확보

- 벼 유래 재조합 Activin A 안정성은 당 결핍 액체배지에서 유도된 분비 단백질이 포함된

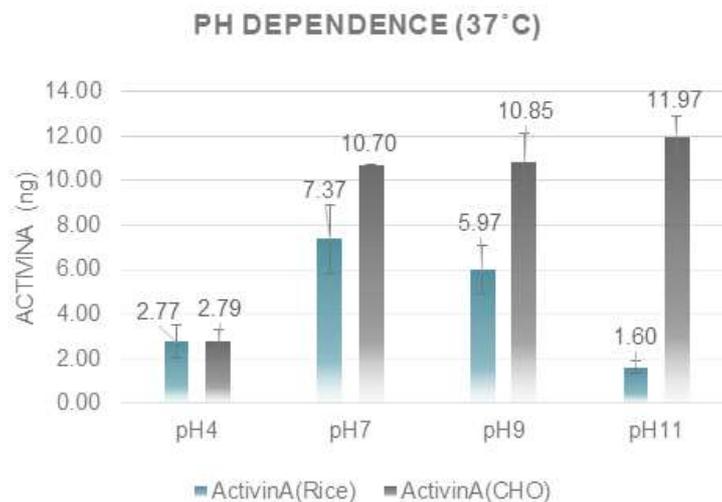
배양액을 이용하여 확인 하였다. 각 pH에 해당하는 buffer를 2000 MWCO membrane을 이용하여 dialysis를 O/N동안 진행하였고, 버퍼 교체된 activin A를 이후 pH 안정성 실험에 적용하였다 (그림 329-1-37).



< 그림 329-1-37. Activin A 보관 버퍼의 pH별 교체 >

② pH dependence: SDS-PAGE 및 Western blot analysis를 이용한 단백질 안정성 측정

○ 확인된 Western blot band를 앞서 언급된 GelDoc XR+ system (Bio-Rad)를 사용하여 정량화를 하였다. pH 4에서는 CHO cell 유래와 벼 유래 Activin A 공통적으로 낮은 안정성을 보였다. CHO cell 유래 activin A는 pH 4를 제외하고 pH 7, 9, 11에서 안정성의 변화는 없었지만 벼 유래 activin A는 pH 7에서 안정적인 pH 안정성을 보이다가 점점 낮아지는 경향을 보였다. 벼 유래 activin A는 정제과정을 거친 순도가 높은 상태가 아니었으므로 배지에 분비된 단백질 분해 효소 등과 같은 다른 단백질에 대한 영향이 있을 수 있다고 판단된다. 확실한 것은 pH 7에서 activin A 단백질은 높은 안정성을 보인다(그림 329-1-38).



< 그림 329-1-38. Activin A 단백질의 pH dependence 안정성 >

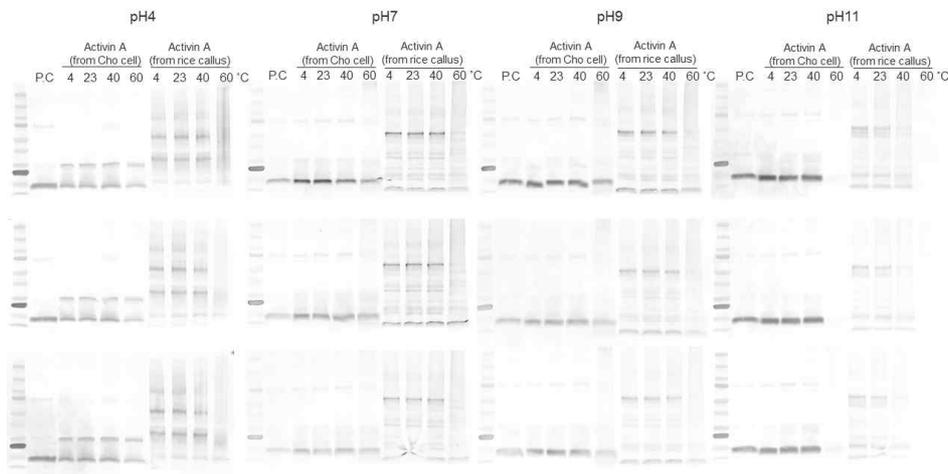
(다) 열 처리에 따른 Activin A (pMYD317 #71)의 안정성 조사

① 안정성 비교 control 및 샘플 확보

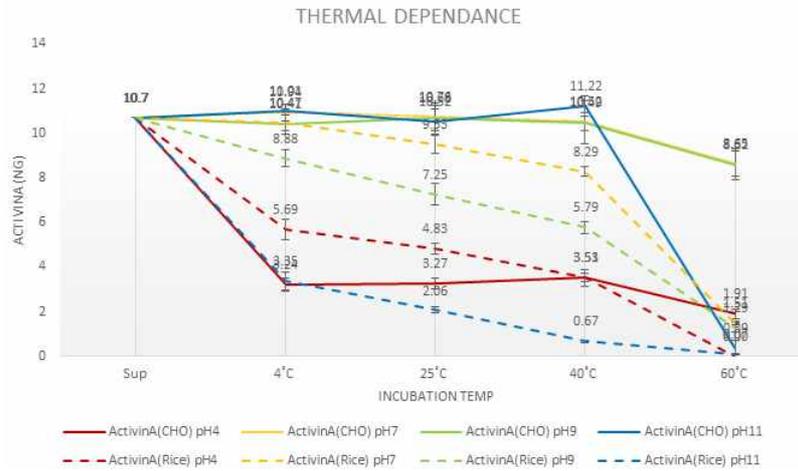
○ 이전 단백질 발현 결과에서 10ng의 CHO cell 유래 재조합 Activin A와 16ul pMYD317 #71 분비 단백질이 포함된 배지를 각각 실험에 사용하였다. 벼 유래 재조합 Activin A 안정성은 당 결핍 액체배지에서 유도된 분비 단백질이 포함된 배양액을 이용하여 확인하였다. 보관 버퍼에 의한 열 처리 안정성을 함께 진행하기 위하여 총 4가지 pH별로 (pH4, pH7, pH9, pH11) 테스트 하였다. 버퍼는 pH 안정성 테스트와 동일한 방법으로 진행하였다.

② Thermal dependence: SDS-PAGE 및 Western blot analysis를 이용한 단백질 안정성 측정

○ pH 11에 보관된 CHO cell 유래 Activin A는 60°C에서 밴드가 완전히 보이지 않았고, pH 4와 pH 11에 보관된 벼 유래 Activin A는 60°C 열처리에서 완전히 안정성이 없는 것으로 나타났다. CHO cell 유래와 벼 유래 Activin A 공통적으로 pH 7에서 가장 안정적인 안정성을 보였고 그 중 23°C까지 안정적인 보관성을 보였다 (그림 329-1-39, 329-1-40).



< 그림 329-1-39. Western blot analysis를 이용한 pH, 온도별 Activin A Thermal dependence >



< 그림 329-1-40. pH, 온도별 Activin A Thermal dependance >

(다) 보관 버퍼, 보관 온도 및 기간에 따른 Activin A 단백질의 안정성 조사

① 재조합 Activin A의 보관 버퍼, 보관 온도 및 기간에 따른 안정성 분석

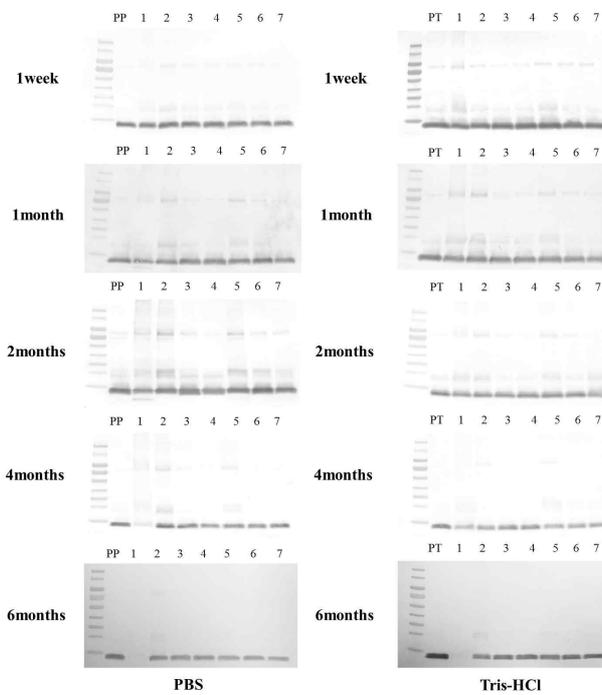
- 형질전환 벼 캘러스로부터 분리된 재조합 Activin A의 보관버퍼, 온도 및 기간에 따른 안정성 조사의 조건을 도표화하였다 (그림 329-1-41).

Storage temperature	보관온도																Freeze-thaw recycle											
	RT 23°C		4°C				-20°C				-75°C				4°C		-20°C				-75°C							
Buffer	Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos		Tris		Phos	
	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A	PC	A.A
P.C	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
Activin A	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20
D.W	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-
Final vol.	20 ul																											
<ul style="list-style-type: none"> • P.C: positive control, Activin A from CHO cell(R&D 338-AC-010) • Activin A(A.A) : 벼 유래 Activin A(pMYD317 #71 line) 분비 단백질 • 보관 기간 : 0day, 1week, 1month, 2months, 4months, 6months • Triplicate 																												

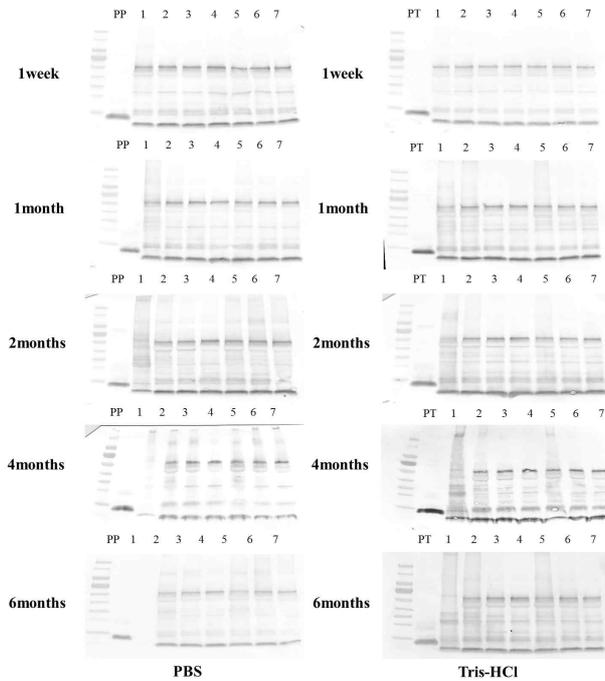
< 그림 329-1-41. Activin A의 보관버퍼, 온도, 기간에 따른 안정성 분석을 위한 reaction mixture >

- 형질전환 벼 유래의 Activin A 단백질 보관 시 희석(보관) 버퍼에 따른 안정성을 비교하기 위해 보편적으로 많이 사용하는 저장 버퍼인 PBS (pH 7)와 Tris-HCl (pH 9)를 이용하여 실험을 진행하였으며, CHO cell 유래 Activin A를 이용한 실험결과를 각 조건의 control로

사용하였다. Western blot analysis 결과에서 CHO cell 유래 Activin A는 보관 기간이 4개월 후부터 PBS, Tris-HCl 둘다 RT에서 단백질 안정성이 급격히 저하되는 경향이 보였고, 6개월 보관기간에는 RT에서 band가 거의 degradation 된 것을 확인 하였다. 그리고 RT를 제외한 다른 온도에서는 모든 기간에서 band의 큰 유의차는 확인되지 않았다. 베타 유래 Activin A 단백질은 1주를 제외한 나머지 보관기간에 RT에서 Activin A의 유의한 degradation이 관찰 되었고, PBS에 보관된 베타 유래 Activin A는 RT 2개월 차부터 상당히 유의한 degradation이 되어 거의 안정성이 없는 것으로 관찰되었다. 반면, Tris-HCl에서 보관된 베타 유래 Activin A는 RT 4개월부터 상당한 degradation이 관찰되었다. 이 결과에서 RT에서는 PBS보다 Tris-HCl에 보관에 대한 안정성이 높은 것으로 확인되었다 (그림 329-1-42, 329-1-43).



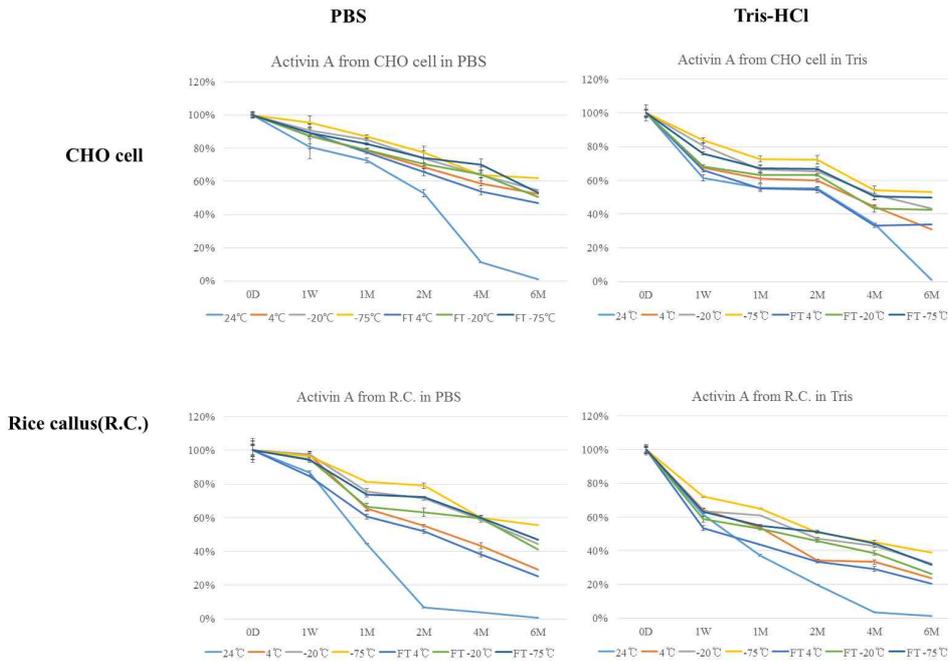
< 그림 329-1-42. CHO cell 유래 Activin A의 베타, 온도 및 기간에 따른 단백질 안정성 조사
 PP: P.C. in PBS buffer, PT: P.C. in Tris-HCl buffer, 1: RT, 2: 4°C, 3: -20°C, 4: -75°C, 5: FT 4°C, 6: FT -20°C, 7: FT -75°C >



< 그림 329-1-43. 벼 유래 Activin A(pMYD317)의 베퍼, 온도 및 기간에 따른 단백질 안정성 조사. PP: P.C. in PBS buffer, PT: P.C. in Tris-HCl buffer, 1: RT, 2: 4°C, 3: -20°C, 4: -75°C, 5: FT 4°C, 6: FT -20°C, 7: FT -75°C >

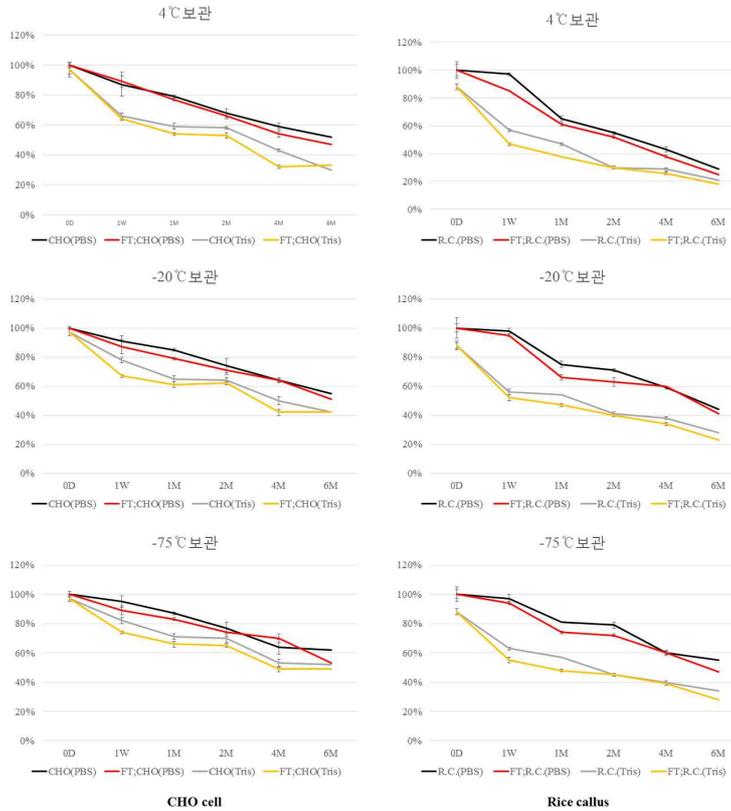
- Western blot 분석에서 확인된 band를 앞서 언급된 GelDoc XR+ system (Bio-Rad)를 사용하여 정량화 하여 좀 더 정확한 비교를 위해 그래프를 작성하여 비교하였다. 전체적인 그래프 양상을 볼 때 앞서 언급된 것처럼 Tris-HCl에 비해 PBS가 더 안정적으로 안정성이 유지됨을 확인 할 수 있다. 일주일 경과 후 Tris-HCl 보관 샘플의 경우 안정성이 급격히 떨어졌지만 PBS 보관 샘플은 비교적 안정적이었으며, PBS 보관 샘플의 경우 24°C를 제외한 나머지 온도조건에서 6개월 동안 보관되었을 때 20~65%의 안정성을 나타냈지만 Tris-HCl 보관 샘플은 20~55%의 안정성이 확인되었다. 이 결과로 인하여 저온보관시 PBS 보관 Activin A 단백질의 안정성이 더 높은 것으로 확인되었다. 단, 24°C에 Activin A를 보관할 경우 CHO cell 유래 단백질은 1개월까지는 PBS에서 더 높은 안정성을 보였으나 오랜 기간 보관할 경우에는 Tris-HCl이 더 안정적이다. Tris-HCl에서 6개월째 거의 안정성이 0%였지만 PBS에서는 4개월째부터 10%로 더 빠르게 안정성이 떨어졌고, 벼 유래 Activin A 에서도 비슷하게 Tris-HCl에서 4개월 보관했을 때 0%로 안정성이 떨어졌지만 PBS에서는 2개월째부터 거의 0%를 나타냈다. 이를 보아 24°C에 장기간 보관할 경우에는 Tris-HCl이 더 적합하다고 판단된다. 또한 CHO cell 유래 Activin A 단백질과 비교했을 때 형질전환 벼 유래 Activin A 단백질의 경우 -75°C, -20°C, 4°C, 24°C로 온도가 높아질수록 안정성이 현저히 떨어지는 양상을 볼 수 있다. 하지만 -75°C에

보관한 단백질은 두 가지 buffer에서 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 해당 온도에 보관했을 경우에는 안정성이 비슷한 것으로 판단된다 (그림 329-1-44).



<그림 329-1-44. CHO cell 유래와 벼 유래 Activin A의 버퍼, 온도 및 기간에 따른 그래프 비교 >

- Freeze-thaw recycle(FT)에 따른 Activin A 단백질의 안정성을 확인하기 위하여 1일 동안 -75°C에서 얼렸던 CHO cell 그리고 형질전환 벼 유래 샘플들을 RT 조건에서 1일 보관하여 녹인 후 다시 4°C, -20°C, -75°C에 각각 보관하였다. 그 결과 0일차부터 해당 온도에 계속 보관된 샘플과 FT 처리구가 모든 보관온도 조건에서 큰 차이를 보이지 않았으며 두 가지 각각의 buffer에서 FT 처리구와 무처리구의 그래프 양상은 비슷하였다. 또한 모든 조건에서 PBS 버퍼에 보관된 Activin A가 Tris-HCl 버퍼에 보관된 것보다 높은 안정성을 보였다 (그림 329-1-45).



< 그림 329-1-45. CHO cell 유래와 벼 유래 Activin A 단백질의 freeze-thaw recycle(FT) 처리에 따른 안정성 비교 >

2. 식물 viral vector를 이용한 activin A 생산기술 개발

○ 연구수행기관 : 전북대학교, (주)엔비엠

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- (1) 식물 viral vector를 이용한 native human activin A의 생산 기술개발
 - ① Native activin A 유전자를 포함하는 고발현 식물벡터 제작
 - ② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환
 - ③ 형질전환체의 분자생물학적 분석
- (2) 식물 viral vector를 이용한 EK site가 도입된 activin A의 생산 기술개발
 - ① EK site가 도입된 activin A 유전자를 포함하는 고발현 식물벡터 제작
 - ② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환
 - ③ 형질전환체의 분자생물학적 분석

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

- Activin A는 TGF- β family로 신장, 췌장 및 전립선 등 다양한 조직에서 발견되며, 여러 세포들에 작용하여 분화 및 발생을 유도하는 역할을 한다.
- 최근에는 줄기세포배양의 인자로서 수요가 늘고 있으나 단백질의 특성상 미생물에서의 재조합 단백질의 생산이 불가능한 상황으로 대부분을 동물세포(Pangas and Woodruff, 2002, J. Endocrinol. 172:199-210) 및 곤충세포(Ciaran et al., 1998, The Intern'l J. Biochem. & Cell Biol. 30: 1129 - 1145)배양을 통하여 생산하고 있음
- Activin A는 homo dimer의 형태로 이루어지는 관계로 미생물에서의 생산이 되지 않아 현재 동물세포에서 생산하여 사용되는 매우 고가 단백질 임(1200만원/mg)
- 본 연구는 상기와 같은 이유로 산업화 가능성이 매우 높은 activin A를 식물 viral vector를 이용한 생산기술을 개발하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

(1) 식물 viral vector를 이용한 native human activin A의 생산 기술개발

(가) 연구개발 수행내용

① Human activin A의 transient expression vector에 클로닝

- TMV based vector인 pMYV150에 주관 기관인 NBM으로부터 받은 두 종류의 human activin A 유전자를 pMYV150에 삽입하여 pMYD216과 pMYD217 (with 6 his tag)로 명명하였다.

② Electroporation을 이용한 Agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환

- Electrocompetent agrobacteria cell을 만들기 위하여 agrobacteria (strain GV3101)을 50 mg/L rifampicin이 첨가된 5 ml의 LB medium에 접종하여 28 $^{\circ}$ C, 암상태의 현탁배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후 agrobacteria 만을 수거하여 항생제를 제거하기 위하여 차갑게 준비된 500ul의 10% glycerol을 이용하여 2번 washing 하였다.
- Pellet에 차갑게 준비된 100 ul의 10% glycerol로 resuspension 한 후 25 ul를 취하여 미리 차갑게 준비된 EP tube에 분주하여 electrocompetent cell을 준비하였다. 25 ul의 electrocompetent cell에 상기에서 준비된 1 ul의 plasmid DNA를 첨가한 후 미리 차갑게 준비된 cuvette에 mixture를 넣고 ice에서 5분간 방치하였다. GenePulser를 이용하여 1800 kV, 25 uF 그리고 200 Ω 조건하에서 형질전환을 수행하였다.
- 형질전환 된 electorcompetent cell을 EP tube에 옮긴 후 신선한 1ml의 LB 배지를 첨가한 후 28 $^{\circ}$ C에서 2-3시간 암 상태에서 현탁배양 하였다. 형질전환 된 세포를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에 도말하여 28 $^{\circ}$ C에서 2-3일 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 항생제가 첨가된 배지에서 형성된 단일 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출 한 후 제한 효소 처리로 상기의 유전자들이 성공적으로 도입된 것을 확인하였다.

③ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYD216과 pMYD217이 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재 현탁하였다. Agrobacterium 현탁액은 OD600에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe를 이용하여 infiltration을 수행하였다.
- Syringe를 이용한 direction injection은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*의 잎의 뒷면에 박테리아 현탁액을 주사기 바늘 없이 주사기로 주입함으로써 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 pMYD216과 pMYD217의 각각의 박테리아 현탁액을 조건 당 2개 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 11일동안 성장하였고, infiltration 후 5,8 그리고 11에 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리하였다. 또한 효과적인 aroinfiltration조건을 확립하기 위하여 아그로박테리아 현탁액 농도를 OD600에서 0.3, 0.6 그리고 0.9로 맞춘 후 syringe를 이용하여 direct injection을 수행하였다.

④ 분자생물학적 분석(SDS-PAGE와 Western blot analysis)

- Activin A의 발현을 확인하기 위하여 시간별로 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 µg의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie's brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화 되었다.
- Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 biotinylated anti-human activin A antibody을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:500으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였으며 이차 항체로 anti-Mouse IgG Ap conjugated을 1:7000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척 한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

⑤ Furin treatment

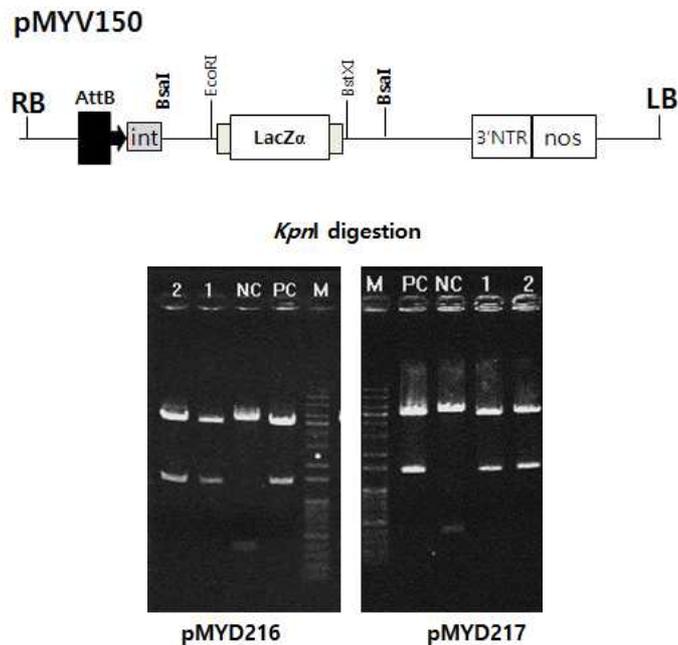
- Human ActivinA의 propeptide와 mature peptide 사이에 존재하는 furin cleavage site를 furin을 처리함으로써 matur form activin A가 형성되는지를 알아보기 위하여

수행하였다. 50 ul의 전체 단백질에 25 ul의 substrate buffer를 첨가한 후 2U furin을 첨가하여 30°C에서 하루 동안 반응 시켰다. 이후 mature form human activinA를 확인하기 위하여 상기에 기술한 바와 같이 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① Human activin A의 고발현 식물벡터로 클로닝

○ TMV based vector인 pMYV150에 own signal sequence+prosequence+mature activinA 와 own signal sequence+prosequence+mature activinA+6his를 삽입하여 pMYD216과 pMYD217로 명명하였고 infiltration을 위해 agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환 하였다 (그림 329-2-1).



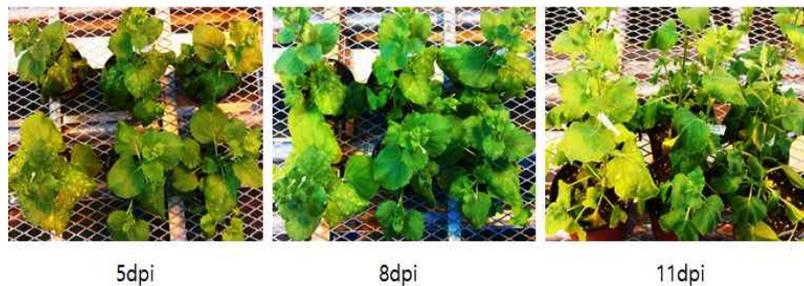
< 그림 329-2-1. Human activin A유전자의 TMV based vector (pMYV150)로의 클로닝 >

② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환 및 human activinA의 발현 확인

○ Agroinfiltration 법을 이용한 pMYD216과 pMYD217의 발현을 알아보기 위하여 syringe를 이용하여 상기에서 기술한 바와 같은 방법을 이용하여 infiltration 하였으며 5, 8 그리고 11일 째 잎을 수확하여 단백질을 추출하여 SDS-PAGE, Western blot analysis를 수행하였다. 처리구당 2반복이상 수행하였으며 날짜별로 식물의 성장상태를 조사하였다 (그림 329-2-2). Denaturing 형태와 native 형태의 human activin A의 발현을 확인하기 위한 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행 하였다. 그 결과

pMYD216과 pMYD217이 발현된 식물체 모두에서 reducing condition에서 monomeric form으로 예상되는 14kDa보다 큰 dimeric form의 28kDa에서 PC로 사용한 insect유래의 activin A와 유사한 크기에서 확인되었다 (Pangas et al., 2002). 또한 다양한 형태의 multimeric form이 확인되었다. Non-reducing condition에서는 pro peptide가 절단되지 않은 형태의 dimeric form인 대략 110 kDa에서 확인되었으며, PC로 사용된 insect유래의 activinA는 mature peptide의 dimeric form인 28 kDa에서 확인되었다(그림 329-2-3). 이러한 결과를 통해서 *N. benthamiana*를 이용한 transient expression에서 human activinA의 발현이 성공적으로 이루어짐을 확인하였으나 활성 형태인 mature form으로 전환되기 위해서는 propeptide와 mature peptide사이에 있는 furin cleavage site가 절단되어야 하나 *N. benthamiana*에는 동물 유래의 효소중 하나인 furin이 존재하지 않는 것으로 사료되며 따라서 propeptide형태의 dimeric form과 multimeric form만이 형성되는 것으로 확인되었다.

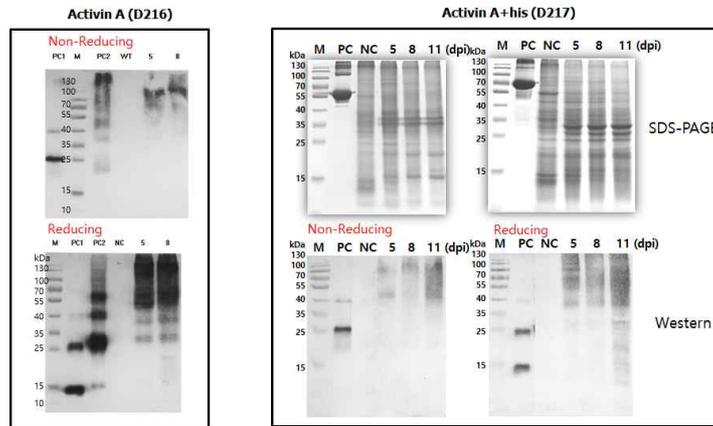
D216- *N.benthamiana* condition



D217: *N.benthamiana* condition



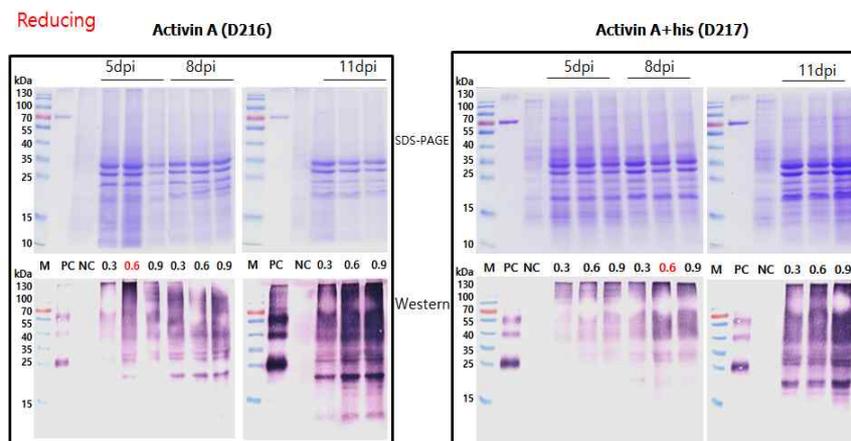
< 그림 329-2-2. Agroinfiltration후 pMYD216과 pMYD217이 삽입된 식물체의 상태 >



< 그림 329-2-3. *Nicotiana benthamiana*에서 Non-reducing과 reducing condition에서 human activinA의 발현 >

③ 효과적인 Agroinfiltration법을 이용한 human activinA의 발현 확인

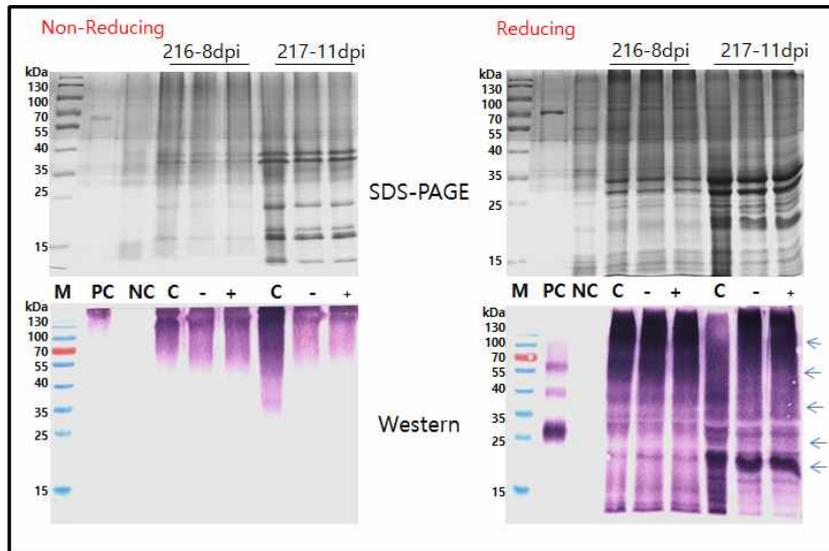
○ Agroinfiltration법을 이용하여 human activinA의 고 발현 조건을 확립하기 위하여 아그로박테리아 현탁액의 최적 농도를 결정하기 위하여 OD600에서 0.3, 0.6 그리고 0.9로 맞춘 후 4-6주 정도 자란 *Nenthamiana*잎에 syringe를 이용하여 direct injection을 수행하여 5, 8 그리고 11일째 잎을 수확하였다. 전체 단백질을 추출한 후 아그로 박테리아 현탁액 농도에 따른 고 발현 조건을 알아보기 위하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다 (그림 329-2-4). 그 결과 pMYD216과 pMYD217이 삽입된 식물체의 경우 모두 아그로 박테리아 현탁액 농도 OD600 0.6조건에서 8일 동안 자란 잎에서 가장 높은 발현율이 확인되었다. 배양 시간이 증가할수록 발현률이 높아지는 경향을 보이기도 하였지만 식물체의 상태등 전체적인 것을 고려할 때 아그로 박테리아 현탁액 농도 0.6과 배양 8일째가 가장 안정적인 human activinA의 고 발현을 보이는 것으로 사료된다.



< 그림 329-2-4. 아그로박테리아 현탁액 농도에 따른 human activinA의 고 발현 조건 확립 >

④ Furin 효소 처리로 mature form activinA의 확인

○ *Nicotiana benthamiana*에서 발현된 pro form의 human activinA가 mature form으로 전환되지 않는 것으로 확인되었으며, furin 효소를 처리하여 mature form으로 전환되는지를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다 (Wilbers et al., 2016). 그 결과 Non-reducing condition에서 furin을 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 모두 동일하게 multimeric form의 110kDa이상의 단백질이 확인되어 furin 처리에 의해 mature form으로 전환되지 않은 것을 확인하였다 (그림 329-2-5).



< 그림 329-2-5. Furin 처리에 따른 mature form activin A의 확인. PC: 150ug of derived from insect; NC: 20ul TSP of wild type; C: 20ul of Crude; - : without Furin treated (30ul); + ; with Furin treated (30ul). >

(2) 식물 viral vector를 이용한 EK site가 도입된 activin A의 생산 기술개발

(가) 연구개발 수행내용

① EK site가 도입된 activin A 유전자(4DK-activin A)의 고발현 식물벡터로 클로닝

○ 2차년도 연구결과 furin cleavage site를 가진 precursor form의 activin A가 furin에 의해 cleavage되지 않음을 확인하여, mature form의 Antivin A와 Enterokinase cleavage site를 가진 precursor form의 Activin A의 유전자를 transient expression vector에 클로닝하였고, 정제의 용이성을 위하여 각각의 construction에 6개의 histidine 잔기를 C-terminal에 포함시킨 유전자 또한 클로닝 하여 pMYD308(mature Activin A), pMYD309(mature Activin A+His), pMYD310 (Enterokinase cleavage site를 가진 precursor form의 Activin A) 그리고 pMYD311 (Enterokinase cleavage site를 가진 precursor form의 Activin A+His)라고 명명하였다.

② Electroporation을 이용한 Agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환

- Electrocompetent agrobacteria cell을 만들기 위하여 agrobacteria (strain GV3101)을 50 mg/L rifampicin이 첨가된 5 ml의 LB medium에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후 agrobacteria 만을 수거하여 항생제를 제거하기 위하여 차갑게 준비된 500ul의 10% glycerol을 이용하여 2번 washing 하였다. Pellet에 차갑게 준비된 100 ul의 10% glycerol로 resuspension 한 후 25 ul를 취하여 미리 차갑게 준비된 EP tube에 분주하여 electrocompetent cell을 준비하였다. 25 ul의 electrocompetent cell에 상기에서 준비된 1 ul의 plasmid DNA들을 각각 첨가한 후 미리 차갑게 준비된 cuvette에 mixture를 넣고 ice 에서 5분간 방치하였다. GenePulser를 이용하여 1800 kV, 25 uF 그리고 200 Ω 조건하에서 형질전환을 수행하였다. 형질전환 된 electorcompetent cell을 EP tube에 옮긴 후 신선한 1ml의 LB 배지를 첨가한 후 28°C에서 2-3시간 암 상태에서 현탁배양 하였다. 형질전환 된 세포를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에 도말하여 28°C에서 2-3일 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 항생제가 첨가된 배지에서 형성된 단일 콜로니로부터 plasmid DNA를 추출 한 후 제한 효소 처리로 상기의 유전자들이 성공적으로 도입된 것을 확인하였다.

③ Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환

- pMYD308, 309, 310 그리고 311이 포함된 아그로박테리아를 50 mg/L rifampicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 암상태의 현탁 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 아그로박테리아 세포만을 분리한 후 infiltration medium (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 2% sucrose and 150 mg/L acetosyringone, pH5.6)에 재 현탁하였다. Agrobacterium 현탁액은 OD600에서 0.3이 되도록 infiltration medium으로 희석하여 syringe를 이용하여 infiltration을 수행하였다. Syringe를 이용한 direction injection은 4-6 주 정도 자란 *Nicotiana benthamiana*의 잎의 뒷면에 박테리아 현탁액을 주사기 바늘없이 주사기로 주입함으로써 수행되었다. TMV based vector에 삽입되어 있는 pMYD308, 309, 310 그리고 311의 각각의 박테리아 현탁액을 조건 당 3개 식물체의 3개의 잎에 agroinfiltration 되었으며, 22 °C, 18시간 명, 6시간 암상태의 온실에서 배양하여 infiltration 후 4, 6 그리고 7 되는 날에 각각의 잎을 수확하여 단백질을 분리하였다.

④ Western blot법을 이용한 고 발현 확인

- Activin A의 발현을 확인하기 위하여 시간별로 수확한 agroinfiltration 된 담배 잎으로부터 전체단백질을 추출한 후 Bradford's method를 사용하여 정량하였다 (Bradford 1976). 5 μg의 전체 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 기초하여 reducing condition에서의 12 % 의 각각의 arcrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하여 분리되었으며, 분리된 단백질들은 Coomassie brilliant blue에 의하여 염색되고 가시화

되었다. Western blot analysis를 수행하기 위하여 acrylamide gel 에서 분리된 단백질들은 Hybond-C membrane (Amersham)에 15V로 30분 동안 electro-blotting 시킨 후 TBST buffer (100mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)에 10% skim milk로 약 16시간 정도 blocking하였다. Membrane을 TBST buffer로 3번 씻은 후 biotinylated anti-human activin A antibody을 5% skim milk가 포함된 TBST buffer에 1:500으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응하였으며 이차 항체로 anti-Mouse IgG Ap conjugated을 1:7000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST buffer로 3회, TMN buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 세척한 후에 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)으로 TMN buffer에서 발색하였다.

⑤ Ni-NTA를 이용한 Activin A의 정제

- Enterokinase처리에 앞서 목적 단백질의 농도와 순도를 높이기 위하여 pMYD311을 이용해 생산된 activin A+his 단백질을 정제해보고자 하였다. 먼저 얻어진 단백질 추출물을 0.2um의 pore size를 가진 filter에 걸러주고 10mM이 되게끔 imidazole을 넣어준 후 700ul의 Ni-NTA agarose가 충전되어 있는 column에 통과시킨 후 10mM의 imidazole을 넣은 washing용액을 통과시켜 씻어준 후 250mM의 imidazole이 포함 되어있는 elution용액으로 단백질을 떨어뜨려 얻어내었다. 이러한 샘플들은 효소반응을 잠재적으로 저해 할 수 있는 imidazole의 제거를 위하여 dialysis tubing을 이용하여 desalting되었다.

⑥ Enterokinase treatment

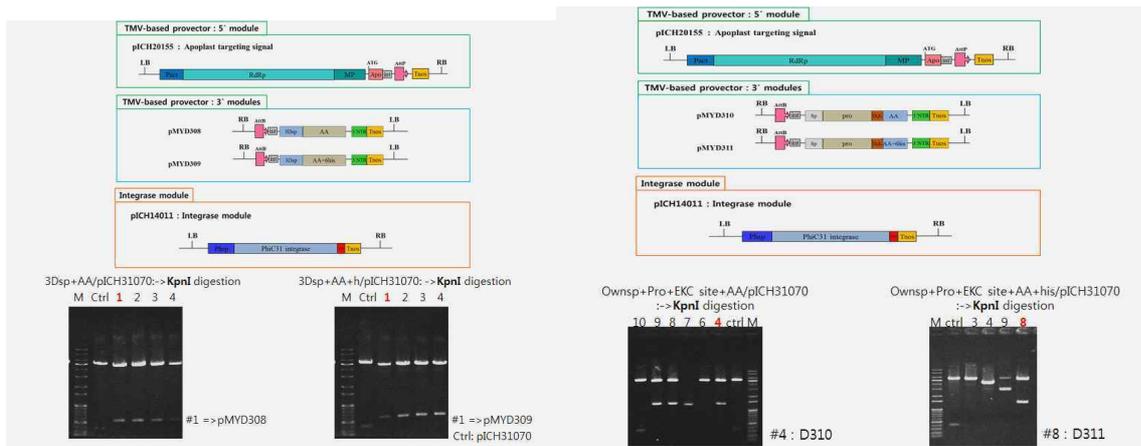
- Human ActivinA의 propeptide와 mature peptide 사이에 존재하는 Enterokinase cleavage site를 Enterokinase를 처리함으로써 mature form activin A가 형성되는 지를 알아보기 위하여 수행하였다. 50 ug의 전체 단백질을 1, 0.5, 0.25, 0.1 unit의 Enterokinase과 25°C에서 3시간 또는 16시간동안 반응 후, 단백질의 구조에 따른 효소반응의 저해를 피하기 위하여 담배 잎 추출액을 5분간 끓여 denaturation 및 Ice에 5분 이상 두었다가 동일하게 반응을 수행 후 분석해보았다. 또한, 상기의 과정을 거쳐 보다 고순도로 정제된 단백질을 이용하여 효소 반응 실험을 수행하였다. 이렇게 처리된 샘플에서 mature form human activinA를 확인하기 위하여 상기에 기술한 바와 같이 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① EK site가 도입된 activin A 유전자(4DK-activin A)의 고발현 식물벡터로 클로닝

- TMV based vector인 pMYV150에 mature form의 Antivin A와 Enterokinase cleavage site를 가진 precursor form의 Activin A 및 각각에 6개의 histidine 잔기가 N-말단에 포함되어있는 유전자를 삽입하여 pMYD308(mature Activin A), pMYD309(mature Activin

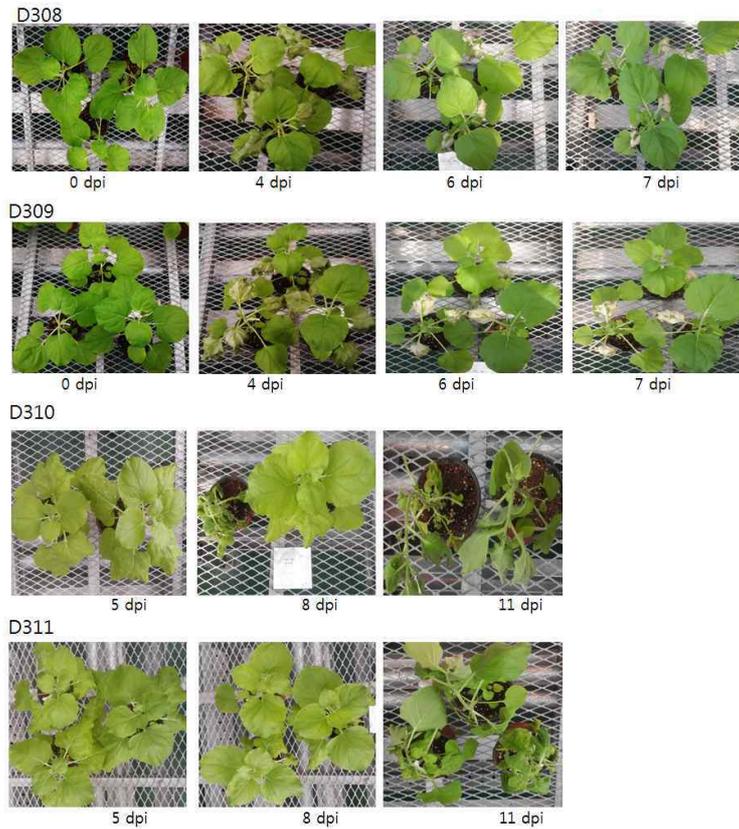
A+His), pMYD310 (Enterokinase cleavage site를 가진 precursor form의 Activin A) 그리고 pMYD311(Enterokinase cleavage site를 가진 precursor form의 Activin A+His)라고 명명하였고 infiltration을 위해 agrobacterium (strain GV3101)에 형질전환 하였다 (그림 329-2-6).



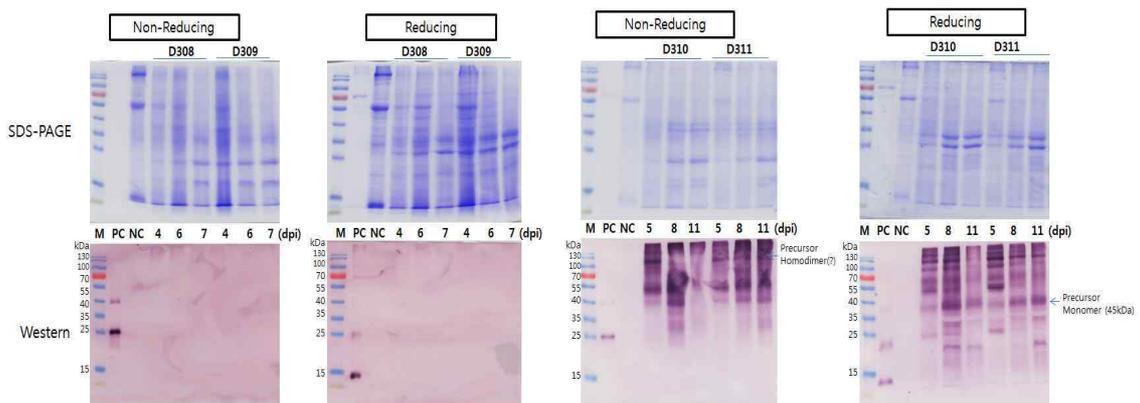
< 그림 329-2-6. Mature form activin A(좌) 및 enterokinase cleavage site를 가진 precursor activin A 유전자의 TMV based vector (pMYV150)로의 클로닝 >

② Agroinfiltration법을 이용한 형질전환 및 human activinA의 발현 확인

○ Agroinfiltration 법을 이용한 pMYD308, 309, 310 그리고 311의 발현을 알아보기 위하여 syringe를 이용하여 상기에서 기술한 바와 같은 방법을 이용하여 infiltration 하였으며 5, 8 그리고 11일째 잎을 수확하여 단백질을 추출하여 SDS-PAGE, Western blot analysis를 수행하였다. 처리구당 2반복 이상 수행하였으며 날짜별로 식물의 성장상태를 조사하였다 (그림 329-2-7). Denaturation 상태와 native 상태의 human activin A의 발현을 확인하기 위한 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다. 그 결과 pMYD308, 309에서는 target band가 확인되지 않았고, pMYD310, 311은 발현된 식물체 모두에서 reducing condition에서 monomer form으로 예상되는 45kDa정도에서 band가 확인되었다. 또한 다양한 형태의 multimeric form이 확인되었다. Non-reducing condition에서는 pro peptide가 절단되지 않은 형태의 dimeric form인 90kDa보다 큰 대략 110kDa에서 확인되었으며, PC로 사용된 insect유래의 activinA는 mature peptide의 dimeric form인 28 kDa에서 확인되었다(그림 329-2-8). 발현 수준은 대부분 infiltration 이후 8일 째 되는 날에 가장 높은 것으로 보였다. 이러한 결과를 통해서 *N. benthamina*를 이용한 transient expression에서 human activinA의 발현이 성공적으로 이루어짐을 확인하였으며 이는 infiltration 이후 8일째 된 샘플에서 가장 높음을 알 수 있었다.



< 그림 329-2-7. Agroinfiltration 후 배양 시간에 따른 식물체의 상태 변화 >

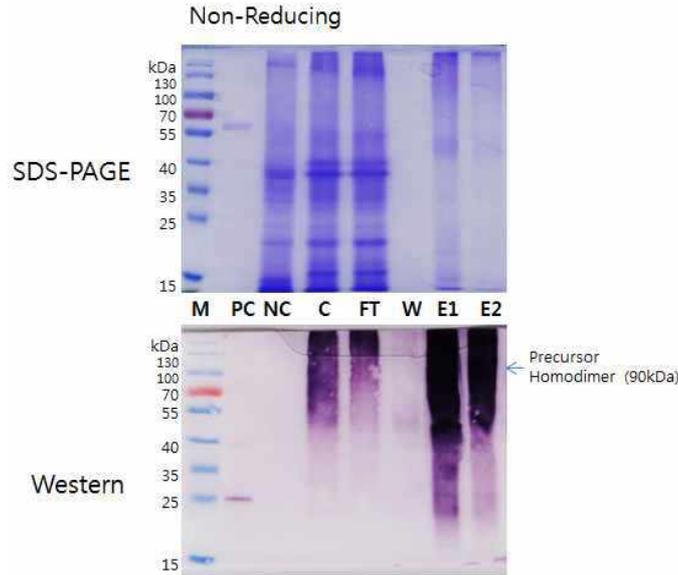


< 그림 329-2-8. Mature form activin A 및 enterokinase cleavage site를 가진 precursor activin A 의 발현 및 시간에 따른 발현 수준 확인 >

③ Ni-NTA agarose resin을 이용한 Activin A의 정제

- Enterokinase 처리에 이용할 단백질의 확보를 위하여 상기의 방법으로 infiltration 된 담배 잎을 수확 후 단백질을 추출하여 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제를 수행한 후

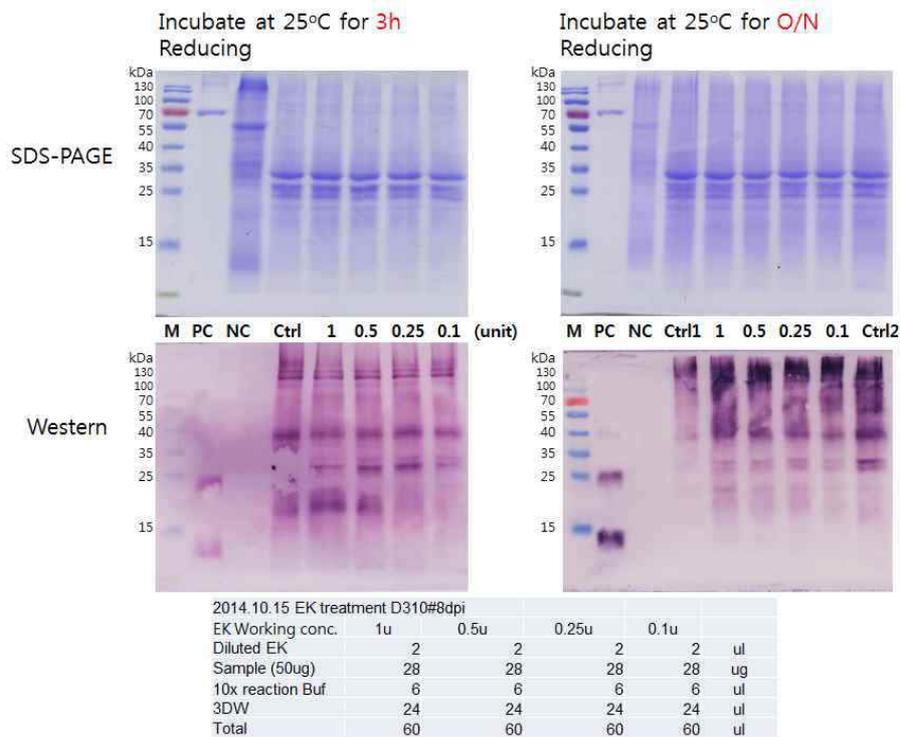
SDS-PAGE, Western blot analysis를 수행하였다 (그림 329-2-9). 그 결과 Activin A precursor form monomer의 예상 크기인 45 kDa 부근에서 band가 확인되었으며 다양한 형태의 multimeric form으로 인해 생기는 것으로 예상되는 smear band가, crude (C1, C2), flow through (FT)와 purified protein인 elute 1과 elute 2 (E1과 E2)에서 확인되었다.



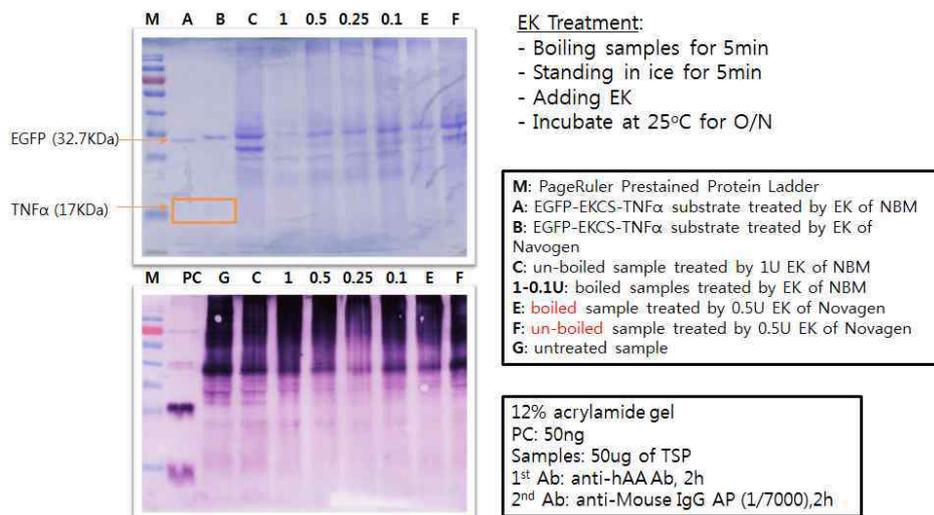
< 그림 329-2-9. Ni-NTA agarose를 이용한 activin A의 정제 >

④ Enterokinase 효소 처리로 mature form activinA의 확인

○ *Nicotiana benthamiana*에서 발현된 pro form의 human activin A가 mature form으로 전환되지 않는 것으로 확인되었으며, enterokinase 효소를 처리하여 mature form으로 전환되는 지를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다 (Papakonstantinou et al., 2009). 반응 시간을 3시간 및 16시간으로 처리하여 보았을 때 대조군과 실험군은 western blot 상에서 큰 차이를 보이지 않았으며 mature form의 activin A로 생각 되는 band를 확인할 수 없었다 (그림 329-2-10). 이러한 결과가 단백질의 구조에 의한 효소반응의 저해 때문인지 알아보기 위하여 샘플 내 단백질을 denaturation시켜 진행해보았을 때에도 큰 차이는 발견 할 수 없었다 (그림 329-2-11). Ni-NTA를 이용한 정제를 통해 얻어진 보다 높은 순도의 Activin A를 이용하여 실험해보았을 때에는 enterokinase 1또는 0.5 unit을 이용한 실험군에서 약 28 kDa 크기의 위치에서 미약한 signal이 확인되었다 (그림 329-2-12). 이는 조건을 추가적으로 조정하여 확인되어야 할 것으로 생각되지만, 현재까지 얻은 결과로서 순도가 높아진 Activin A의 propeptide에 enterokinase를 처리하여 mature form의 activin A를 얻어낼 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.



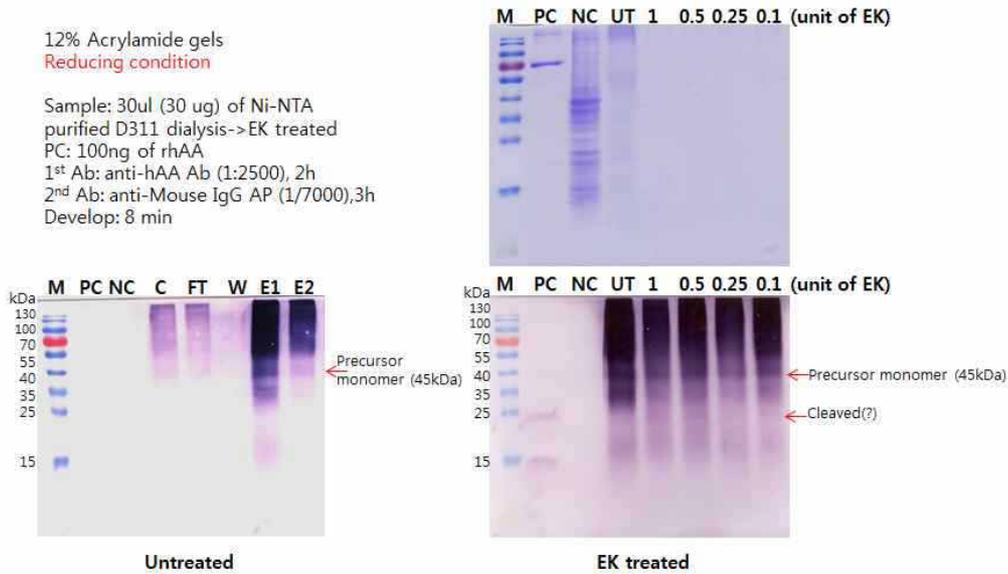
< 그림 329-2-10. Enterokinase의 농도 및 반응 시간에 따른 mature form Activin A의 형성 여부 확인 >



< 그림 329-2-11. denaturation 된 Activin A를 이용한 enterokinase를 처리했을 때의 mature form ActivinA의 형성 여부 확인 >

12% Acrylamide gels
Reducing condition

Sample: 30ul (30 ug) of Ni-NTA purified D311 dialysis->EK treated
PC: 100ng of rhAA
1st Ab: anti-hAA Ab (1:2500), 2h
2nd Ab: anti-Mouse IgG AP (1/7000), 3h
Develop: 8 min



< 그림 329-2-12. 정제된 Activin A를 이용한 enterokinase를 처리했을 때의 mature form Activin A의 형성여부 확인 >

3. 고발현 핵 형질전환 시스템을 이용한 activin A 생산 GM작물 개발

○ 연구수행기관 : 순천대학교

가. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

- (1) Activin A의 고발현 식물 발현벡터 구축
 - ① Activin A 도입을 위한 식물벡터 구축
- (2) 식물 형질전환
 - ① 토양균을 이용한 식물의 형질전환
 - ② 형질전환체의 유전자 도입 분석
- (3) Activin A 고생산 식물체의 homo line 선발
 - ① 형질전환체의 T1 세대에서 homo line 선발

나. 세부연구의 수행목적 (필요성)

○ 본 연구는 산업화 가능성이 매우 높은 activin A를 식물 viral vector를 이용한 생산기술을 개발하기 위하여 수행하였음

다. 세부연구개발 수행내용 및 연구결과

- (1) Activin A의 고발현 식물 발현벡터 구축

(가) 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

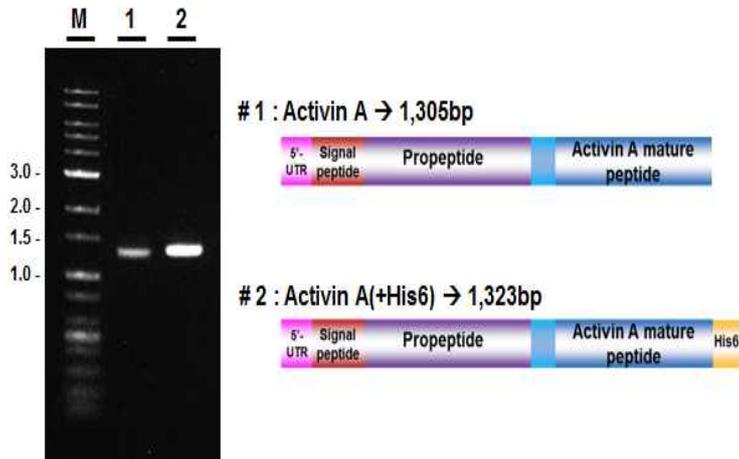
○ Enterokinase 인식부위가 있는 *Activin A* 유전자 클로닝

- 클로닝 벡터인 pUC118 vector에 재조합 *Activin A* 유전자를 blunt end ligation 방법을 이용하여 클로닝 하였다.
- Ni-NTA agarose 이용하여 His-tag 단백질을 정제하기 위해 *Activin A*의 C 말단에 His6 서열이 있는 construct(*35S::Activin A±His6*)를 식물발현용 벡터인 *pTRAkt* vector에 도입시켜 재조합 construct를 제조하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

○ *Activin A (+His 6)* 유전자의 클로닝벡터(*pUC118*)에 도입

- 1세부과제에서 분양받은 *Activin A* 유전자를 이용하여 full-length의 *Activin A*를 PCR을 통해 분리하였다 (그림 329-3-1).
- Ni-NTA를 이용한 affinity chromatography로 단백질을 정제하기 위하여 C-말단에 His6-tag 서열을 융합한 재조합 *Activin A(+His6)* 유전자를 제조하였다.
- *Activin A(+His6)* 유전자를 클로닝 벡터인 pUC118 vector에 blunt end ligation하여 형질전환된 콜로니를 선별하였다.

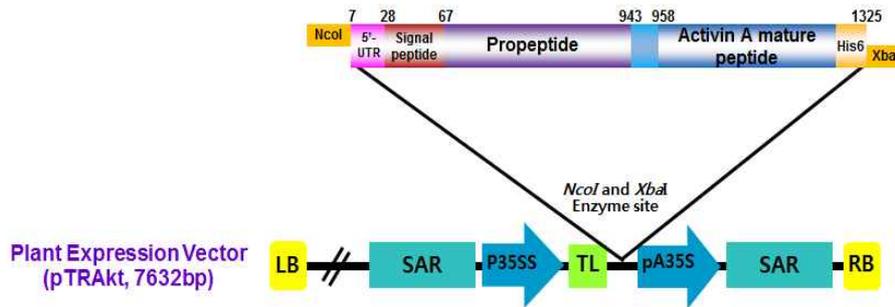


< 그림 329-3-1. *Activin A* 유전자 구조 및 PCR을 통한 *Activin A* 유전자의 분리 >

○ 식물체에서의 고발현을 위하여 식물발현용 *pTRAKt* 벡터에 도입한 construct 제조

- *35S::Activin A(+His6)*는 #8, #9, #10, #13, #14번 콜로니에서 *Activin A(+His6)* 유전자의 밴드를 확인하였음
- 최종적으로 염기서열까지 확인함으로써 식물발현용 벡터(*pTRAKt*)에 *Activin A* 유전자가 도입되었음을 확인함으로써 형질전환 담배 식물체 및 현탁 담배 배양세포 개발을 위한 construct 제조를 완료하였다(그림 329-3-2)

❖ 최종 construct → 35SS :: Human Activin A



- NcoI
- 7-27 5'-UTR (Activin A translation 효율을 높이기 위함)
- 28-66 Signal peptide (당 결핍 조건의 배지에서 목적 단백질의 분비 효율 높이기 위함)
- 67-942 Propeptide
- 943-958 D-D-D-D-K Enterokinase cleavage site
- 958-1307 Activin A mature peptide
- 1308-1325 H-H-H-H-H-H-H-H, His6 (Activin A 단백질 정제 목적)
- XbaI

< 그림 329-3-2. 식물 발현용 Activin A의 재조합 단백질의 construct 디자인 >

(2) *Activin A* 유전자의 식물 형질전환

(가) 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

○ *Activin A* 유전자의 식물발현벡터의 *Agrobacterim* 형질전환

- *Activin A* 유전자가 클로닝된 식물발현벡터를 Tri-parental mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 형질전환하여 얻은 콜로니에서 *Activin A* 유전자의 도입 유무를 확인하였다.

○ *Agrobacterium*-mediated 형질전환

- 담배 식물체의 형질전환은 야생형 담배의 잎 절편(0.5cm²)을 *Agrobacterium tumefaciens* 배양액에 1분 동안 감염시킨 후 MS shooting 유도배지 (MS salt+ 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BAP) 에 치상하여 2일 동안 암 배양하였다. 공조배양이 끝난 후 담배 잎 절편은 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 250mg/L cefotaxime이 첨가된 MS shooting 배지에 옮겨 일주일간 암 배양하였다. 그 이후 250mg/L cefotaxime과 25 mg/L kanamycin이 첨가된 MS shooting 배지로 옮겨 2주 간격으로 계대배양 하면서 형질전환된 라인을 선별하였다.
- 약 2~3달 후, 담배 잎 절편의 캘러스로부터 신초가 형성된 개체를 선별하여 호르몬이 첨가되지 않은 MS free 배지에 옮겨 뿌리를 유도하였으며 뿌리가 안정적으로 유도된 조직을 배양토에 옮겨 순화시킨 후 순화가 완성된 식물체를 온실에서 생육시켰다.

○ BY-2 세포 및 담배 식물체 형질전환

- BY-2 세포를 MS 액체 배지에서 4일 동안 현탁 배양시킨 야생형 BY-2 cell의 5ml과

인슐린 유전자가 도입된 *Agrobacterium* 배양액 (OD₆₀₀=1.5) 섞은 후 25°C에서 2일 동안 공동 배양하였다. 이후 MS 액체배지를 이용하여 *Agrobacterium*을 제거하고 100mg/L kanamycin과 300mg/L cefotaxim이 첨가된 BY-2 세포를 MS 고체 배지에 살포한 후 2~3주 동안 25°C에서 암 배양 하였다. 담배 식물체의 형질전환은 야생형 담배의 잎 절편(0.5cm²)을 *Agrobacterium* 배양에 1분동안 감염시킨 후 MS shooting 배지에 치상하여 2일 동안 암 배양하였다. 배양 후 BY-2 배양세포와 담배 잎 절편은 25mg/L kanamycin이 첨가된 배지로 옮겨 2주 간격으로 계대배양 하면서 형질전환된 라인을 선별하였다.

○ Genomic DNA 분리

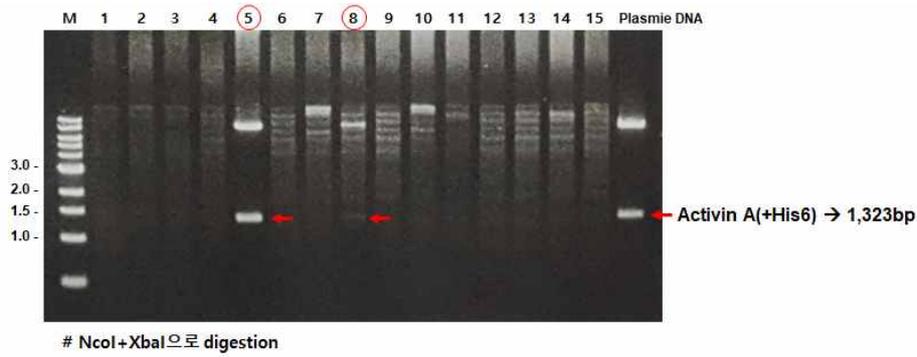
- Genomic DNA는 NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel)를 사용하여 분리하였다. 100 mg의 잎 조직을 액체질소로 곱게 갈아 400μl의 PL1 buffer와 10 μl의 RNase A를 넣어 섞은후 65°C에서 10분간 반응시켜 NucleoSpin Filter (violet ring)에 혼합액을 넣어 11,000×g 에서 2분간 원심분리한 후 상층액을 450 μl의 Buffer PC를 넣어 섞어주었다. 이 혼합액을 Nucleospin Plant II Column (green ring)에 넣어 11,000×g 에서 2분간 원심분리한 후 상층액을 PW1과 PW2 용액을 이용한 세척단계를 거쳐 마지막에 Nucleospin Plant II Column 중앙에 50μl의 Buffer PE를 넣어 10,000×g 에서 2분 원심분리하여 genomic DNA를 용출하여 분리하였다.

○ PCR 분석을 통한 *Activin A* 유전자 삽입 확인

- 상기 방법에서 분리한 genomic DNA를 이용하여 특이적 primer를 사용하여 genomic DNA PCR을 실시해 *Activin A* 유전자 (1,346bp) 가 담배 식물체에 삽입되었는지 확인하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 과정을 35 cycle로 수행한 후 72°C에서 10분간 final extension을 수행하였고, PCR product는 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동 함으로써 목적 DNA의 증폭 여부를 확인하였다.

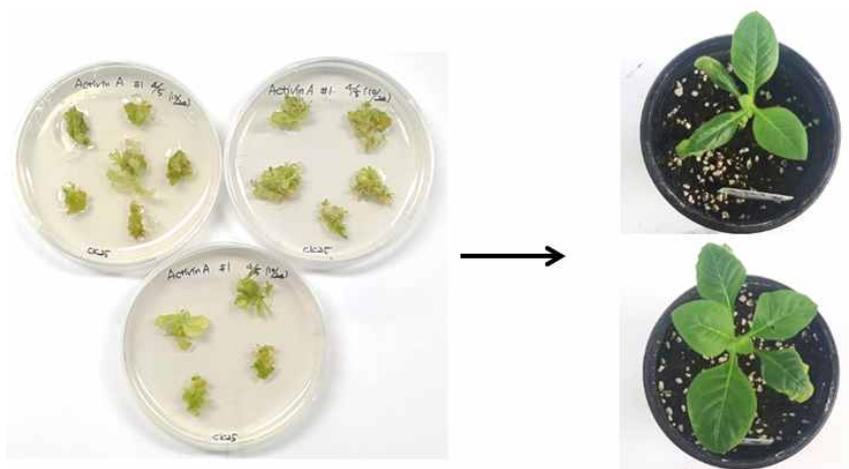
(나) 연구결과 및 고찰

- 재조합 *35S::Activin A(+His6)* construct를 *Agrobacterium tumefaciens* 매개 형질전환 방법을 이용하여 형질전환 담배식물체 제조
 - 4차년도에서 이미 확립한 *Activin A (+His6)* 유전자를 *Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환을 위해 Triparental mating 방법을 통하여 *Agrobacterium tumefaciens* (Strain GV3101)에 형질전환 하였다.
 - 항생제 선별배지에서 형질전환 균주 12개를 배양하여 plasmid DNA를 분리한 후 제한효소 *Nco I*과 *Xba I*을 처리하여 1,323bp의 *Activin A (His6)* 유전자의 삽입을 확인하였다 (그림 329-3-3).



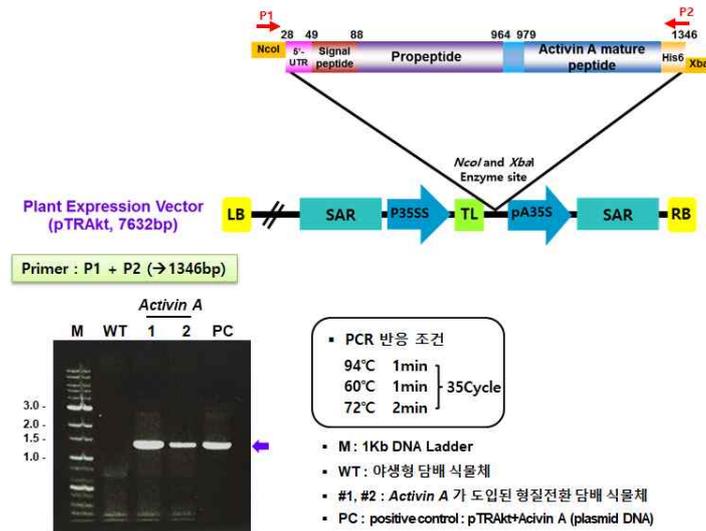
< 그림 329-3-3. Activin A (His6) 유전자의 형질전환 균주 선발 >

- *Activin A (His6)* 유전자가 도입된 *Agrobacterium* 균주 #5의 배양액을 담배 잎 절편에 감염시켜 형질전환 시켰다.
- 250mg/L cefotaxim과 25mg/L Kanamycin이 포함된 MS shooting 배지에서 지속적으로 계대배양하여 형질전환체를 선발하였다.
- 항생제 포함배지에서 신초가 형성된 개체를 3개 라인을 확보하였으며 이를 뿌리 유도배지에 옮겨 흙에서 순화시켜 형질전환체를 얻었다 (그림 329-3-4).
- 지속적으로 형질전환 실험을 반복하였으며 853개의 담배 잎 절편을 감염시켜 항생제 선별로부터 신초가 형성되어 살아남은 형질전환체는 11개로서 형질전환 효율이 1.3%이었다.
- 살아남은 형질전환체 11개체를 뿌리 유도배지에 옮겨 뿌리가 유도된 3개의 형질전환 담배 식물체 (*Activin A-1*, *Activin A-2*, *Activin A-3*)를 최종 선발하였다.



< 그림 329-3-4. 항생제 포함 배지에서 Activin A (His6) 유전자가 도입된 담배 형질전환체 식물 >

- 재조합 *Activin A* 형질전환 식물체의 genomic DNA PCR 확인
 - *Activin A* 형질전환 식물체의 잎 조직에서 genomic DNA를 분리 한 후 *Activin A* 유전자의 full-length가 증폭될 수 있는 region의 primer를 사용하여 genomic DNA PCR을 실시해 *Activin A* 유전자가 담배 식물체에 잘 삽입되었는지 agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.
 - *Activin A* 형질전환 담배 식물체에서 모두 *Activin A* 유전자의 full-length가 증폭된 1,346bp의 PCR 밴드를 확인하였다 (그림 329-3-5).



< 그림 329-3-5. *Activin A* 유전자 construct의 특이적 primer 위치와 형질전환 담배식물체에서 genomic DNA PCR확인 >

(3) *Activin A* 고생산 식물체의 homo line

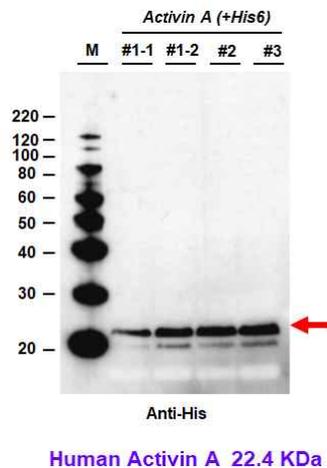
(가). 세부연구개발 수행내용 (재료 및 방법)

- 단백질 분리 및 정제
 - 재조합 *Activin A*가 도입된 *Activin A-1*, *Activin A-2*, *Activin A-3* 형질전환 담배식물체의 잎 조직에서 1g을 채취하여 전체 단백질을 추출한 후 Bradford's 방법을 사용하여 정량하였다.
 - 추출한 전체 단백질을 Ni-NTA agarose를 이용하여 His-tagged protein 정제를 수행하였는데 마지막 단계로서 250mM imidazole이 첨가된 elution buffer로 0.5ml씩 4개 tube에 받아 정제된 단백질은 정량하여 western blot 분석에 사용하였다.
- Western 분석
 - 분리된 단백질을 4~12% Bis-Tris Plus gel (novex by Life technologies)에 전기영동한 후 iBlot[®]2 gel Transfer Device (novex by Life technologies)을 이용하여 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이후 iBind[™] Westen Device (novex by Life technologies)을

사용하여 iBind™ Card에 nitrocellulose membrane을 올려놓은 다음 6×His Tag monoclonal antibody (ThermoFisher, Cat #MA1-21315)와 Secondary antibody Enzyme conjugate anti-mouse IgG:HRP (Santa cruz)를 1XiBind™ Solution (novex by Life technologies)에 각각 적당한 비율로 희석하여 실온에서 3시간 반응한 후 증류수로 세척하였다. 이후 nitrocellulose membrane을 SuperSignal West Substrate Working Solution (Thermo)에 blot을 5분 동안 반응시켰다. 시약을 제거한 후 깨끗한 랩으로 blot을 덮어 X-ray 필름에 exposure 한 후 검출된 단백질을 확인하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

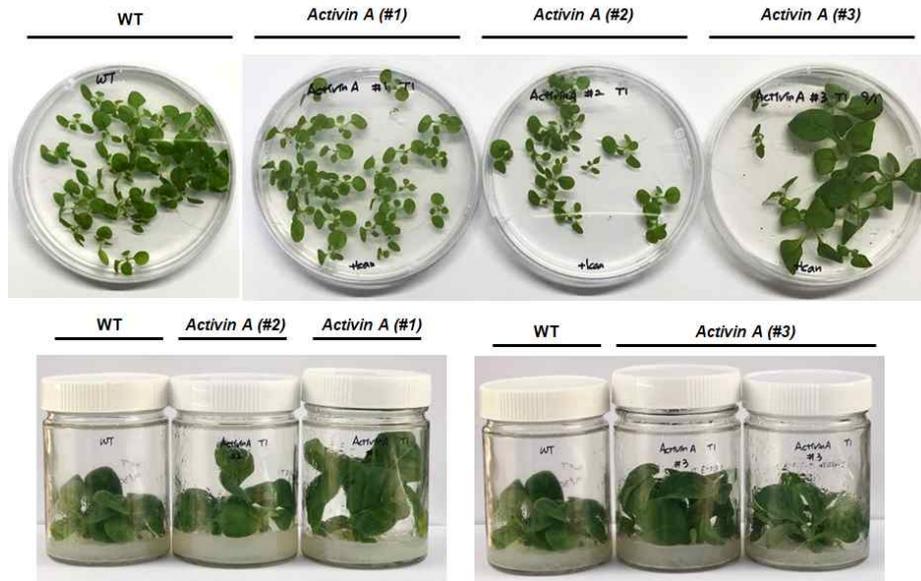
- *Activin A* 유전자가 고발현된 담배식물체에서 *Activin A* 단백질의 발현 확인
 - *Activin A* 형질전환 담배식물체 앞에서 단백질을 추출하여 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제를 수행한 후 His antibody를 사용하여 western blot 분석을 수행한 결과 22 KDa 크기의 His tag 단백질을 확인하였다 (그림 329-3-6).



< 그림 329-3-6. *Activin A* 발현 확인을 위한 western blot 분석 >

- *Activin A* 단백질은 pro form 형태인 49 KDa 이며 mature form은 22 KDa 으로, 우리의 결과 mature 형태의 *Activin A* 단백질이 발현되는 것으로 사료되었다.
- 특히 enterokinase cleavage site로서 DDDDK를 도입하였는데 enterokinase 첨가 없이도 enterokinase cleavage site에서 propeptide 가 잘려 나간 후 mature form이 형성된 것으로 판단되어 매우 효과적인 발현시스템이 확립된 것으로 판단된다.
- 안정적인 *Activin A* 고발현 elite line의 선발
 - 재조합 *Activin A*가 도입된 *Activin A-1*, *Activin A-2*, *Activin A-3* 형질전환 담배식물체의 T1 세대의 종자를 받아 50mg/L Kanamycin 항생제가 첨가된 배지에 치상하여 배양하였다.

- 3개의 라인 모두 항생제가 첨가된 선별배지에서 성공적으로 받아되는 것을 확인하였다 (그림 329-3-7)
- 따라서 Activin A 단백질이 발현되는 형질전환 식물체 homo line을 확보하였다.



< 그림 329-3-7. 항생제가 첨가된 배지에서 배양중인 Activin A T1세대 형질전환 식물체 >

3-3. 연구개발 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시(이전)		6					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록 (유전자원등록)	건수	기술료	제품화	매출액 (백만원)	수출액 (백만원)	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정채활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	12	8	3	5	4	-	-	-	-	12	4	-	5	-	2	6	-		
1차년도	목표 4		1		1						2					1			
1차년도	실적 8	6	5		3	85				1	2			1	0				
2차년도	목표 1	1		2	1					4	1		2		1	2			
2차년도	실적 3	3	1	4	1	32				6	1	7	2	4	1	6	2		
3차년도	목표 3	3	1	1	1					2			1			1			
3차년도	실적 5	4	0	0	0	11			1	0		5	3	4	2	18			
4차년도	목표 2		1	1						5			1		1	1			
4차년도	실적 2	7	4	1		8				3		4	3	1		4			
5차년도	목표 2	4		1						1	1		1			1			
5차년도	실적 1		1			8	6			5	1	5	2	3		1			
소계	목표 12	8	3	5	4	0	0		0	12	4	0	5	0	2	6	0		
소계	실적 19	17	11	5	4	144	6		1	15	4	21	10	13	3	29	2		

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		C-06-01		
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	M cell-targeting ligand and consensus dengue virus envelope protein domain III fusion protein production in transgenic rice calli.	Molecular biotechnology	김태금	54권 3호	USA	Springer	SCI	2012.12.20	DOI 10.1007/S12033-012-9637-1
2	대장균과 식물시스템에서 재조합 인간 prominiinsulin 생합성 분석	Journal of Plant Biotechnology	위수진	40권 3호	대한민국	한국식물생명공학회	비SCI	2013.09	
3	역분화줄기세포의 류마티스내과 영역에서의 응용	Journal of Rheumatic Diseases	정승민	20권 5호	대한민국	대한류마티스학회	비SCI	2013.10.16	
4	High-level production of recombinant trypsin in transgenic rice cell culture through utilization of an alternative carbon source and recycling system	Enzyme and microbial technology	김란선	63	Netherland	ELSEVIER	SCI	2014.04.28	DOI 10.1016/j.enzmictec.2014.04.010
5	N-Glycosylation modification of plant-derived virus-like particles:an application in vaccines	BioMed Research International	김현순	2014	UK	Hindawi	SCI	2014.05	doi 10.1155/2014/249519
6	Overexpression and self-assembly of virus-like particles in Nicotiana benthamiana by a single-vector DNA replicon system	Applied Microbiol Biotechnol	문기범	98	UK	Springer Link	SCI	2014.06	DOI 10.1007/s00253-014-5901-6
7	Production of functional human vascular endothelial growth factor165 in transgenic rice cell suspension cultures	Enzyme and microbial technology	Chung Nguyen-Duc	63	Netherland	ELSEVIER	SCI	2014.06.07	DOI 10.1016/j.enzmictec.2014.05.007
8	Dengue Virus E Glycoprotein Production in Transgenic Rice Callus	Mol Biotechnol	김태금	2014	Nethelands	Springer	SCI	2014.07.29	DOI 10.1007/S12033-014-9787-4

9	토마토 (<i>Solanum lycopersicum</i>) 과육의 숙성 정도에 따른 peptide:N-glycanase 발현 분석	Journal of Plant Biotechnology	위수진	41 권 3호	대한민국	한국식물 생명공학 회	비SCI	2014.09	
10	Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis.	Journal of immunology research	정승민	2014	USA	Hindawi	SCI	2014.09.10	DOI 10.1155/2014/263625
11	Production and characterization of recombinant human acid- α -glucosidase in transgenic rice cell suspension culture	Journal of Biotechnology	정재완, 김란선	56: 1069-1078	Netherlands	Elsevier	SCI	2 April 2016	doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.031
12	Synthesis and assembly of dengue virus envelope protein fused to cholera toxin B subunit into biologically active oligomers in transgenic tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Plant Biotechnol Rep	김미영	226: 44-53	Japan	Springer	SCI	28 June 2016	DOI 10.1007/s11816-016-0398-3
13	The last ten-year advances in plant-derived recombinant vaccines	Intl J Mol Sci	정영희	submitted	Switzerland	MDPI	SCI	2016.10	17:1715 (doi 10.3390/ijms101715)
14	Potential of plants to produce Recombinant Protein products	Journal of Plant Biology	박기영	59 권 6호	대한민국	Springer	SCI	2016.12	
15	Production of recombinant human acid α -glucosidase with high-mannose glycans in gnt1 rice for the treatment of Pompe disease	Journal of Biotechnology	정재완, 뉴엔슈 안휘	249	Netherlands	Elesvier Science	SCI	2017.03.29	0168-1656
16	캘러스 활용도를 향상시키기 위한 벼(<i>Oryza sativa</i> L.) 형질 전환 시스템 구축	Korean J. Breed. Sci. 49(3):170-179(2017. 9)	박지선	49	대한민국	육종학회	비SCI	2017.09	ISSN: 2287-5174
17	Overexpression and oral immunogenicity of a dengue antigen transiently expressed in <i>Nicotiana benthamiana</i>	Plant cell Tissue and Organ Culture	뉴엔슈 안휘		Netherlands	Springer	SCI	2017.09.18	0167-6857
18	Spontaneous pepsin C-catalyzed activation of human pepsinogen C in transgenic rice cell suspension culture: Production and characterization of human pepsin C	Enzyme and Microbial Technology	엠더리아줄, 김란선	108	USA	Elesvier Science	SCI	2017.09.19	0141-0229

19	Arthritic role of <i>Porphyromonas gingivalis</i> in collagen-induced arthritis mice	PLOS one	정혜린	12	USA	Public Library Science	SCI	2017.11.30	1932-6203
----	--	----------	-----	----	-----	------------------------	-----	------------	-----------

나. 국내 및 국제학술회의 발표

			코드번호		C-06-02	
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명	
1	The 4th Asia Pacific protein Association Conference	M.S. Yang	2014.05.17	ICC, Jeju	대한민국	
2	The 4th Asia Pacific protein Association Conference	M.S. Yang and N.S. Kim	2014.05.17	ICC, Jeju	대한민국	
3	2014 춘계 한국식물생명공학회	문기범	2014.05.15	경희대학교	대한민국	
4	2014 춘계 한국식물생명공학회	권태호	2014.05.15	경희대학교	대한민국	
5	2014 춘계 한국식물생명공학회	하장호	2014.05.16	경희대학교	대한민국	
6	2014 추계 한국식물생명공학회	문기범	2014.10.30	경희대학교	대한민국	
7	2014 추계 한국식물생명공학회	위수진,박기영	2014.10.31	경북대학교	대한민국	
8	AFOB regional Symposium 2015	양문식	2015.05.28	Depok, Universitas Indonesia,	Indonesia	
9	Plant-Based Vaccines, Antibodies & Biologics	Soo Jin Wi, So Yeon Seo and Ky Young Park	2015.06.08	University of Lausanne CHUV	스위스	
10	한국식물생명공학연구회	문기범	2015.06.18	공주	대한민국	
11	2015 한국식물생명공학회	박지선	2015.06.18	공주	대한민국	
12	APCLSE(Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering),	장선희 외	2015.11.18-20	치앙마이	태국	
13	ILSBE(International Conference on Life Science and Biological Engineering	장선희 외	2015.12.2-4	동경	일본	
14	AFOB regional Symposium 2016	양문식	2016.1.28-30	Hue, Vietnam	Vietnam	
15	한국생물공학회	권태호	2016.4.20-22	경주	대한민국	
16	한국육종학회	박지선	2016.6.29	청주	대한민국	
17	Plant-Based Vaccines, Antibodies & Biologics	도반기압, 김란선, 양문식	2017. 06.05-07	Albufeira	포르투갈	
18	Plant-Based Vaccines, Antibodies & Biologics	도반기압, 김란선, 양문식	2017. 06.05-07	Albufeira	포르투갈	
19	2017 한국식물생명공학회	문기범	2017.06.08	대전인터시티호텔	대한민국	
20	The International Conference of Woman Scientists and Engineers (BIEN207)	박지선	2017.08.31	서울 더 플라자 호텔	대한민국	
21	2017 The 1 st Asian Conference for Plant-made Pharmaceuticals(PMP Asia 2017), September 22~23, Pohang, Korea	문기범	2017.09.23	포항공대	대한민국	

다. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	코드번호		발생년도
		등록/기탁번호	등록/기탁기관	
1	<i>Oryza sativa</i> L. (cv.Dongjin)/pJKF39	KCTC12361BP	KCTC	2013
2	<i>Oryza sativa</i> L. (cv.Dongjin)/pJKF45	KCTC12362BP	KCTC	2013
3	<i>Oryza sativa</i> L. (cv.Dongjin)/pJKF382	KCTC12363BP	KCTC	2013
4	<i>Nicotiana tobacum</i> L. (cv.Havana)/pJKF48	KCTC12488BP	KCTC	2013
5	<i>Nicotiana tobacum</i> L. (cv.Havana)/pJKF49	KCTC12489BP	KCTC	2013
6	PNGase (peptide N-glycanase) from tomato	KM401550	NCBI GenBank	2014
7	Peptide N-Glycosidase A #1-10	KCTC PC-4342	KCTC	2016
8	Peptide N-Glycosidase A #6-4	KCTC PC-4341	KCTC	2016
9	Activin A #71	KCTC PC-4343	KCTC	2016
10	Activin A#101	KCTC-PC-4344	KCTC	2016
11	(Δ GnTI+pMYD85)-01 cell line of <i>Oryza sativa</i> L	KCTC18586P	KCTC	2017

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	이노카인(INNOkine)-제01류	대한민국	(주)엔비엠	2013.01.07	40-2013-0000961	(주)엔비엠	2013.11.25	40-1009072	
2	이노카인(INNOkine)-제05류	대한민국	(주)엔비엠	2013.01.07	40-2013-0000962	(주)엔비엠	2013.11.25	40-1009073	
3	이노자임(INNOzyme)-제01류	대한민국	(주)엔비엠	2013.01.07	40-2013-0000963	(주)엔비엠	2013.11.25	40-1009074	
4	이노자임(INNOzyme)-제05류	대한민국	(주)엔비엠	2013.01.07	40-2013-0000964	(주)엔비엠	2013.11.25	40-1009075	
5	이노맵(INNOmAb)-제01류	대한민국	(주)엔비엠	2013.01.07	40-2013-0000965	(주)엔비엠	2013.11.25	40-1009076	
6	이노맵(INNOmAb)-제05류	대한민국	(주)엔비엠	2013.01.07	40-2013-0000966	(주)엔비엠	2013.11.25	40-1009077	
7	구강세균으로부터 유도된 류마티스 관절염 동물모델 및 그의 제조방법	대한민국	가톨릭대학교 산학협력단	2013.09.06	10-2013-0107489	가톨릭대학교 산학협력단	2015.09.03	10-1551927	

8	식물에서 TEV 프로테아제를 대량생산하는 방법 및 상기방법에 의해 제조된 TEV 프로테아제	대한민국	전주 생물소재연구소, (주)엔비엠	2013.09.17	10-2013-0112138	전주 생물소재연구소, (주)엔비엠	2015.07.09	10-1536963	
9	형질전환 벼 세포 현탁 배양에서 기능적 인간 현관 내피세포 성장인자의 생산방법	대한민국	(주)엔비엠 외 1명	2014.08.27	10-2014-0112155				
10	형질전환 벼 세포 배양에서 대체 탄소원의 활용 및 세포 재이용 시스템을 통한 재조합 트립신의 대량 생산 방법	대한민국	전북대 산학협력단	2014.08.26	10-2014-011560	전북대학교 산학협력단	2016.06.01	10-1628232	
11	프로미니인슐린 재조합 단백질이 발현된 형질전환 식물 및 이의 제조방법	대한민국	순천대학교 산학협력단	2014.09.19	10-2014-0124874	순천대학교 산학협력단	2016.05.24	10-1625746	100
12	PROVIDENCE (제03류)	대한민국	(주)엔비엠	2014.12.12	40-2014-0084959	(주)엔비엠	2015.12.07	40-1147323	100
13	PROVIDENCE (제35류)	대한민국	(주)엔비엠	2014.12.12	41-2014-0051914	(주)엔비엠	2015.12.07	41-0340673	100
14	PROVIDENCE (제42류)	대한민국	(주)엔비엠	2014.12.12	41-2014-0051915				
15	PROVIDENCE (제01류)	대한민국	(주)엔비엠	2015.06.01	40-2015-0040173	(주)엔비엠	2016.02.05	40-1159455	100
16	식물세포 대량 배양용 반응기	대한민국				(주)엔비엠	2015.06.04	10-1527958	
17	NEWHEN (제03류)	대한민국				(주)엔비엠	2015.05.04	40-1103597	
18	토마토 peptide:N-glycanase 유전자가 발현된 형질전환 식물 및 이의 제조방법	대한민국	박기영	2015.09.19	10-2015-0132732				
19	RHEUMATOID ARTHRITIS DIAGNOSIS KIT	미국				가톨릭대학교 산학협력단	2016.05.24	WO/2013/105721	
20	PNGase A를 생산하는 형질전환 벼 캘러스 및 이의 용도	대한민국	한국생명공학연구원, (주)엔비엠	2016.06.23	10-2016-0078792	한국생명공학연구원, (주)엔비엠	2016.10.10	10-1666680	
21	액티빈A 유전자로 형질전환된 식물체 및 이를 이용하여 액티빈 A 단백질을 생산하는 방법	대한민국	순천대학교 산학협력단	2016.09.20	10-2016-0119795				100

22	폼페병 치료를 위한 고 만노스 당사슬을 가지는 재조합 인간 산성 알파 글루코시다제의 대량생산용 형질전환 벼 캘러스의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 인간 산성 알파 글루코시다제 대량 생산용 형질전환 벼 캘러스	대한민국	양문식, 김란선, 정재완	2017. 08. 24	10-2017-0107101				
----	---	------	---------------	--------------	-----------------	--	--	--	--

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

					코드번호	C-06-05		
No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율	

바. 전문연구 인력양성

					코드번호	C-06-06								
No	분류	기준년도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	인력양성	2013		1	2		1	2					3	
2	인력양성	2014		2	2		1	3					4	
3	인력양성	2015		1	3		1	3			2		2	
4	인력양성	2016		1				1					1	
5	인력양성	2017	3		1		4			1			3	

사. 산업기술 인력양성

					코드번호	C-06-07	
No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원	
1	순천시 특강	고령화된 순천시 농업의 활로 모색		1	2014. 9. 16 30분		
2	전남 여성리더스 포럼	과학기술 혁명의 내용으로서 분자 농업 등 생명과학 혁명이 진행 중임	(사)한국여성과학기술단체총연합회	1	2014. 9. 20 1시간		
3	LED식물공장 심화교육	LED식물공장 심화교육	LED-농생명 융합기술연구센터	1	2015.1.12.~16 37시간	10명	
4	단백질 분리, 정제 실용화 방안	산업적 목적으로 동물세포에서 생산된 단백질의 분리 정제 과정	순천대학교 생물소재발굴 활용사업단	1	2015. 2. 10 3시간		

5	인턴 현장실습	대학 졸업생 예정자의 현장실습	(주)엔비엠	1	2015.9.1-12.18	1명
6	LED식물공 장 심화교육	LED식물공장 심화교육	LED-농생명 융합기술연구 센터	1	2015.12.17.-18 12시간	17명
7	LED식물공 장 재배기술 교육	LED식물공장 재배기술 교육	LED-농생명 융합기술연구 센터	1	2016.1.7 6시간	15명
8	LED식물공 장 운용기술 교육	LED식물공장 운용기술 교육	LED-농생명 융합기술연구 센터	1	2016.7.6 6시간	4명
9	밀폐형 식물공장 운용기술 교육	밀폐형 식물공장 운용기술 교육	LED-농생명 융합기술연구 센터	1	2017.2.14 6시간	10명
10	밀폐형 식물공장 운용기술 교육	밀폐형 식물공장 운용기술 교육	LED-농생명 융합기술연구 센터	1	2017.10.25.-27 18시간	5명

아. 기술거래(이전) 등

				코드번호		C-06-08	
No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황	
1	자체사업화	벼 세포유래 TEV endopeptidase	(주)엔비엠	2014.01.03	자체사업화		
2	자체사업화	벼 세포유래 Enterokinase	(주)엔비엠	2014.01.03	자체사업화		
3	자체사업화	벼 세포유래 hGM-CSF	(주)엔비엠	2014.01.03	자체사업화		
4	자체사업화	벼 세포유래 hG-CSF	(주)엔비엠	2014.09.01	자체사업화		
5	기술용역계약	Acid alpha-glucosidase(GAA) 생산 벼세포의 대량배양 및 GAA의 고순도 분리정제 기술 확립	(주)휴온스	2016.06.17	60,000,000원	60,000,000원	

자. 사업화 투자실적

				코드번호		C-06-09	
No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격		
					1) 내부자금 2) 신용대출 3) 담보대출 4) 투자유치 5) 기타		

차. 사업화 현황

(단위 : 천원, 년)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	코드번호		C-06-10	
							매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자기실시	신공정개발	국내	TEV endopeptidase	정제된 TEV endopeptidase 판매	(주)엔비엠	62,535		2013~2017	
2	자기실시	신공정개발	국내	Enterokinase	정제된 Enterokinase 판매	(주)엔비엠	63,817		2013~2017	
3	자기실시	신공정개발	국내	hGM-CSF	정제된 hGM-CSF 판매	(주)엔비엠	9,620	6,127	2013~2017	
4	자기실시	신제품개발	국내	hG-CSF	정제된 hG-CSF 판매	(주)엔비엠	9,295		2013~2017	

카. 표준화

No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	코드번호		C-06-11	
					관련번호	제출(채택)일	국가	
								yyyy.mm.dd

타. 기술요약정보

연도	기술명	요약내용	코드번호	
			C-06-12	등록번호
			기술완성도	

파. 보고서 원문

연도	보고서 구분	코드번호	
		C-06-13	등록번호
		발간일	

하. 기타

(1) 기술인증

No	기술인증명	기술명칭	인증번호	코드번호	
				인증기관	인증일자
1	녹색기술	식물세포 발현기술을 이용한 산업용 효소 대량 생산 기술	GT-15-00198	농림축산식품부	2015.10.14

(2) 정책 활용

				코드번호
No	정책 활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도
1	정책 건의	농림수산식품기술기획평가원	분자 농업 활성화 방안	2014
2	정책 기획 참여	전남 백신산업 (산업부)	자문위원 간담회	2015
3	정책 기획 참여	대구경북과학기술원	대한민국 농업혁신 포럼	2015

(3) 홍보/전시

				코드번호
No	유형	매체명/행사명	홍보내용	활용년도
1	신문	AVING news	연구결과를 주요내용으로 보도	2014
2	무역저널	WORLD TRADE ZONE	연구결과를 주요내용으로 보도	2014
3	무역 전문 인터넷 홍보 매체	Gobiz KOREA	연구결과물인 hG-CSF를 주요내용으로 보도	2014
4	무역 전문 인터넷 홍보 매체	EC21 Global B2B Marketplace	연구결과물인 hG-CSF를 주요내용으로 보도	2014
5	전시회	KOREA PHARM 2014	연구결과, 기술 및 회사홍보	2014
6	전시회	in-cosmetics ASIA 2014	태국 방콕에서 열린 전시회에서 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2014
7	단행본 홍보	월드 트레이드존 (WORLD TRADE ZONE)	해외홍보지를 활용한 해외마케팅	2014
8	신문	새전북신문	전북창조경제센터-식품 4개 창업기업 협약	2015
9	신문	헤럴드경제	전북혁신센터, 4개 창업기업과 MOU체결	2015
10	신문	아주경제	전북창조센터, 4개 창업기업과 MOU 체결	2015
11	신문	아시아뉴스통신	전북창조경제센터, 식품 4개 창업기업과 MOU	2015
12	신문	일요신문	전북혁신센터장, 4개 창업기업들과 협약 체결	2015
13	신문	의학신문	전북혁신센터, 4개 식의약품사와 MOU	2015
14	수출상담회	2015 해외바이어 초청 수출상담회	63컨벤션 그랜드볼룸에서 열린 수출상담회에서 연구결과물인 재조합단백질을 해외바이어들에게 소개	2015
15	전시회	in-cosmetics EUROPE 2015	스페인 바르셀로나에서 열린 전시회에서 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2015
16	전시회	COSMOPROF ASIA 2015	홍콩에서 열린 전시회에서 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2015
17	기관 홈페이지 홍보	Gobiz KOREA	중소기업진흥공단 Gobiz KOREA를 활용한 국내외 마케팅	2015
18	기관 홈페이지 홍보	EC21	EC21 Global B2B Marketplace를 활용한 국내외 마케팅	2015

19	전시회 홈페이지 홍보	in-cosmetics ASIA	세계 최대 화장품 원료 전시회 in-cosmetics ASIA 홈페이지를 통한 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2015
20	전시회 홈페이지 홍보	in-cosmetics EUROPE	세계 최대 화장품 원료 전시회 in-cosmetics EUROPE 홈페이지를 통해 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2015
21	동영상 제작	(주)엔비엠 외국어 홍보 동영상	재조합단백질 및 회사소개 관련 외국어 홍보 동영상 제작 및 이를 활용한 홍보	2015
22	단행본 홍보	월드 트레이드존 (WORLD TRADE ZONE)	해외홍보지를 활용한 해외마케팅	2015
23	단행본 홍보	월드 트레이드존 (WORLD TRADE ZONE)	해외홍보지를 활용한 해외마케팅	2015
24	전시회	Cosmoprof Asia 2015	홍콩에서 열린 세계 최대 화장품 전시회 Cosmoprof Asia 2015에서 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2015
25	전시회	in-cosmetics Europe 2016	파리에서 열린 세계 최대 화장품 원료 전시회 in-cosmetics EUROPE 전시회를 참가하여 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2016
26	전시회	2016 서울 국제 화장품·미용 산업 박람회	서울 코엑스에서 열린 전시회를 참가하여 연구결과물 원료 홍보	2016
27	수출상담회	2016 전북-동남아 해외바이어 초청상담회	전북생물산업진흥원 비즈니스센터에서 열린 수출상담회에서 연구결과물인 재조합단백질을 해외바이어들에게 소개	2016
28	전시회	Cosmoprof Asia 2016	홍콩에서 열린 세계 최대 화장품 전시회 Cosmoprof Asia 2016에서 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2016
29	전시회	Cosmoprof Asia 2017	홍콩에서 열린 세계 최대 화장품 전시회 Cosmoprof Asia 2017에서 연구결과물인 재조합단백질 홍보	2017

(4) 포상 및 수상 실적

No	포상명	포상 내용	코드번호		
			포상 대상	포상일자	포상기관
1	국가연구개발기술 100선	식물세포유래 유용단백질 생산기술	양문식 (제 2협동과제 책임자)	2013.08.28	미래창조과학부 장관
2	생물공학연구자상	생물공학 분야 학술발전 및 산업발전에 기여한 공로	권태호 (제 1세부과제 책임자)	2013.10.17	한국생물공학회

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

4-1. 목표달성도

1. 최종 연구개발 목표의 달성도

(가) 최종연구개발 목표

- 본 과제는 지금까지 국내에 확보되어 있는 유용단백질 고생산 GM작물을 선정하여 실험실 수준에서의 생산성 검증이 아닌 **산업화 규모**로 대량 재배, 수확, 분리정제, 생화학적 특성 규명, QC 및 유통을 위한 포장과 저장성 확인에 이르는 전 생산 과정에 적용 할 최적의 SOP를 확립하여 분자농업의 산업기반 모델 구축 및 실증을 통하여 당초 목표로 하였던 국내의 분자농업 산업화를 달성하였음.
- 최종목표의 주요 달성내용은 다음과 같음
 - 분자농업 실증과 산업화에 필요한 대용량 식물세포 배양시설 및 배양기의 구축, 대용량 단백질 분리정제 시설을 구축하였음
 - 본 연구에서 유용단백질 생산 세포주가 구축되기 전에 본 연구 주관기관인 (주)엔비엠이 기 개발하여 확보한 Enterokinase, hGM-CSF의 생산 세포주를 이용하여 시제품을 생산하고, 이에 대한 효능을 확인한 후 제품을 출시하여 산업화를 완성하였음
 - 본 연구개발을 통하여 FimA 항체, human Insulin, hG-CSF, TEV endopeptidase, CCP mAb, PNGase A, human Activin A 등 7종의 유용단백질 생산 식물세포주를 개발하였음
 - 상기의 신규 단백질 중에서 FimA 항체는 전임상을 위한 유효성 평가방법을 확립하였음
 - 상기의 신규 단백질 중에서 hG-CSF, TEV endopeptidase는 고순도의 시제품을 생산하고 이에 대한 효능을 확인한 후 제품을 출시하여 산업화를 완성하였음

○ 주요 목표달성 사례



< 산업화 규모 생산설비 구축 >



< 대용량 분리정제 설비 구축 >



< 식물유래 유용단백질 산업화 >

2. 참여기관별 연구개발 목표의 달성도

(가) (주)엔비엠

세부과제명	구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 결과	가중치
제 1 세부과제 (주)엔비엠 식물유래 유용단백질 분리 및 정제 공정 확립을 통한 산업기반 구축	1차 년도 (2012)	- 산업화가 가능한 규모(100 mg/batch)의 분리정제 공정 확립	100%	- 산업화 수준의 단백질 다량 추출을 위한 식물 조직별 적정 파쇄방법 확립 - 산업화 수준(100 mg/batch)의 단백질 분리정제가 가능한 분리정제 시설 및 장비 구축 완료	20
		- 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립	100%	- 식물유래 단백질의 농축에 관한 SOP 확립 - 식물세포유래 hGM-CSF의 고순도 분리정제를 위한 SOP 확립 - 식물유래 단백질 추출, 분리정제 프로세스 확립 - 상기 확립한 기술을 이용하여 대용량(배양액 100L, 식물체 1kg 이상) 처리기술 확립 진행 중 이며, 1차년도 종료시점까지 달성이 예상됨	20
		- 식물유래 단백질의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발	100%	- 식물유래 단백질의 효능확인 ·식물유래 bovine trypsin 효능확인 ·식물유래 Human enterokinase light chain의 효소활성 확인 ·식물유래 TEV endopeptidase 효소활성 확인 - 식물유래 단백질의 최적 보관방법 확립 ·식물유래 Human enterokinase light chain의 보관방법 확립 ·식물유래 TEV endopeptidase의 보관방법 확립 ·식물유래 FimA 항체에 대한 보관방법 확립 - 식물유래 단백질의 적정 포장방법 확립 ·식물유래 hGM-CSF의 적정 포장방법 확립(formulation 방법 등) ·식물유래 FimA 항체에 대한 적정 포장방법 확립 ·식물유래 Human enterokinase light chain의 적정 포장방법 확립 ·식물유래 TEV endopeptidase의 적정 포장방법 확립	20
		- hG-CSF 유전자 최적화 및 합성	100%	- hG-CSF 유전자의 염기서열을 식물에 최적화된 코돈으로 설계완료 - 최적화된 염기서열을 바탕으로 유전자를 합성 완료하여 각 협동기관에 제공완료	5

		- mini proinsulin 유전자 최적화 및 합성	100%	- mini proinsulin 유전자의 염기서열을 식물에 최적된 코돈으로 설계완료 - 최적화된 염기서열을 바탕으로 유전자를 합성 완료하여 각 협동기관에 제공완료	5
		- 산업화 규모의 대용량 식물세포배양기 구축완료	100%	- 본 과제 수행을 위하여 주관기관의 별도 예산을 투입하여 250L/reactor 20기 제작완료(특허출원)	20
		합계			100
	2차 년도 (2013)	- 산업화가 가능한 규모(100 mg/batch)의 분리정제 공정 확립	100%	- 산업화 수준의 단백질 다량 추출을 위한 식물 조직별 적정 파쇄방법(1차년도에 초과달성하여 완료한 관계로 단백질 분해효소 억제인자 발현 세포주와의 공동배양을 통한 생산수율 증진 기술을 개발하였음(단백질 분해 억제 기술 적용) - 크린룸에 산업화 수준(100 mg/batch)의 단백질 분리정제가 가능한 분리정제 시설 및 장비 구축	30
		- 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립(SOP 1종 이상 확립)	100%	- 세부과제에서 제공받은 GM 작물에 대한 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립 - 산업화 규모(1g/batch)의 식물유래 단백질의 농축에 관한 SOP 1종 확립 - FimA 항체의 고순도 분리정제를 위한 SOP 1종 확립	30
		- 식물유래 단백질의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발(1종 이상)	100%	- 2종의 최적보관방법 확립 · Rice 유래 recombinant human enterokinase의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발(1종) · Tobacco etch virus endopeptidase의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발(1종) - FimA antibody의 적정 포장방법 확립	20
		- Almond 유래 PNGase A 유전자 합성	100%	- 식물에 최적된 코돈으로 설계하고 이를 합성하여 각 협동기관에 제공(2차년도 시작 후 3개월 이내)	20
		합계			100
	3차 년도 (2014)	- hG-CSF의 산업화가 가능한 규모 (100 mg/batch)의 단백질 분리정제 공정 확립	100%	- 2차년도에 구축한 단백질 분리정제 시설 및 장비를 활용하여 hG-CSF에 대한 산업화가 가능한 규모 (100 mg/batch)의 단백질 분리정제 공정 확립	30
		- 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립 (SOP 1종 이상)	100%	- 본 과제의 1, 2 차년도 연구수행을 통하여 확보한 hEK(human Enterokinase)에 대한 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스(SOP)를 확립하였음 (1종)	30
		- 식물유래 단백질의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발	100%	- 본 과제의 1, 2 차년도 연구수행을 통하여 확보한 FimA에 대한 최적 보관방법, 적정 포장방법을 확립하였음	20

		- Activin A 유전자 합성	100%	- 식물에 최적된 코돈으로 설계하고 이를 합성하여 각 협동기관에 제공하였음	20
		합계			100
	4차 년도 (2015)	- 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립	100%	- Activin A 대한 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립	30
		- 식물유래 단백질의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발	100%	- 본 연구에서 생산한 정제된 식물유래 Activin A 단백질의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발(1종 이상) - Fim A 항체의 장기간 보관에 따른 활성변화 확인	30
		- 식물유래 단백질 산업화 완성	100%	- 식물유래 EK, hG-CSF 단백질의 산업화 완성(연구용 시약으로 일반판매 개시)	40
		합계			100
	5차 년도 (2016)	- 단백질의 추출, 분리, 정제 프로세스 확립	100%	- Activin A 대한 단백질의 고순도 분리정제 프로세스 확립	30
		- 식물유래 단백질의 최적 보관방법, 적정 포장방법 개발	100%	- EK의 장기간 보관에 따른 활성변화 확인	30
		- 식물유래 단백질 산업화 완성	100%	- 식물유래 Activin A, TEV endopeptidase의 산업화 완성(연구용 시약으로 일반판매 개시)	40
		합계			100

(나) LED농생명융합기술연구센터

세부과제명	구분 (년도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 결과	가중치
제 1협동과제 (LED농생명 융합기술 연구센터)	1차 년도 (2013)	- 유용단백질 고생산 GM작물 재배법 확립(발아재료선정,	100%	- LED 광조성과 배지 재료에 따른 담배의 발아율 비교 및 선정 - 담배의 광, 양액 조건에 따른 생육 비교 및 최적조건 확립	20
	2차 년도 (2014)	- 유용단백질 고생산 GM작물 재배법 확립, 대량재배 - LMO 연구시설 등록		100%	
	3차 년도 (2015)	- 유용단백질 고생산 GM작물 광, 양액 조건 확립 - GM작물 재배용 LED 조명개발	100%	- 유용 단백질 고생산 생육시기, 재배 방법의 확립 - GM작물의 광, 양액 조건 분석 - GM작물 재배용 LED개발	20
	4차 년도 (2016)	- 컨테이너 형 식물공장 형질전환대상 작물 실증재배기술개발 - GM작물 재배법 확립을 위한 데이터 베이스 구축	100%	- 형질전환 하지 않은 담배(<i>Nicotiana benthamiana</i>)를 (주)엔비엠에서 분양 받아 식물공장과 유사한 조건에서 생육진행 - 환경 모니터링 시스템을 활용한 작물 생육 데이터 수집	20

5차 년도 (2017)	- 협동기관의뢰 GM작물 재배조건 확립 - LED식물공장 생산기술 교육	100%	- 광조건별 LMO작물(<i>Nicotiana tabacum</i>) (P-10,P-11) 광조건별 시험 재배 - 시험재배 작물 제공(순천대학교) - 식물공장 GM작물 생산 기술교육 실시	20
	합계			100

(다) 전북대학교

세부과제명	구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 결과	가중치
제 2 협동과제 (전북대) 고발현 viral vector 시스템을 이용한 고부가가치 단백질 생산 GM작물 개발	1차 년도 (2012)	- 벼 현탁배양 유래 anti-FimA 항체 대량 생산 및 정제	100%	- Anti-FimA 생산 GM벼의 최적 생산조건을 확립하였으며, 대략 15 mg/L의 생산량을 확인 - Protein G affinity column을 이용한 정제기법 확립함	20
		- PG-CIA동물모델 확립	100%	- <i>P.gingivalis</i> 확보하여 투여형태 결정 (extract vs live bacteria, mouth vs intraperitoneal 등) - PG의 투여 횟수 및 방법에 따른 관절염 점수 관찰하여 최적의 PG-CIA 모델 정립	30
		- Anti-CCP 항체 제작	100%	- 성공적으로 Anti-CCP 항체를 클로닝함	10
	2차 년도 (2013)	- Anti-FimA 항체 고발현 담배 시스템 구축	100%	- FimA 항체의 transient expression vector에 클로닝 - Agroinfiltration 법을 이용하여 성공적으로 형질전환한 후 Western blot법을 이용한 고발현 확인함	20
		- hG-CSF의 고발현 및 생산시스템 구축	100%	- hG-CSF의 활성 확인 - Native hG-CSF와 synthetic hG-CSF의 고발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축 - 효과적인 agroinfiltration 법 구축	10
		- Mini proinsulin 유전자의 발현벡터 제작 및 transient expression	100%	- 주관기관인 NBM으로부터 받은 두 종류의 Mini proinsulin을 TMV based vector에 클로닝 - Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환 수행	10
		합계			100
2차 년도 (2013)	- Anti-FimA 항체의 고발현, 생산시스템 구축	100%	- FimA 항체의 고발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축 - 효과적인 agroinfiltration 법 구축	10	
	- PG-CIA에서 anti-FimA 항체의 효과 조사	100%	- PG-CIA모델에 anti-FimA 항체 투여방법 결정 (oral, intraperitoneal, intravenous 등) - anti-FimA항체의 농도별 관절염 억제효과 관찰 - PG-CIA모델에서 anti-FimA 항체를 처리했을 때 면역학적인 변화 및 염증정도의 변화 조사	30	

		- Anti-CCP 항체 발현	100%	- anti-CCP 항체클론을 CHO세포에 transfection	20
		- Anti-CCP 항체 고발현 식물벡터 구축	100%	- CCP 항체의 고발현 식물벡터로 클로닝 - Agroinfiltration법을 이용한 형질전환 - Western blot법을 이용한 고발현 확인	10
		- PNGase A의 고발현 식물 발현벡터 구축	100%	- PNGase A의 고발현 식물벡터로 클로닝 - Agroinfiltration법을 이용한 형질전환 - Western blot법을 이용한 고발현 확인	10
		- Mini proinsulin 유전자의 발현벡터 제작 및 transient expression	100%	- 주관기관인 NBM으로부터 받은 두 종류의 Mini proinsulin을 TMV based vector에 클로닝 - Agroinfiltration 법을 이용한 형질전환 수행 - Western 법을 이용한 고 발현 확인	10
		- Human activin A의 고 발현 식물 발현 벡터 구축	100%	- Human activin A의 고발현 식물벡터로 클로닝 - Agroinfiltration법을 이용한 형질전환 - Western blot법을 이용한 고 발현 확인	10
		합계			100
	3차 년도 (2014)	- Anti-FimA 항체의 대량생산법 구축	100%	- 효과적인 transient expression 시스템을 통한 FimA 항체의 대량생산을 수행하였으며, fresh leaf biomass당 200-300 mg/kg 생산함을 확인	10
		- Anti-FimA 항체의 환자세포에서 in vitro 효과를 조사	100%	- RA환자의 치주병변에서 PG complex를 분리하여 culture시행 - PG complex에서 anti-FimA항체를 처리하여 병적인 역할(Fim A고유역할인 접착력) 감소를 조사	30
		- Anti-CCP 항체의 고발현 및 생산시스템 구축	100%	- CCP 항체의 고발현을 위한 효과적인 transient expression system 구축 - 효과적인 agroinfiltration 법 구축	20
		- 식물유래 Anti-CCP 항체의 성능조사	100%	- 시투롤린화 된 항원에 대해 결합능력 조사 (Western blot, home made ELISA, human primary tissue등에서)	20
		- Activin A의 고발현 식물 발현벡터 구축	100%	- Activin A의 고발현 식물벡터로 클로닝 - Agroinfiltration법을 이용한 형질전환 - Western blot법을 이용한 고 발현 확인	20
		합계			100
	4차 년도 (2015)	- Anti-FimA 항체의 대량생산법 구축	100%	- 효과적인 transient expression 시스템을 통한 FimA 항체의 대량생산 - 일시적 고발현 확립조건의 재현성 검증 및 대량 생산 조건 확인	30

		- Anti-FimA 항체의 구강 박테리아 감염 억제능검사	100%	- 관절염 유도 실험쥐를 이용한 억제능 확인 - 박테리아의 생육 억제 효과 검증 - 관절염 환자 활막 내 박테리아 존재 확인 및 상주 미생물군 분석	40
		- Anti-CCP 항체의 대량 생산	100%	- 식물에서 anti-CCP 항체를 대량생산하기 위한 일시적 고발현 조건 확립하였으며, fresh leaf biomass당 200-250 mg/kg 생산함을 확인	30
		합계			100
	5차 년도 (2016)	- Anti-FimA 항체의 대량생산법 구축	100%	- 효과적인 transient expression 시스템을 통한 FimA 항체의 대량생산 - 일시적 고발현 확립조건외의 재현성 검증 및 대량 생산 조건 확인	20
		- Anti-FimA 항체를 이용한 전임상 준비	100%	- RA환자에게 Anti-FimA 항체를 국소 투여하여 관절염의 치료효과를 관찰하기 위한 임상연구 개시 준비 완료: 독성평가, 약동학, 약제제형, IND등 사전작업	30
		- Anti-CCP 항체의 대량 생산	100%	- 식물에서 anti-CCP 항체를 대량생산하기 위한 일시적 고발현 조건 확립	20
		- 식물 유래 anti-CCP 항체의 대량생산 후 정제과정 정립 및 임상 적용위한 사전 준비	100%	- Sandwich ELISA, Western blot용 항체 적용 시도 - 벼세포 배양에서 생산된 단클론 항체 CCP의 분리 정제 과정 확립 - 시트룰린화 된 합성 CCP 펩타이드와 그것의 대조구인 시트루린화 되지 않은 CCP 펩타이드를 이용하여 식물유래 단클론 항체 CCP의 결합 여부를 Western blot analysis를 통하여 확인 함.	30
		합계			100

(라) 순천대학교

세부과제명	구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 결과	가중치
제 3 협동과제 (순천대학교) 고발현 핵 형질전환 시스템을 이용한 고부가가치 단백질 생산 GM작물 개발	1차 년도 (2012)	- mini proinsulin 재조합 단백질이 발현된 형질전환담배식물체 고발현 식물체 확립	100%	- mini proinsulin 단백질의 고발현 여부 확인을 위해 signal peptide의 염기서열을 변형한 후 식물발현용 vector를 이용하여 고발현 mini proinsulin 재조합 construct를 제조한 후 형질전환담배 식물체 제조 - reporter gene인 RFP 단백질과 fusion된 재조합 insulin의 생성을 담배배양세포에서 발현시켜 항인슐린 항체를 이용하여 확인함	40
		- mini proinsulin 단백질의 proteolytic processing의 최적화 확립	100%	- 대장균 발현 시스템을 활용하여 mini proinsulin이 발현되어 A-peptide와 B-peptide로 preteolytic	30

				processing되어 활성형의 insulin으로 전환된 후 hexamer로 형성됨을 확인시킨 항체로 확인함	
		- 인슐린 재조합단백질 형질전환 담배 식물체에서의 단백질 수율 및 활성 분석	100%	- 식물발현 수율을 제고하기 위하여 ER-targeting signal peptide 효율을 제고시키도록 염기서열을 변형한 후 재조합 인슐린 construct를 새롭게 제조하여 단백질 수율이 향상된 형질전환 담배배양세포 및 담배식물체제조	30
		합계			100
2차 년도 (2013)		- 재조합유전자 고발현 시스템 개발	100%	- 토마토 유래 <i>PNGase T</i> 유전자의 ER signal sequence 유전자 분리 - <i>35S 프로모터::PNGase T-GFP</i> construct를 제조 - 재조합 유전자의 고발현 시스템으로서 ER targeting 조건에 대한 재조합단백질 발현 탐색 및 비교분석 확인	20
		- 재조합유전자 고출적 시스템 개발	100%	- <i>PNGase T</i> 유전자에서 ER signal sequence를 제거하고 엽록체 targeting을 위해 담배 <i>Rbc S</i> 유전자의 transit peptide를 연결시킨 재조합 <i>PNGase</i> 유전자 construct 제조 - <i>35S 프로모터::transit peptide-PNGase T-GFP</i> construct 제조	20
		- 새로운 의약품 재조합 단백질 후보군 탐색	100%	- 분자농업용 유전자군 자료 조사 - 새로운 의약품 재조합 단백질 후보군 조사	15
		- 토마토유래 <i>PNGase T</i> 가 도입된 형질전환식물체 개발을 위한 고발현, 고효율 construct 제조	100%	- 토마토 유래 full-length의 <i>PNGase</i> 유전자 (<i>PNGase T</i>) 분리 - <i>PNGase T</i> 를 NCBI GenBank 등록 완료 (GenBank Accession No. KM401550) - 고효율 정도를 파악하기 위해 KDEL 서열 유무에 따라 2종류의 <i>35S::PNGase T</i> 절편 제조 - pTRAKT vector에 도입하여 <i>35S::PNGase T</i> 재조합 식물발현용 construct 2종류 제조	15
		- 토마토유래 <i>PNGase T</i> 유전자의 담배 식물체 및 담배배양세포 형질전환	100%	- <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 를 이용하여 <i>35S::PNGase T</i> construct를 담배 잎절편과 담배배양세포에 형질전환	15
		- 토마토유래 <i>PNGase T</i> 유전자 발현 특성 연구	100%	- <i>PNGase T</i> 유전자의 특성을 탐색하기 위하여 토마토 과육의 숙성단계에 따른 <i>PNGase T</i> 유전자의 발현 확인	15
		합계			100

3차 년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> - 토마토유래 PNGase T 단백질의 고발현 형질전환담배 식물체의 확립 	100%	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Agrobacterium tumefaciens</i>를 이용하여 pTRAkt vector에 도입한 <i>35S::PNGase T (+His6+KDEL)</i> 재조합 식물발현용 construct를 담배 잎 절편에 형질전환 - 상기 유전자의 재조합 construct인 토마토유래 <i>PNGase T</i> 가 도입된 형질전환 담배 식물체 2개 라인 확립 (<i>PNGase T-10, PNGase T-11</i>) - 고효율 정도를 파악하기 위하여 <i>KDEL</i> 서열이 없는 <i>35S::PNGase T (+His)</i> 재조합 식물발현용 construct를 <i>Agrobacterium</i>에 형질전환 - 재조합 <i>35S::PNGase T (+His)</i> construct를 담배 잎 절편에 형질전환시켜 형질전환체 선별하여 고발현 형질전환 담배식물체 확립 	50
	<ul style="list-style-type: none"> - 토마토유래 PNGase T 단백질 발현 수율 및 특성 분석 	100%	<ul style="list-style-type: none"> - <i>35S::PNGase T (+His6+KDEL)</i> 유전자로 형질전환하여 확보된 2개 담배 식물체 (<i>PNGase T-10, PNGase T-11</i>)에서 토마토 <i>PNGase T</i> 유전자의 전사체 및 담배 <i>PNGase</i>의 전사체 양의 발현 확인 - 상기 형질전환 담배 식물체에서 총 단백질 분리 및 His-tag protein을 정제하여 SDS-PAGE을 통한 <i>PNGase T</i> 단백질의 발현 확인 	50
	합계			100
4차 년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> - PNGase A 고생산 식물체의 안정적 발현 line 확립 	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 토마토 유래 <i>PNGase T</i> 유전자가 도입된 형질전환 담배 식물체 2개 라인 (<i>PNGase T-10, PNGase T-11</i>) 최종 확립 - 상기 2개의 형질전환 식물체에서 토마토 <i>PNGase T</i> 단백질의 발현을 SDS-PAGE 및 western blot 분석을 통해 확인 - Ni-NTA agarose를 이용하여 His-tagged <i>PNGase T</i> 단백질을 분리하고 정제하여 SDS-PAGE 및 western blot 분석을 통해 His-tagged <i>PNGase T</i> 단백질 발현을 확인 	30
	<ul style="list-style-type: none"> - 산업용 단백질 인 Activin A 단백질이 도입된 형질전환식물체 개발을 위한 construct 제조 	100%	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Activin A (+His6)</i> 유전자를 클로닝벡터(pUC118)에 각각 도입 - His-tagged <i>Activin A</i> 단백질의 분리 및 정제를 위하여 식물발현용 <i>pTRAkt</i> 벡터에 <i>35S::Activin A (+His6)</i>의 재조합 construct를 제조 	40
	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Activin A</i> 단백질 발현 수율 및 특성 분석 	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합 <i>35S::Activin A (+His6)</i> construct를 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>에 도입 	30
	합계			100

	5차 년도 (2016)	- 산업용 Activin A 단백질형질전환식물체의 생산 확립	100%	-고효율, 고축적 분배시스템에서 생산된 Activin A 고생산 식물체 선별 -기존에 확립된 재조합단백질 발현용 시스템에 도입한 <i>Activin A</i> 유전자의 식물체 발현용 construct 제조 완료 - <i>Activin A</i> 유전자가 도입된 형질전환 담배식물체 3개 라인 제조	40
		- Activin A 고생산 식물체의 대량 증식 및 분리정제	100%	-Activin A 고생산 식물체의 homo line에서 종자 증식 - <i>Activin A</i> 가 고발현된 담배식물체 <i>Activin A</i> 유전자 및 단백질의 발현 확인 -안정적인 Activin A 고발현 elite line의 선발	30
		- 식물유래 단백질 산업화 가능성 분석	100%	-3종의 식물체 고발현 단백질의 산업화 가능성 확인에 필요한 요소로서 재배조건과 단백질 수율 분석 -분리 및 정제 수율 최적화 등을 포함한 산업화 방안 제안 -식물체에서 발현된 3종의 단백질의 산업화 가능성 분석 및 사업화 추진 방안 제안	30
		합계			100

(마) 한국생명공학연구원

세부과제명	구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 결과	가중치
제 4 협동과제 (전주생물소 재연) 단자엽 식물 특이적 고발현 시스템을 이용한 고부가가치 단백질 생산 GM작물 개발	1차 년도 (2013)	- TEV endopeptidase 고발현 식물체에 대한 Homo line 구축 및 생화학적 분석	100%	- 본 과제에 제공한 TEV endopeptidase 고발현 식물체를 이용한 homo line 제작	20
		- TEV endopeptidase 고발현 식물체의 대량 증식 및 분리정제	100%	- TEV endopeptidase 고발현 식물체의 Homo line의 종자 증식 - 분리정제를 위하여 1세부과제에 제공	20
		- G-CSF 유전자의 발현벡터 제작	100%	- 단자엽 특이적 고발현시스템을 활용한 G-CSF 유전자의 발현벡터 제작(2종 이상)	20
		- G-CSF 발현벡터의 형질전환	100%	- 2종 이상의 G-CSF 발현벡터의 형질전환 - 각각의 발현 벡터를 이용하여 형질전환체 확보 (각각에 대하여 10 line 이상)	20
		- G-CSF 고발현 형질전환체 선발	100%	- 분자생물학적 방법을 이용하여 G-CSF 고발현 elite line 식물체 선발	10
		- Proinsulin 발현벡터 제작 및 식물형질전환	100%	- 단자엽 특이적 고발현시스템을 활용한 proinsulin 유전자 발현벡터 2종 제작 - 각각의 발현 벡터를 이용하여 식물 형질전환 수행	10
		합계			100

2차 년도 (2014)	- 식물유래 TEV endopeptidase 의 생화학적 분석	100%	- 식물유래 TEV endopeptidase에 대한 온도, pH, 저장성 등에 대한 생화학적 분석 완료	20
	- G-CSF 고발현 형질전환체 확보	100%	- hG-CSF를 고발현하는 elite cell로 pMYO309-(b)11 라인 선발 완료 - pJKS127-5,6,8,11,12, 및 13 cell line 선발:qRT-PCR을 통한 RNA 분석 완료. 현재 단백질 분석을 위한 캘러스 suspension배양 중에 있으며, 남은 2 개월 동안 western분석 수행 완료 예정 - pJKS128-3,6, 및 8 cell line 선발: qRT-PCR을 통한 RNA 분석 완료. 현 재 단백질 분석을 위한 캘러스 suspension 배양 중에 있으며, 남은 2 개월 동안 western분석 수행 완료 예정	20
	- G-CSF 고발현 세포주의 대량 배양 및 분리정제	100%	- G-CSF 고발현 캘러스 cell line pMYO309-b11번의 대량증식 및 hGM-CSF 생산 - 분리정제를 위하여 제1세부과제에 제 공	20
	- PNGase A 발현벡터 제작 및 형질전환	100%	- pJKS107 (pJKS-104,-105,-106 기반) 및 pJKS117 (pJKS-115,-116 기반) 발 현 벡터 제작 완료 - 위의 두 종의 식물발현벡터를 <i>Agrobacterium</i> LBA4404에 형질전환 : Colony 3번 (pJKS107/LBA4404) 및 colony 1번 (pJKS117/LBA4404) 확인 완료 -> 베타캘러스형질전환 수행예정	20
	- Proinsulin 발현 형질전환 cell line 선발	100%	- pJKS129 및 pJKS130 발현벡터가 도입 된 형질전환 캘러스 cell line 개발 - qRT-PCR 수행 결과에 따라 pJKS129 벡터 5라인, pJKS130 벡터 4라인을 선발 완료	10
	- Homo line확보를 위한 재분 화식물체의 종자확보	100%	- pJKS128-8번(shG-CSF) 라인의 재분화 벼 식물체로부터 종자 확보 - pJKS117(PNGase A) 라인의 재분화 벼식물체로부터 종자 확보 - pJKS130(proinsulin) 라인의 재분화 벼 식물체로부터 종자 확보	10
	합계			100
3차 년도 (2015)	- 식물유래 G-CSF의 생화학적 분석	100%	- 식물유래 G-CSF에 대한 생화학적 분석(온도, pH, 저장성 등)	25
	- PNGase A 고발현 형질전환체 확보	100%	- 각각의 발현벡터에 대한 PNGase A 고생산 세포주 확보(2 line 이상)	25
	- PNGase A 고발현 세포주의 대량배양 및 분리정제	100%	- PNGase A 고발현 식물체의 대량증식 및 PNGase A 생산 - 분리정제를 위하여 1세부과제에 제공	25
	- Activin A 발현벡터 제작 및 형질전환	100%	- 2종 이상의 Activin A 발현벡터의 형질전환 - 각각의 발현 벡터를 이용하여 형질전환체 확보(각각에 대하여 10 line 이상)	25
	합계			100

4차 년도 (2016)	- PNGase A 고발현 형질전환체 확보 (3차년도 계속)	100%	- S117 벡터에 의한 PNGase A 발현 세포주 구축 - 추가적인 pJKS107 (NS107) & pJKS117 (NS117) 단백질 발현	25
	- 식물유래 PNGase A의 생화학적 분석	100%	- Fetuin 당 단백질을 이용한 PNGase A (S117 #14 분비 단백질) 효소 활성 조사 - RNase B 단백질을 이용한 PNGase A (S117 #14) 효소 활성 조사	25
	- Activin A (pMYD317) 형질전환 및 고발현 형질전환체 확보	100%	- Enterokinase 서열/Activin A (pMYD317) 형질전환 및 고발현 형질전환체 확보	25
	- Activin A 고발현 세포주의 대량배양 및 분리정제	100%	- Activin A를 발현하는 벼 캘러스 대 량배양 수행	25
	합계			100
5차 년도 (2017)	- Activin A 고발현 세포주의 대량배양	100%	- Activin A 고발현 식물체의 대량증식 및 Activin A 생산 - 분리정제를 위하여 1세부과제에 제공	25
	- 식물유래 Activin A의 생화학적 분석	100%	- 식물유래 Activin A에 대한 생화학적 분석(온도, pH, 저장성 등)	50
	- 유용 GM 세포주의 대량배양	100%	- 유용 GM 세포주의 유지 관리 및 대량배양을 위한 1세부과제 기관에 지속적인 제공	25
	합계			100

4-2. 관련분야 기여도

- ㈜엔비엠이 보유하고 있는 벼세포배양을 이용한 외래단백질 대량생산 기술은 다양한 단백질의 생산에 적용이 가능하다. 식물에서 생산한 단백질은 대장균과 동물세포에서 생산한 단백질과 비교하여 안전성이 우수하여 줄기세포배양 등에 탁월한 효과가 있어 줄기세포 관련 산업의 발전에 기여할 것으로 판단한다. 식물세포유래 성장인자 등은 최근 기능성 화장품의 원료로 각광을 받고 있는바 식물유래 단백질의 우수성으로 기존의 대장균과 동물세포에서 생산한 성장인자를 대체할 수 있을 것으로 판단된다.
- 벼 현탁세포 유래 재조합 Enterokinase의 수요가 증가하는 시점과 전 세계적으로 식물유래 재조합 Enterokinase 생산기업이 당사 1곳 뿐 인 제반 여건 등을 고려 할 때 벼 현탁세포 유래 재조합 Enterokinase의 고순도 분리정제를 통한 생산기술 확립을 통하여 제품의 고품질화가 이루어져 직접적으로 매출증가로 이어질 것으로 기대한다. 벼 현탁세포 유래 재조합 Enterokinase의 대용량 분리정제를 통하여 품질관리가 가능하다. 경쟁제품 순도(> 90%) 대비 고순도(> 95%)의 Enterokinase 분리정제를 통하여 제품 경쟁력 강화가 기대된다.

- 식물세포 배양을 이용한 유용 단백질 생산을 위하여 고발현 시스템의 개발은 필수적이라 할 수 있다. 다양한 유용단백질을 고발현하는 식물세포 현탁배양 기술과, 식물 viral vector를 이용한 대량생산 기술 등은 식물분자농업 기술의 산업화에 크게 기여 할 것으로 판단된다

- 식물에서 순수 분리된 항체단백질을 이용하여 *P. gingivalis*에 대한 방어 기능을 확인함으로써 식물세포를 이용한 항체 단백질 생산 분야에 기초 정보를 제공할 수 있을 것이다.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

5-1. 연구결과의 산업화 계획

○ 본 과제에서 추진한 각각의 유용단백질 별 비즈니스 특성은 아래와 같다.

단백질		특징
항체	FimA 항체	<ul style="list-style-type: none"> - 제 2협동과제에서 확보한 GM작물 - 충치 유발균이나 최근 류마티스 발병과의 연관성이 매우 높다고 확인됨 관련 - 식물에서 정상적으로 생산됨을 확인하고 항원을 인식함을 확인 - 바이오베터로 인정받을 수 있는 신약이 될 수 있음 - 식물유래 FimA 항체를 포함한 충치예방을 위한 기능성 가글제, 치약 등의 제품화가 가능함
	CCP mAb	<ul style="list-style-type: none"> - 제 2협동과제의 참여기관인 카톨릭의과대학 연구진에 의하여 단클론 항체 생산을 위한 하이브리도마를 확보하고 있으며 기능이 확인되어있음 - 류마티스 관절염에 대한 조기, 정밀 진단이 가능한 진단용 항체로 이용 가능함으로 류마티스 관절염 진단키트로 산업화가 가능함
의료용 단백질	human Insulin	<ul style="list-style-type: none"> - 제 3협동과제에서 확보한 GM작물 - 10대 단백질 의약품으로 분류되는 시장성이 큰 당뇨병 치료제 - 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 많은 품목임 - 우리나라 식약청에서도 바이오시밀러 가이드라인을 제정하여 바이오시밀러 또는 바이오베터의 개발을 장려하고 있는 품목으로 산업화 가능성이 높음
	hG-CSF	<ul style="list-style-type: none"> - 세계시장 연 40억\$(약 5조원)로 시장성이 매우 큼 - 2006년 원천특허 만료로 인하여 현재 세계적으로 바이오시밀러 개발의 대상이 되고 있으며 바이오시밀러가 가장 많은 품목임 - 현재 대장균에서 G-CSF 생산기술이 일본 기업에 의하여 독점되어 있어 <u>현재 시약으로도 구입이 어려움(식물에서 발현된 것은 해당 없으므로 생산단계에서 즉시 연구용(연구용 만 500억 시장)으로 사업화가 가능함)</u>

		<ul style="list-style-type: none"> - 우리나라 식약청에서도 바이오시밀러 가이드라인을 제정하여 바이오시밀러 또는 바이오베터의 개발을 장려하고 있는 품목으로 산업화 가능성이 높음
산업용 단백질	TEV endopeptidase	<ul style="list-style-type: none"> - 제 4협동과제에서 확보한 GM작물 - 재조합 단백질 생산시 tagging protein을 제거하는 필수적인 효소 - 단백질의 특성상 대장균에서 생산 할 때에 inclusion body를 형성하여 생산수율이 낮으며, 대부분 CHO cell에서 생산하는 관계로 매우 고가임 - 의료용 단백질 생산시 2차 감염 관계로 동물세포유래 효소를 기피하는 실정이므로 생산시 사업화 가능성이 매우 높음
	PNGase A	<ul style="list-style-type: none"> - 최근 바이오시밀러연구와 분자농업 연구의 관심이 높아지면서 식물유래 및 곤충세포유래 당단백질의 구조분석 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있음 - 식물유래 당단백질 당구조상 Fucose와 Xylose를 포함하고 있으므로 미생물 유래 PNGase F에 의하여 절단이 되지 않아 반드시 식물유래 효소인 PNGase A를 사용하여야 절단이 됨(Altman et al., 1998, Eur. J. Biochem. 252, 118-123) - 식물 특이적 당단백질의 당구조를 절단하는 <i>N</i>-Glycosidase로서 Almond 유래 <i>N</i>-Glycosidase인 PNGase A에 대한 유전자가 확인되어 1995년 미국(5,710,016)에 특허가 등록되었으며, 2015년에 유전자에 대한 특허가 만료됨으로 본 사업의 추진에 문제가 없음 - 상기 특허유전자를 이용한 재조합 PNGase A 생산 특허는 존재하지 않아 본 사업의 연구결과는 특허성이 있음 - 상기와 같이 수요가 급격하게 증가하고 있는 단백질이나 현재는 전량 아몬드에서 추출하여 사용하므로 매우 고가(30만원/1miu) 이므로 재조합 단백질로서의 생산이 이루어지는 즉시 산업화가 가능하다고 판단됨
산업용 단백질	human Activin A	<ul style="list-style-type: none"> - ActivinA가 임신-특이적병인 자간전증(子癩前症)의 biomarker로 보고되고 있어 이를 이용한 진단키트 개발이 가능함(The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2012, 97:8, E1370-E1379) - Activin A는 TGF-β family로 신장, 췌장 및 전립선 등 다양한 조직에서 발견되며, 여러 세포들에 작용하여 분화 및 발생을 유도하는 역할을 한다. 특히 췌장 형성을 유도하고, 췌장 세포 내의 PAX4와 neurogenin 3(Ngn3)의 발현을

		<p>조절하여 내분비 세포 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있음(Li L., Yi Z., Seno M. and Kojima I., (2004) "Activin A and Betacellulin." <i>Diabetes</i>. 53:608-615).</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최근에는 줄기세포배양의 인자로서 수요가 늘고 있으나 단백질의 특성상 미생물에서의 재조합 단백질의 생산이 불가능한 상황으로 대부분을 동물세포(Pangas and Woodruff, 2002, <i>J. Endocrinol.</i> 172:199-210) 및 곤충세포(Ciaran et al., 1998, <i>The Intern'l J. Biochem. & Cell Biol.</i> 30: 1129 - 1145)배양을 통하여 생산하고 있음 - Activin A에 대한 물질특허는 만료되었으며 식물에서의 재조합 Activin A 생산 관련 특허는 출원되지 않은 상태로 본 연구결과는 국내 및 국제특허확보가 가능함 - Activin A는 homo dimer의 형태로 이루어지는 관계로 미생물에서의 생산이 되지 않아 현재 동물세포에서 생산하여 사용되는 매우 고가 단백질 임(1200만원/mg) - Activin A는 non-glycoprotein 이므로 식물유래 당에 의한 문제가 없어 향후 의료용으로 사용가능성이 매우 높음
--	--	--

○ 본 과제를 통하여 식물세포주를 이용하여 산업화를 하기 위한 유용세포주의 대량배양과 대용량 단백질 분리정제에 필요한 시설 및 장비를 구축하였으며, 이를 이용하여 (주)엔비엠이 기보유하고 있던 유용단백질 세포주 및 본 연구개발 사업을 통하여 개발한 hG-CSF 등의 유용단백질 생산 세포주를 적용하여 고순도의 단백질 시제품을 확보하였으며, 이외에도 EK, TEV endopetidase, hGM-CSF의 완제품을 생산하고 이의 활성화와 저장조건 등을 규명하였음. 따라서 본 연구개발을 통하여 생산기술이 확립된 상기의 제품에 대하여 아래와 같이 산업화를 추진할 예정임

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 자체사업화 ○ 수요처 : 국내외 줄기세포 관련 기업, 연구기관, 화장품 회사 ○ 예상 단가 : 5만원/1mg(EGF 등)
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 높은 생산능력과 가격 경쟁력 - (주)엔비엠은 국내 최대규모의 단백질생산용 식물세포배양기(최대 4 톤/batch)를 보유하고 있으며 95% 이상의 단백질 분리정제에 필요한 설비를 보유하여 성장인자에 따라 생산성은 다르나 1 - 2g/batch의 생산

구분	구체적인 내용
	<p>능력을 보유하고 있음</p> <ul style="list-style-type: none"> - 당사의 생산성은 세계 최초로 식물에서 EGF를 생산하여 사업화에 성공한 아이슬란드의 바이오이펙트사의 생산성(1m²당 연간 생산성) 보다 1,000 배 이상 높은 생산성을 보이고 있음 - 이러한 기술을 적용하면 본 연구개발에서 확보한 hG-CSF, EK, TEV endopetidase, hGM-CSF를 기존 제품 대비 1/5 이하로 크게 줄일 수 있어 가격경쟁력을 확보하고 있음 <p>○ 브랜드 보유</p> <ul style="list-style-type: none"> - 당사는 식물유래 성장인자 및 산업용 효소에 대한 브랜드(<i>INNokine</i>, <i>INNOzyme</i>)를 개발하고 이미 상표등록을 완료하였으며, 거대시장인 미국, 유럽, 러시아, 일본 등에도 브랜드 확보를 위한 관련 사업을 진행하고 있음 <div data-bbox="512 952 1233 1173" style="text-align: center;"> </div> <p style="text-align: center;">< 벼 현탁세포유래 성장인자 브랜드 ></p>
<p>상용화 계획 및 일정</p>	<p>○ 마케팅 활동 전략</p> <ul style="list-style-type: none"> - 국내·외 전시박람회에 참가하여 기존의 세균유래나 동물세포유래 소재와 비교하여 우리 식물유래 소재의 우수성과 차별성을 홍보함 - 사업시작 직후부터 꾸준하게 추진함 <p>○ 판로 확보 전략</p> <ul style="list-style-type: none"> - 각종 식물유래 성장인자의 유효성 확인이 종료된 시점부터 각각 추진 - 수출 전담 바이어를 통해 해외시장의 판로를 개척하여 해외 시장에 우리의 비동물성 성장인자를 줄기세포 배양인자로 1차 사업화를 진행하고, 이후 추가적으로 피부재생 등에 효과적인 성장인자는 화장품 원료로서 사업화를 추진할 예정임 - 국내 시장에서의 본 제품의 신뢰성 검증을 바탕으로 해외시장의 공급이 가능해질 것으로 예상되며 지속적으로

구분	구체적인 내용
	<p>국내외 업체와 유대관계를 유지해 나갈 계획임</p> <p>○ 제품 판매 전략</p> <ul style="list-style-type: none"> - 우선 본 과제의 주관기관과 원활한 협조체제 유지로 당사에서 개발한 각종 성장인자를 줄기세포배양인자로 1차 사업화를 추진 - 상기와 병행하여 식물유래 각종 성장인자를 소량 포장하여 연구용으로 시장진입 할 예정이며, 이때에는 국내 연구자의 부담을 덜어주기 위하여 SIGMA 가격대비 60 - 70% 수준으로 공급 - 본 연구수행으로 생산한 각종 성장인자 중에서 피부재생 등에 효과적인 성장인자는 화장품 원료로서 사업화를 추진

5-2. 교육 · 지도 · 홍보 등 기술 확산 계획 등

- 본 사업화 결과는 우리나라 최초의 분자농업 사업화 결과로 파악하고 있으며, 국내 분자농업기술의 사업화 가능성을 보여주는 사례로서 적극 홍보하여 사업화 가능성이 높은 연구결과를 보유한 관련 기관의 적극적인 사업화 추진의 사례가 될 수 있도록 관련 학회참가, 전시회참가 및 언론 홍보 등 적극적인 활동을 추진 할 예정이다.
- 본 연구에서 얻어진 대부분의 기술들은 식물에서 단백질을 생산하고자 할 때 필요한 원천 기술들이므로 이들은 다른 부분에서의 연구에서나 단백질 산업화 연구에 필수적인 내용들이다. 따라서 이러한 연구 결과가 다른 부분에서 충분히 활용될 수 있을 것이다.

5-3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 본 사업의 추진을 통하여 확보한 Activin A, hC-CSF, Anti Fim A 항체의 생산기술 등의 연구결과는 기존에 논문발표 및 특허 등록을 통하여 지적재산권을 확보하였다.
- 향후 식물유래 고순도 TEV endopeptidase, Enterokinase, Activin A, hC-CSF, Anti Fim A의 새로운 용도개발이 완성 될 경우에는 관련 학회에 논문을 투고함과 함께 특허를 출원하여 지적재산권을 확보할 계획이다.

5-4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 식물세포 유래 고순도 EK, TEV endopetidase, hGM-CSF 등의 대량생산 및 고순도 분리정제 기술을 활용하여 다른 고부가가치 재조합 단백질(재조합 성장인자, 항체, 산업용 효소 등)의 생산 및 산업화에 활용 할 계획이다.
- 추가 연구가 절실히 필요함. 식물 세포를 단백질 생산 시스템으로 개발하기 위해서는 본 연구에서 얻어진 결과들을 더 확대하거나 추가할 필요가 있다. 21세기 바이오텍 산업의 핵심 중의 하나가 단백질 생산 산업으로 전망됨으로 식물에서 저비용으로 대량의 의료용 및 산업용 단백질을 생산할 수 있다면 산업화 할 수 있을 것이므로 이 부분에 추가적인 연구가 절실히 필요하다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

6-1. 분자농업 관련 해외과학기술

- 최근에는 animal free 컨셉이 대세가 되면서 식물유래 단백질의 상용화에 기업의 투자가 활발해지고 있으며, 미국 PEPROTECH(<https://www.peprotech.com/en-US/Pages/default.aspx>)사는 animal free 컨셉으로 식물유래 사이토카인의 판매에 돌입하였으며, 스웨덴 Agrenvec (<http://agrenvec.com/>)사 또한 2012년부터 식물유래 고부가가치 재조합 단백질의 시판을 시작하였다.
- 국내외적으로 biosimilar라 부르는 단백질 의약품을 만들고자 하는 강력한 흐름이 나타나고 있으며, 특히 고부가가치의 의약품에 대한 특허가 만료됨으로 인하여 더 값싸게 단백질을 생산하기 위한 방법에 대한 수요가 급격히 증가되고 있다. 이러한 흐름에서 식물에서 biosimilar와 같은 의료용 단백질 뿐만 아니라 식품용 및 산업용 단백질을 저비용으로 대량으로 생산하기 위한 기술은 biotech의 가장 중요한 핵심 기술 중의 하나일 것이다.
- 유럽 의약품청 (European Medicines Agency)은 돼지유래 트립신을 이용하여 생산한 의약품에서 돼지 썬코바이러스의 DNA가 검출됨에 따라 향후 돼지유래 트립신의 사용을 금지하는 방안을 마련하여 현재 의견수렴 중에 있으며, 유럽의약품청은 돼지유래 트립신을 대신할 제품으로 식물에서 생산한 재조합 트립신의 사용을 제시하고 있는 상황이다.



좌 문서의 적색부분 확대:

Alternatives

The EMA also discussed potential alternatives citing recombinant bacterial or plant-derived trypsin or enzymes from invertebrates as examples.

"The use of bacterial or **plant derived recombinant trypsin** minimises in principle the risk for animal virus contamination and the application of such alternatives is therefore encouraged."

< 돼지유래 트립신의 의약용으로 사용에 대한 유럽의약품청 (European Medicines Agency)의 견해 >

Draft guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products

Email Help

Document details

Download document	 Draft guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products
Reference number	EMA/CHMP/BWP/814397/2011
Status	draft: consultation open
First published	01/03/2013
Last updated	01/03/2013
Consultation start date	01/03/2013
Consultation end date	31/08/2013
Email address for submissions	ana.trullas@ema.europa.eu

Summary

This guideline describes the information to be considered by the manufacturer of human biological medicinal products using porcine trypsin.

< 유럽의약품청(European Medicines Agency)이 공개하고 현재 의견수렴 중인 돼지유래 트립신의 의약용으로 사용에 대한 가이드라인(안). 자료출처: <http://www.ema.europa.eu> >

- 이전 연구들에서 M cell의 기원에 대해 여러 가설이 있었으나 더 많은 연구들이 요구되어왔다. 최근 알려진 Lgr5⁺ stem cells의 단독 분리 및 in vitro crypt-villus 구조 형성이 확인되었으며, RankL 처리에 따라 M cell 분화 유도 및 in vitro miniguts의 구조 형성이 확인됨에 따라 새로운 M cell 분화 방법이 제시되었다. 최근 Lgr5⁺ stem cell 이외 Intestinal stem cells을 surface markers를 이용하여 CD44⁺CD24^{lo}CD166⁺GPR^{lo/-}ckit⁻ single cell로 분리 방법이 제안되었으며 M cell을 제외한 여러 type의 cell로 분화 유도됨이 확인되었다. 따라서, 기존의 M-like cell culture model을 이용한 방법 이외에, intestinal stem cells로 부터의 M cell 분화 유도 및 특성 연구의 가능성이 제시되고 있다.

6-2. 식물에서 생산된 고세병 치료 효소(Ellelyso)의 시장진출

- 2009년 12월 이스라엘의 Protalix Biotherapeutics사는 당근 세포배양을 통해 생산한 고세병(Gaucher's Disease) 치료 효소(glucocerebrosidase)인 taliglucerase alpha를 이용하여 환자들을 대상으로 실시한 단계 III 임상실험에서 매우 긍정적인 결과를 얻게 되었다. 세계 최대 규모의 다국적 제약회사인 Pfizer와 Protalix Biotherapeutics는 2009년 12월 1일에 식물 세포에서 발현된 glucocerebrosidase인 taliglucerase alfa를 고세병(Gaucher's Disease) 치료제로 개발하고 상용화하여 Pfizer가 taliglucerase alfa의 판매에 대한 전세계 독점 특허사용 권한을 가지고 Protalix Biotherapeutics는 이스라엘에서 독점적인 상업화 권리를 가지게 된다는 계약 체결하였다. Pfizer는 Protalix Biotherapeutics에 6천만 달러(600억 원)의 초기 계약금을 지불하고, Protalix Biotherapeutics는 최대 5천5백만 달러(550억 원)의 규제 마일스톤 지불 금(regulatory milestone payments)을 받을 수 있게 되

고, Pfizer와 Protalix Biotherapeutics는 각각 6:4의 비율로 taliglucerase alfa(당근세포 유래 glucocerebrosidase)의 개발 및 상품화를 위한 지출과 미래의 수익을 공유하기로 계약하였다. 2012년 5월에 Pfizer와 Protalix Biotherapeutics가 type 1 고세병 성인 환자들의 효소 교환 치료용 주사제로 개발한 Elelyso가 FDA의 승인을 받음으로써 세 번째 고세병 효소 치료제가 미국에서 판매될 수 있게 되었다. Elelyso의 연간 환자 당 치료비용은 \$150,000로 책정되었고 이것은 Cerezyme의 \$200,000와 Vpriv의 \$170,000에 비해 각각 25% 및 12% 낮은 가격이다.

6-3. 기타 분자농업관련 주요 이슈

- 식물을 통한 유용단백질 생산 기술은 신기술 분야에 속하며, 우리나라에서는 본 기술의 중요성을 다른 선진국과 비교하여 빨리 인식하여 세계적으로도 본 최신키술의 국내정착과 함께 식물을 이용한 단백질생산 기술에서 국제적인 경쟁력을 확보하고 있으므로 지금까지의 연구결과를 활용하여 재조합 단백질의 생산이 불가능한 기술을 확립함으로써 난발현성 단백질 생산 분야에서의 기술적 우위를 점할 수 있음
- 삼성경제연구소의 CEO Information 제731호 (2009년 11월 19일) ‘한국이 주목해야 할 차세대 바이오사업 5選’ 보고서 주요내용 중에 식물에서 고부가가치단백질을 생산하는 분자농업(Molecular Farming)을 향후 우리나라가 집중 투자하여야 할 기술로 선정하고 있으며(http://www.mypoba.or.kr/file/DATA/NS/pdf/0906_200911180001.pdf), 유럽에서도 2005년 39개 연구소·기업이 연합한 Pharma-Planta 컨소시엄이 결성되어 공동 연구를 수행하고 있는 등 관련 분야의 관심도가 높아지고 있음
- 최근에는 이스라엘의 Protalix(<http://www.protalix.com/index.asp>)사가 당근세포로부터 고세병 치료제인 Glucocerebrosidase enzyme(GCD)을 생산하였으며 미국 FDA의 임상이 완료되어 상용화가 이루어졌음
- 또한, 최근에는 animal free 컨셉이 대세가 되면서 식물유래 단백질의 상용화에 기업의 투자가 활발해지고 있으며, 미국 PEPROTECH (<https://www.peprotech.com/en-US/Pages/default.aspx>) 사는 animal free 컨셉으로 식물유래 사이토카인의 판매에 돌입하였으며, 스웨덴 Agrenvec (<http://agrenvec.com/>)사 또한 2012년부터 식물유래 고부가가치 재조합 단백질의 시판을 시작하였음
- 국내외적으로 biosimilar라 부르는 단백질 의약품을 만들고자 하는 강력한 흐름이 나타나고 있으며, 특히 고부가가치의 의약품에 대한 특허가 만료됨으로 인하여 더 값싸게 단백질을 생산하기 위한 방법에 대한 수요가 급격히 증가되고 있음.
- 이러한 흐름에서 식물에서 biosimilar와 같은 의료용 단백질 뿐만 아니라 식품용 및 산업용 단백질을 저비용으로 대량으로 생산하기 위한 기술은 biotech의 가장 중요한 핵심 기술 중의 하나일 것임.

- 유럽의약품청(European Medicines Agency)은 돼지유래 트립신을 이용하여 생산한 의약품에서 돼지 썬코바이러스의 DNA가 검출됨에 따라 향후 돼지유래 트립신의 사용을 금지하는 방안을 마련하여 현재 의견수렴 중에 있으며, 유럽의약품청은 돼지유래 트립신을 대신할 제품으로 식물에서 생산한 재조합 트립신의 사용을 제시하고 있는 상황임.
- 식물의 상업적 단백질을 생산하기 위한 소형공장으로 시범 된 이래로 공장에서 생산된 재조합 단백질의 상업화는 지난 20년 동안 천천히 진행되었다. 이 기술은 초기 단계에 머물러 있으며 기존의 다른 박테리아나 동물세포 플랫폼과 비용 기반으로 경쟁 할 만큼 강력하지 않았다.
- T-DNA에 프로바이러스 replicon을 포함하는 agrobacteria 현탁액을 식물의 잎에 침투시키면 다른 발현 시스템보다 효율적으로 식물체 전신에 확산되는 것을 기초하여 개발되었다 (Gleba et al., 2007).
- 바이러스 벡터 시스템 (예 : magnicon, geminiviral 및 pEAQ)의 개발은 식물체에서 불충분한 단백질 발현 수준, 일관성 및 발현 속도에 직면하는 문제점을 해결하였다 (Chen 및 Davis 2016). 예를 들어 바이러스 벡터를 이용한 발현은 2주 이내에 잎의 무게 1g당 단일 클론항체 5mg까지 생산할 수 있다 (Hefferon 2012). 재조합 단백질을 유도하는 화학 유도 물질을 갖는 바이러스 벡터 시스템은 형질전환 식물체의 성장 및 재조합 단백질의 생산 단계로 분리 할 수 있어 단백질 생산수율을 높이는데 사용 될 수 있다.
- 형질전환 식물체에서 replicon 활성화를 재조합 단백질 유도성 프로모터에 의해 조절함으로써 프로모터 시스템을 포함한 형질전환 식물체는 5,000배 이상의 높은 RNA 증폭을 나타냈고 높은 수준의 단백질의(4.3 mg/g of fresh biomass) 발현을 보였다 (Werner et al. 2011).
- 재조합 단백질이 약물로 주입 될 때 glycosylation은 단백질 구조, 생물학적 활성 및 안정성에 영향을 미칠 수 있다 (Strasser et al., 2014). 특히, 식물 세포는 식물 특이적 당 (β 1,2-xylose and core α 1,3-fucose residues)의 첨가로 초래하는 N-당화 기작을 가지며, 이는 사람에서 면역원이 될 수 없다. 식물은 β 1,4-galactose residue 또는 sialic acid와 같은 동물 특이적인 당을 합성하지 않는다 (Gleba et al., 2007).
- 식물체-기반 에볼라 백신 지맵(ZMapp)의 실제 적용 : 지맵은 에볼라 확산 공포가 전 세계를 휩쓸면서 관심을 받고 있는 치료제 & 백신 가운데 하나로 미국 샌디에고에 있는 바이오벤처(맵) 바이오제약이 개발, 영장류 실험만 마친 단계임
- 담배바이러스에 에볼라 치료 단백질을 생산을 위한 유전자를 삽입한 뒤 담배식물을 감염시켜 생산하는 단일클론항체인 지맵은 현재 실험단계이나, 이번 서아프리카에서 창궐한 에볼라 환자의 치료를 위해 투여 후 치료 효과 보임 => 향후 식물분자농업의 활성화 계기가 예상됨
- “분자농업은 재조합단백질 생산에 비용 효과적인 플랫폼을 제공할 수 있으며, 특히 저비용과 유연성을 제공해야하는 식물기반의 플랫폼 구축은 더욱 유익하다. 향후 다운스트림 처리 방안 개선과 배양기 단계에서 단백질 분비에 관한 표적 전략 개발이 중요함” (by Frost & Sullivan 2013 report)

- 노르웨이 베르겐대학 임상과학부 연구팀: 담배식물을 이용한 독감 백신 양산 작업 돌입 (2014.02.18. 헬스코리아뉴스 보도)
- 벼를 기반으로 하여 각종 전염성 질병에 대한 백신 개발에 이어 최근 연구 동향에 의하면 Cedar pollinosis, House dust mite allergy와 같은 IgE 유도 면역에 관련된 백신 (Azegami et al., 2014) 개발
- 옥수수과 담배 등의 식물에서 치료용 또는 성장호르몬과 관계된 재조합단백질을 생산하는 프랑스의 'MERISTEM Therapeutics S.A'는 정제기술 전문회사인 SBH사와 양질의 단백질을 생산하고 생산성을 높이는 공동연구에 합의
- 바이렛 유사 입자 (virus-like particles, VLP)를 이용하여 항원성을 높일 뿐만 아니라, 더불어 항원의 전달체로 사용하기 위한 연구들이 큰 흐름을 차지하는 점도 최근 연구 동향으로서 예의주시할 필요가 있음 (Neuhaus et al. 2014)
- 2014년 출간된 형질전환식물체 관련 논문들 (5,117건) 중 식물을 기반으로 한 재조합단백질 생산 관련 연구는 약 11.7%인 599건 이며, 내용으로 백신은 114건, 치료용 단백질 106건, 화장품 관련 5건 등의 분포를 보였음
- 또한, 최근에는 animal free 컨셉이 대세가 되면서 식물유래 단백질의 상용화에 기업의 투자가 활발해지고 있으며, 미국 PEPROTECH (<https://www.peprotech.com/en-US/Pages/default.aspx>)사는 animal free 컨셉으로 식물유래 사이토카인의 판매에 돌입하였으며, 스웨덴 Agrenvec (<http://agrenvec.com/>)사 또한 2012년부터 식물유래 고부가가치 재조합 단백질의 시판을 시작하였음
- 국내외적으로 biosimilar라 부르는 단백질 의약품을 만들고자 하는 강력한 흐름이 나타나고 있으며, 특히 고부가가치의 의약품에 대한 특허가 만료됨으로 인하여 더 값싸게 단백질을 생산하기 위한 방법에 대한 수요가 급격히 증가되고 있음.
- 대표적인 외국의 식물체를 이용한 의약품 생산 기업으로는 앞서 언급되었던 미국 켄터키 바이오프로세싱 (KBP)과 캐나다의 메디카고 (Medicago)가 있으며, 이들 업체들은 FDA의 cGMPs (Current Good Manufacturing Practices) 기준에 맞춰진 시설을 구비하고 이들 시스템을 통하여 최적의 식물 배양시스템 하에서 최고 효율의 단백질 생산 시스템을 운영 중.
- 독일의 식물생명공학 기업인 Icon Genetics (Nomad로 신규 창업)에서는 재조합 바이러스 벡터 전략을 통해 새로운 발현 플랫폼을 제작함으로써 처음 감염된 세포 주변의 세포로 빠르게 전파되어 발현 효율을 높이는 데 성공했음. 이런 다양한 기술들은 아그로박테리움에 의한 빠른 전환 효율, 바이러스에 의한 단백질 생산량 증가, 그리고 식물체를 이용한 0.1 mg의 백신 당 0.01\$ 정도의 값싼 생산비와 같은 장점을 이끌어 냄.
- 일본 딸기 유래 개 치주염 백신 승인, 식물공장을 이용한 인터페론 인슐린 생산용 식물 재배 연구
- 고셔병 치료제, 프로탈릭스(이스라엘)는 화이자에 라이선스 독점권 양도, 보리 유래 세포 성장인자 포함 화장품 판매(아이슬란드의 바이오이펙트) (EU)
- 토마토를 이용한 C형 간염 백신, 벼 유래 B형 간염 백신 개발 중 (중국)

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호

D-09

- 본 연구과제는 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따른 분류에 의하여 [일반과제로]로 분류됨
- 본 과제 수행을 통하여 산출된 연구결과들 중 일부는 논문으로 출판되었지만, 현재 논문 출판과 특허 출원을 위해 준비 중에 있는 결과들도 있으므로 어느 정도의 보안이 요구되는 상황임
- 특히, 본 연구개발사업의 결과는 산업체를 통하여 산업화를 추진 중에 있으므로 연구개발 관련 모든 정보의 취급에 주의가 요망됨

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
해당사항 없음								

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호 D-11

9-1. 본 연구개발에 참여하고 있는 각 참여기관 별 안전조치 이행실적은 아래와 같음

□ 기관명 : (주)엔비엠

1. 기술적 위험요소 분석

- 실험실 및 관련 시설을 위험요소별로 체계 확립 후 관리
 - 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2. 안전관리대책

○ 개요

- 「유전자변형생물체의 국가 간 이동 등에 관한 법률」, 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「환경안전관리규정」에 의거 안전한 실험실 및 생산실 환경조성과 연구 및 생산활동종사자를 대상으로 사고예방을 위한 환경안전교육 실시
- 교육 대상자 : 생산팀원 및 부설연구소 종사자

○ 교육

- 신규교육 : 신입사원을 대상으로 하며, 관련 유관기관의 교육일정을 확인하여 위탁교육을 실시
- 정기교육 : (주)엔비엠의 관련업무 종사자를 대상으로 산업통상자원부, 미래창조과학부 등 관련부처 및 기관에서 실시하는 교육프로그램을 이수하도록 함
- 수시 교육: 실험실 사고 발생, 신입 연구원 채용 등 실험실 안전교육이 필요시 실시

< 자체보안관리진단표 >

구분	체크항목	결과 체크 (√/X)	비고 (미실시 사유)
보안관리 체계	○ 기관 내 보안관리규정을 제정/적용하고 있다.	○(√), X()	
	○ 보안관리 조치가 있으며, 자체 보안점검 실시 등 잘 운영되고 있다.	○(√), X()	
	○ 보안교육을 정기적(1회/상)으로 실시하고 있다.	○(√), X()	
참여연구원 관리	○ 보안사고에 대한 방지대책 및 비상시 대응계획이 준비되어 있다.	○(√), X()	
	○ 참여연구원에 대하여 보안서약서를 받았다.	○(√), X()	
연구개발 내용/결과 관리	○ 참여연구원에게 보안관리의 중요성 등을 인식시키고 있다.	○(√), X()	
	○ 주요 연구자료 및 성과물의 무단유출 방지대책을 수립하고 있다.	○(√), X()	
	○ 보안성 검토 방법 및 절차를 이행하고 있다.	○(√), X()	
연구시설 관리	○ 기술이전 관련 내부규정 및 절차를 준수하고 있다.	○(√), X()	
	○ 연구시설 보안관련 내부규정 또는 지침을 이행하고 있다.	○(√), X()	
	○ 주요 시설에는 보안장비가 설치되어 있다.	○(√), X()	
정보통신망 관리	○ 보호구역이 지정되어 있다.	○(√), X()	
	○ 정보통신망 보안관련 내부규정 또는 지침이 구비되어 있다.	○(√), X()	
	○ 보안관리책임자의 승인 항목이 구분되어 있다.	○(√), X()	
	○ 주요 데이터에 대해 백업을 실시하고 있다.	○(√), X()	
	○ 개인용 정보통신장비(노트북, USB메모리)에 대하여 안기관리중이다.	○(√), X()	
	○ 전산망 보호를 위한 HW 및 SW 등을 도입하여 적용하고 있다.	○(√), X()	
	○ 직책, 임무별 열람 권한을 차등화하여 부여하고 있다.	○(√), X()	

□ 기관명 : LED농생명 융합기술연구센터(전북대 연구센터), 전북대학교

1) 안전 관리 대책

- 다음과 같이 연구수행 기관인 전북대학교의 공통 연구실 안전조치 이행사항을 준수하고 있음.

○ 안전점검 및 정밀안전진단

구 분	점 검 내 용	점검주기	점검주체
안전점검	일상점검 - 다음 각 호의 사항을 육안으로 점검 · 기계·기구·전기·가스 등의 실험기자재와 약품·병원체 등 실험재료의 이상유무 · 보호 장비의 관리실태를 육안으로 점검	매일 1회	연구실 책임자
	정기점검 - 다음 각 호의 사항을 장비를 이용하여 점검 · 기계·기구·전기·가스 등의 설비기능의 이상 유무 · 보호 장비의 관리실태	매년 1회	연구주체의 장
정밀안전진단	- 외관 육안점검 및 점검 장비를 사용하여 연구실 내·외의 안전보건과 관련된 사항을 진단·평가	2년마다 1회	연구주체의 장

○ 관리주체별로 다음과 같이 개선 시행

구 분	개 선 내 용	개선주체
시설·설비측면	- 가스누설경보기 설치 - 가스용기 전도방지장치 설치 - 흡후드 등 배기장치 보수 - 세안/샤워설비 설치 등	대학본부
유지관리 측면	안전수칙 미게시, 소화기 위치표시 미비 일상점검 미실시, 정리정돈 불량 등 구급용구 미비치, 가스용기 충전기한 경과 등	학장 해당 실험실

2) 보험가입 등

- 가입내용 : 연구활동 종사자의 상해·사망에 대비하여 연구활동 종사자를 피보험자 및 수익자로 하는 보험에 가입하고 있음.

3) 안전교육 등

구 분	실시주체	실시시기	교육내용
집체교육	연구실 책임자	매월 1시간 이상	연구실 안전환경 법령에 관한 사항
	대학본부	연 2회	연구실 내 유해·위험요인에 관한 사항
온라인 교육	대학본부	연 6회	안전분야별 총 23차시

□ 기관명 : 순천대학교

1) 기술적 위험 요소 분석

- 우리 기관은 연구실 안전시설 장비를 구비하였으며 시설물, 화학약품 등 정기적으로 연구자의 안전교육 및 안전관리상태를 점검하고 있어 연구실의 기술적 위험 요소에 대하여 안전하다고 분석되어진다.

2) 안전 관리 대책

- 이번 연구에는 유전자형질전환식물체 제조 및 사용 과정이 수반되는데 본 연구진은 정부로부터 GMO 관리시설로 지정되어 안전관리가 이루어지는 실험시설을 소유하고

있으며, 연구 과정에서도 정부지침에 따라 지속적인 관리를 철저히 실시하였다.

- 연구수행 기관 차원에서 연구실 안전 보험에 가입되어 있어 참여연구원들은 이 보험의 적용을 받게 된다.
- 우리 기관은 방사성 동위원소 사용기관 승인을 받아서 안전관리가 정부 지침에 따라 관리되고 있어 이의 지침을 따라 철저히 안전조치를 이행하면서 연구를 실시하였다.

□ 기관명 : 한국생명공학연구원

- 기술적 위험요소 분석

- 해당사항 없음

- 안전관리대책

- 연구실 안전점검 정기적 실시: 연구실의 기능 및 안전을 유지 관리하기 위하여 안전점검지침에 따라 연구실에 관한 안전점검을 정기적으로 실시함.

- 참여 연구원의 안전관련 교육훈련 시행: 산업안전보건법 제31조 (안전보건교육) 및 연구실 안전환경조성에 관한 법률 제 18조에 의거, 전 직원에 대한 안전보건교육을 매달 실시함. 교육 방법은 모든 직원에 대한 자체교육(2시간)을 실시하고, 안전보건교육 일지를 작성하여 관리함.

- 연구 내용 및 결과물 안전 확보: 정기적으로 인원 및 시설 보안 항목, 문서보안 항목 그리고 정보보안 항목의 보안점검을 실시하여 연구 내용 및 결과물의 안전을 확보하고 있음. 참여 연구원들을 대상으로 연구 결과의 안전한 관리를 위한 안전교육 실시

- 연구실 안전 확보 계획: 참여 연구원들이 안전관련 각종 법규, 규정 및 지침을 준수하도록 하며, 요구되는 안전교육 및 훈련 실시 실험에 관련된 위험 정보를 숙지하고 적절한 개인 보호 장비 착용 실험실에 노출된 위험을 안전관리책임자에게 보고, 연구실의 잠재되어 있는 위험성 발견 및 위험물질과 각종 실험장비 등 사용에 따른 안전수칙이 잘 이행될 수 있도록 지도점검 및 교육

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	코드번호		D-12		
					논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허	형질전환 벼 세포 배양에서 대체탄소원의 활용 및 세포 재이용 시스템을 통한 재조합 트립신의 대량생산 방법	전북대	교신 저자	대한민국		2016.06.01		
2	특허	구강세균으로부터 유도된 류마티스 관절염 동물모델 및 이의 제조방법	카톨릭 의대	교신 저자	대한민국		2015.09.03		
3	특허 출원	액티빈A 유전자로 형질전환된 식물체 및 이를 이용하여 액티빈 A 단백질을 생산하는 방법	순천 대학교	교신 저자	대한민국		2016.09.20		
4	논문	Arthritic role of <i>Porphyromonas gingivalis</i> in collagen-induced arthritis mice	카톨릭 의대	교신 저자	PLOS one/ USA	2.806	2017.11.30	중복사사	SCI
5	논문	토마토 (<i>Solanum lycopersicum</i>) 과육의 숙성정도에 따른 peptide:N-glycanase 발현 분석	순천 대학교	교신 저자	Journal of Plant Biotechnology/ 대한민국	KCI 논문	2014.09	단독사사	비SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
Alamanos Y, Drosos, AA. 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. <i>Autoimmun Rev</i> 4:130-136.	
Alemann F, Paschinger K, Dalik T, Vorauer K. 1998. Characterisation of peptide-N4-(N-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase A and its N-glycans. <i>Eur. J. Biochem.</i> , 252: 118-123.	
Altmann F, Paschinger K, Dalik T, Vorauer K. 1998. Characterisation of peptide-N4-(N-acetyl-β-glycosaminyl)asparagine amidase A and its N-glycans. <i>Eur J Biochem</i> 252: 118-123.	
Annamalai P, Rao A (2005) Replication-independent expression of genome components and capsid protein of brome mosaic virus in planta: a functional role for viral replicase in RNA packaging. <i>Virology</i> 338(1):96-111	
Bally J, Nadai M, Vitel M, Rolland A, Dumain R, Dubald M (2009) Plant physiological adaptations to the massive foreign protein synthesis occurring in recombinant chloroplasts. <i>Plant physiology</i> 150(3):1474-1481	
Bartold PM, Marino V, Cantley M, Haynes DR. 2010. Effect of Porphyromonas gingivalis-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. <i>Journal of clinical periodontology</i> 37: 405-411.	
Bigbee CL, Gonchoroff DG, Vratsanos G, Nadler SG, Haggerty HG, Flynn JL. 2007. Abatacept treatment does not exacerbate chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. <i>Arthritis & Rheumatism</i> 56: 2557-2565.	
Cañizares MC, Nicholson L, Lomonosoff GP (2005) Use of viral vectors for vaccine production in plants. <i>Immunol Cell Biol</i> 83(3):263-270	
Cantley MD, Haynes DR, Marino V, Bartold PM. 2011. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. <i>Journal of clinical periodontology</i> 38: 532-541.	
Carrion J, Scisci E, Miles B, Sabino GJ, Zeituni AE, Gu Y et al. 2012. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. <i>The Journal of Immunology</i> . 189: 3178- 3187.	
Chen B, Randles JW, Francki R (1995) Mixed-subunit capsids can be assembled in vitro with coat protein subunits from two cucumoviruses. <i>J Gen Virol</i> 76(Pt 4):971-973	
Chen C, Kwak E-S, Stein B, Kao CC, Dragnea B (2005) Packaging of gold particles in viral capsids. <i>J Nanosci Nanotechnol</i> 5(12):2029-2033	

- Chen Q, Davis KR. 2016. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. 5(F1000 Faculty Rev):912 (doi:10.12688/f1000research.8010.1)
- Chen Q, He J, Phoolcharoen W, Mason HS (2011) Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Hum Vaccin* 7(3):331–338
- Chu CC, Wang CS, Sun CC, Hsu C, Yin KC, Chu CY. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 16: 659–668
- Costenbader KH, Karlson, EW. 2006. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can Mercado FB, Marshall RI, Bartold, PM. 2003. Inter–relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol* 30: 761–772.
- De Aquino SG, Abdollahi–Roodsaz S, Koenders MI, van de Loo FA, Pruijn GJ, Marijnissen RJ et al. 2014. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2– and IL–1–driven Th17 response. *J Immunol*; 192: 4103–4111.
- Douglas T, Young M (2006) Viruses: making friends with old foes. *Science* 312(5775):873–875
- El–Awady AR, Miles B, Scisci E, Kurago ZB, Palani CD, Arce RM et al. 2015. *Porphyromonas gingivalis* evasion of autophagy and intracellular killing by human myeloid dendritic cells involves DC–SIGN–TLR2 crosstalk. *PLoS Pathog* 11: e1004647.
- Enersen M, Nakano K, Amano A. 2013. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of oral microbiology* May 6;5.
- Falk B, Tsai J (1986) The two capsid proteins of maize rayado fino virus contain common peptide sequences. *Intervirology* 25(2):111–116
- Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. 2009. Quantifying western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 30: 1845–1855.
- Girbal–Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson–Bessiere C, Jolivet–Reynaud C, Jolivet M, Serre G. 1996. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis–associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro) filaggrin by deimination of arginine residues. *The journal of Immunology* 162: 585–594.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotech* 18:134–141
- Golub L, Payne J, Reinhardt R, Nieman G. 2006. Can systemic diseases co–induce (not just

exacerbate) periodontitis? A hypothetical “two-hit” model. *Journal of Dental Research* 85: 102–105.

Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, Faye L. 2005. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol* 23: 559–565.

Gonzalez SM, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Erickson AR, Johnson PG et al. 2015. Alveolar bone is associated with circulating anti-citrullinated protein antibody (ACPA) in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of periodontology* 86: 222–231.

Gopinath K, Dragnea B, Kao C (2005) Interaction between Brome mosaic virus proteins and RNAs: effects on RNA replication, protein expression, and RNA stability. *J Virol* 79(22):14222–14234 Hammond RW, Hammond J (2010) Maize rayado fino virus capsid proteins assemble into virus-like particles in *Escherichia coli*. *Virus Res* 147(2):208–215

Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA et al. 2011. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell host & microbe* 10: 497–506.

Hamada N, Watanabe K, Sasakawa C, Yoshikawa M, Yoshimura F, Umemoto T. 1994. Construction and characterization of a *fimA* mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity* 62: 1696–1704.

Hanazawa S, Murakami Y, Hirose K, Amano S, Ohmori Y, Higuchi H et al. 1991. *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* fimbriae activate mouse peritoneal macrophages and induce gene expression and production of interleukin-1. *Infection and immunity* 59: 1972–1977.

Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E et al. 2012. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*; 122: 1791–1802

Hassan S, Colgan R, Paul MJ, Atkinson CJ, Sexton AL, van Dolleweerd CJ, Keshavarz-Moore E, Ma JK (2012) Recombinant monoclonal antibody yield in transgenic tobacco plants is affected by the wounding response via an ethylene dependent mechanism. *Transgenic Res* 21(6):1221–1232

Hassan S, Van Dolleweerd CJ, Ioakeimidis F, Keshavarz-Moore E, Ma JKC (2008) Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 6(7):733–748

Hefferon KL. 2012. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology* 433:1–6

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA.

Plant J 6: 271–282

- Hood EE. 2002. From green plants to industrial enzymes. *Enzyme Microb Tech* 30:279–283
- Hossain MA, Nakano R, Nakamura K, Kimura Y. 2010. Molecular identification and characterization of an acidic peptide:N-glycanase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *The Journal of Biochemistry*. 147: 157–165.
- Huang Z, Chen Q, Hjelm B, Arntzen C, Mason H (2009) A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnol Bioeng* 103(4):706–714
- Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H, Piensook K, Cardineau G, Zeitlin L, Whaley KJ, Arntzen CJ, Mason HS, Chen Q (2010) High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng* 106(1):9–17
- Isogai H, Isogai E, Yoshimura F, Suzuki T, Kagota W, Takano K. 1988. Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. *Archives of Oral Biology* 33: 479–485.
- J. A. L. van Kan, M. D. van de Rhee, D. Zuidema, B. J. C. Cornelissen, J. F. Bol. 1989. Structure of tobacco genes encoding thaumatin-like proteins. *Plant Molecular Biology*. 12: 153–155.
- Jansen LM, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma I, van der Stadt RJ, de Koning MH, Dijkmans BA. 2003. The predictive value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in early arthritis. *J Rheumatol* 30: 1691–1695.
- Jeffrey JY, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB et al. 2007. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 109: 3794–3802.
- Joseph R, Rajappan S, Nath SG, Paul BJ. 2013. Association between chronic periodontitis and rheumatoid arthritis: a hospital-based case-control study. *Rheumatology international* 33: 103–109.
- Kadri A, Wege C, Jeske H (2013) In vivo self-assembly of TMV-like particles in yeast and bacteria for nanotechnological applications. *J Virol Methods* 189(2):328–340
- Kao CC, Sivakumaran K (2000) Brome mosaic virus, good for an RNA virologist's basic needs. *Mol Plant Pathol* 1(2):91–97
- Kim BG, Kim SH, Kim NS, Huy NX, Choi, YS, Lee JY, Jang YS, Yang MS, Kim TG. 2014. Production of monoclonal antibody against FimA protein from *Porphyromonas gingivalis* in rice cell suspension culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 118: 293–304.

- Kim TG, Kim BG, Jeong DK, Jang SK, Lee JY, Yang MS. 2012. Production of Monoclonal Antibodies against the FimA Protein of *Porphyromonas gingivalis* in *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 420–426.
- Kim Y, Lee J, Jung H, Yi H, Rim YA, Jung SM, Ju JH. 2015. Development of synthetic anti-cyclic citrullinated peptide antibody and its arthritogenic role. *Clinical & Translational Immunology* 4: e51.
- Koh EM, Kim J, Kim TG, Moon JH, Oh JH, Lee JY et al. 2011. Cloning and characterization of heavy and light chain genes encoding the FimA-specific monoclonal antibodies that inhibit *Porphyromonas gingivalis* adhesion. *Microbiology and immunology* 55:199–210.
- Koh E-M, Kim J, Lee J-Y, Kim T-G. 2009. Production of monoclonal antibodies specific to FimA of *Porphyromonas gingivalis* and their inhibitory activity on bacterial binding. *Immune network* 9: 203–207.
- Koprowski H, Yusibov V (2001) The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19(17):2735–2741
- Korban SS (2002) Targeting and expression of antigenic proteins in transgenic plants for production of edible oral vaccines. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 38(3):231–236
- Koziel J, Mydel P, Potempa J. 2014. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: and updated review. *Curr Rheumatol Rep*; 16: 408
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, *Nature*. 227: 196–685.
- Lee DM, Weinblatt ME. 2001. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358: 903–11.
- Lee SW. 2010. Current status on the development and commercialization of GM plants. *J Plant Biotechnol* 37:305–312
- Lennartsson J, Ronnstrand L. 2012. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* 92: 1619–1649.
- Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, Grausenburger R, Berger P, Metzger D, Macklin WB, Chambon P, Suter U. 2003. Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* 22: 430–440.
- Li CH, Amar S. 2007. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *Journal of periodontology* 78: 1120–1128.
- Lico C, Chen Q, Santi L (2008) Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J Cell Physiol* 216(2):366–377

- Lin J, Bi L, Yu X, Kawai T, Taubman MA, Shen B et al. 2014. *Porphyromonas gingivalis* exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infection and immunity* 82: 4127–4134.
- Ling S, Cline EN, Haug TS, Fox DA, Holoshitz J. 2013. Citrullinated calreticulin potentiates rheumatoid arthritis shared epitope signaling. *Arthritis Rheum*; 65: 618–626.
- Liu J, Tang X, Li C, Pan C, Li Q, Geng F et al. 2015. *Porphyromonas gingivalis* promotes the cell cycle and inflammatory cytokine production in periodontal ligament fibroblasts. *Archives of oral biology* 60: 1153–1161.
- Lu X, Thompson JR, Perry KL (2012) Encapsidation of DNA, a protein and a fluorophore into virus-like particles by the capsid protein of cucumber mosaic virus. *J Gen Virol* 93(Pt 5):1120–1126
- Lucas RW, Larson SB, McPherson A (2002) The crystallographic structure of brome mosaic virus. *J Mol Biol* 317(1):95–108
- Maekawa T, Krauss JL, Abe T, Jotwani R, Triantafilou M, Triantafilou K et al. 2014. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell host & microbe* 15: 768–778.
- Malabadi RB, Chalannavar RK, Meti NT, Gani RS, Vijayakumar S, Mulgund SS, Masti S, Chougale R, Odhav B, Sowmyashree K, Supriya S, Nityasree BR, Divakar MS. 2016. Insulin plant, *Costus speciosus*: ethnobotany and pharmacological updates. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol* 3:151–161
- Malek R, Fisher J, Caleca A, Stinson M, Van Oss C, Lee J et al. 1994. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis* fimA gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. *Journal of bacteriology* 176: 1052–1059.
- Mallory AC, Parks G, Endres MW, Baulcombe D, Bowman LH, Pruss GJ, Vance VB (2002) The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nat Biotechnol* 20(6):622–625
- Manchester M, Singh P (2006) Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Advanced drug delivery reviews* 58(14):1505–1522
- Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J. 2010. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis research & therapy* 12: 209.
- Marchesan JT, Gerow EA, Schaff R, Taut AD, Shin S-Y, Sugai J et al. 2013. *Porphyromonas gingivalis* oral infection exacerbates the development and severity of

collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy* 15: 1–13.

Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, Koziel J et al. 2013. *gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). *PLoS Pathog* 9: e1003627.

Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC, Little JW, Loyola-Rodríguez JP. 2009. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *Journal of clinical periodontology* 36: 1004–1010.

Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhausser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T et al. 2001. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the α - and β -chains of fibrin. *The Journal of Immunology* 166: 4177–4184.

Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjöberg O, Van Vollenhoven R, Klareskog L et al. 2008. Against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis & Rheumatism* 58: 36–45.

McCulloch CA, Bordin S. 1991. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *Journal of periodontal research* 26: 144–154.

McInnes IB, Schett G. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 365: 2205–2219.

Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. 2000. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *Journal of clinical periodontology* 27: 267–272.

Moen K, Brun J, Valen M, Skartveit L, Eribe E, Olsen I et al. 2006. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin Exp Rheumatol* 24: 656–663.

Moen K, Brun JG, Eribe ER, Olsen I, Jonsson R. 2005. Oral bacterial DNAs in synovial fluids of arthritis patients. *Microbial ecology in health and disease* 17: 2–8.

Moon KB, Jeon JH, Lee WS, Kim HS (2012) Transient erythropoietin overexpression with cucumber mosaic virus suppressor 2b in *Nicotiana benthamiana*. *Hort Environ Biotechnol* 53(5):434–440

Mor TS, Moon YS, Palmer KE, Mason HS (2003) Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnol Bioeng* 81(4):430–437

Natilla A, Hammond RW (2011) Maize rayado fino virus virus-like particles expressed in

- tobacco plants: A new platform for cysteine selective bioconjugation peptide display. *J Virol Methods* 178(1):209–215
- Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. 1997. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infection and Immunity* 65: 1980–1984.
- Nuzzaci M, Bochicchio I, De Stradis A, Vitti A, Natilla A, Piazzolla P, Tamburro A (2009) Structural and biological properties of Cucumber mosaic virus particles carrying hepatitis C virus-derived epitopes. *J Virol Methods* 155(2):118–121
- Page, R.C., *Vaccination and periodontitis: myth or reality*. *J Int Acad Periodontol*, 2000. 2(2): Nishikawa K, Duncan MJ. 2000. Histidine kinase-mediated production and autoassembly of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Bacteriol.* 192: 1975–1987.
- Palmer KE, Rybicki EP (1998) The molecular biology of mastreviruses. *Adv Virus Res* 50:183–234
- Pangas SA, Woodruff TK. 2002. Production and purification of recombinant human inhibin and activin. *J. Endocrinol* 172: 199–210.
- Papakonstantinou T1, Harris SJ, Fredericks D, Harrison C, Wallace EM, Hearn MT. 2009. Synthesis, purification and bioactivity of recombinant human activin A expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 64: 131–138.
- Persson GR. 2012. Rheumatoid arthritis and periodontitis inflammatory and infectious connections. Review of the literature. *Journal of oral microbiology*; 4.
- Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gülmez E, Kleber B–M, Bernimoulin J–P et al. 2008. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *Journal of periodontology* 79: 979–986.
- Ramírez P, Bonilla J, Moreno E, León P (1983) Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detection with peroxidase-bound lectins and protein A. *J Immunol Methods* 62(1):15–22
- Rantapaa–Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2741–2749.
- Rosales–Mendoza S, Angulo C, Meza B. 2016. Food–grade organisms as vaccine biofactories and oral delivery vehicles. *Trends Biotechnol* 34:124–136
- Rybicki EP (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol J* 8(5):620–637
- Sack M, Hofbauer A, Fischer R, Stoger E. 2015. The increasing value of plant–made proteins. *Curr Opin Biotech* 32:163–170

- Sanchez-Pernaute O, Filkova M, Gabucio A, Klein M, Maciejewska-Rodrigues H, Ospelt C et al. 2013. Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*; 72: 1400–1406.
- Saunders K, Lomonossoff GP (2013) Exploiting plant virus-derived components to achieve in planta expression and for templates for synthetic biology applications. *New Phytol* 200(1):16–26
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC et al. 2000. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*; 43: 155–163
- Scholthof HB, Scholthof K, Jackson AO (1995) Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* 7(8):1157–1172
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum S, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, Futerman AH, Aviezer D. 2007. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J* 5:579–590
- Shin YJ, Chong YJ, Yang MS, Kwon TH. 2011. Production of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor in rice cell suspension culture with a human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnol J*. 9: 1109–1119.
- Smit M, Westra J, Vissink A, Doornbos-van der Meer B, Brouwer E, van Winkelhoff AJ. 2012. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis Res Ther* 14: R222.
- Stevens LH, Stoopen GM, Elbers IJ, Molthoff JW, Bakker HA, Lommen A, Bosch D, Jordi W (2000) Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 124(1):173–182
- Strasser R, Altmann F, Steinkellner H. 2014. Controlled glycosylation of plant-produced recombinant proteins. *Curr Opin Biothech* 30:95–100
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 19(17):2742–2748
- Streatfield SJ, Lane JR, Brooks CA, Barker DK, Poage ML, Mayor JM, Lamphear BJ, Drees CF, Jilka JM, Hood EE (2003) Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* 21(7):812–815
- Suzuki T, Park H, Lennarz WJ. 2016. Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *The FASEB Journal* 16:

635–641.

- Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, Gibson Iii FC, Genco CA. 2006. Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. *Cellular microbiology* 8: 738–757.
- Tan HY, Ng TW. 2008. Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels. *Optics Communications* 281: 3013–3017.
- Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH. 1985. Deglycosylation of asparagine–linked glycans by peptide:N–glycosidase F. *Biochemistry* 24: 4665–4671.
- Thanavala Y, Huang Z, Mason HS (2006) Plant–derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead. *Expert Rev Vaccines* 5(2):249–260
- Totaro MC, Cattani P, Ria F, Tolusso B, Gremese E, Fedele AL et al. 2013. *Porphyromonas gingivalis* and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. *Arthritis Res Ther*, 15: R66.
- Tran TN, Mishra NS. 2015. Effect of antibiotics on callus regeneration during transformation of IP 64 rice. *Biotechnology Reports* 7: 143–149.
- Tretter V, Almann F, Marz L. 1991. Peptide-N4–(N–acetyl–B–glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached $\alpha 1 \rightarrow 3$ to the asparagine–linked N–acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem* 199: 647–652.
- Tusé D, Tu T, McDonald KA. 2014. Manufacturing economics of plant–made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. *Biomed Res Int*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/256135>
- Twyman RM, Stöger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* 21:570–578
- Ugwu SO, Apte SP. 2004. The effect of buffer on protein conformational stability. *Pharmaceutical Tech* 28: 86–109.
- Van der Heijden IM1, Wilbrink B, Tchetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP et al. 2000. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in the joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.* 43(3):593–8.
- van Kan JAL, van de Rhee MD, Zuidema D, Cornelissen BJC, Bol JF. 1989. Structure of tobacco genes encoding thaumatin–like proteins. *Plant Mol Biol* 12:153–155
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt Walton KL, Makanji Y, Robertson DM, Harrison CA. 2011. The synthesis and secretion of inhibins. *Vitam Horm* 85: 149–184.

- Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB et al. 2003. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 48: 2489–2500.
- Walter C, Zahlten J, Schmeck B, Schaudinn C, Hippenstiel S, Frisch E et al. 2004. *Porphyromonas gingivalis* strain-dependent activation of human endothelial cells. *Infection and immunity* 72: 5910–5918.
- Wang Q, Kaltgrad E, Lin T, Johnson JE, Finn M (2002a) Natural supramolecular building blocks: wild-type cowpea mosaic virus. *Chemistry & biology* 9(7):805–811
- Wang Q, Lin T, Johnson JE, Finn M (2002b) Natural supramolecular building blocks: cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem Biol* 9(7):813–819
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K et al. 2010. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 62: 2662–2672.
- Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infection and Immunity* 65: 313–6
- Werner S, Breus O, Symonenko Y, Marillonnet S, Gleba Y. 2011. High-level recombinant protein expression in transgenic plants by using a double-inducible viral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14061–14066
- Wikoff WR, Tsai CJ, Wang G, Baker TS, Johnson JE (1997) The structure of cucumber mosaic virus: cryoelectron microscopy, X-ray crystallography, and sequence analysis. *Virology* 232(1):91–97
- Wilbers RHP, Westerhof LB, van Raaij DR, van Adrichem M, Prakasa AD, Lozano-Torres JL, Bakker J, Smant G, Schots A. 2016. Co-expression of the protease furin in *Nicotiana benthamiana* leads to efficient processing of latent transforming growth factor-b1 into a biologically active protein. *Plant Biotechnol J*. 14: 1659–1704.
- Wolff B, Berger T, Frese C, Max R, Blank N, Lorenz H-M et al. 2014. Oral status in patients with early rheumatoid arthritis: a prospective, case-control study. *Rheumatology* 53: 526–531.
- Wu Y, Yang H, Shin H-J Expression and self assembly of cowpea chlorotic mottle virus capsid proteins in *Pichia pastoris* and encapsulation of fluorescent myoglobin. In: MRS Proceedings, 2011. vol 1317. Cambridge Univ Press, p 6–14
- Yang DH, Chang AC, Ahn IP, Kim HJ, Kim DH, Lee HY, Suh SC. 2013. Rapid Agrobacterium-mediated genetic rice transformation method using liquid media. *Journal of Plant Biotechnology* 40: 37–42. *Plant J* 33(5):949–956

Yusibov V, Rabindran S, Commandeur U, Twyman RM, Fischer R (2006) The potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs R D* 7(4):203–217

Zaitlin M (2000) Tobacco mosaic virus. *AAB Descr Plant Viruses* 370:1–13

Zeng Q, Wen H, Wen Q, Chen X, Wang Y, Xuan W, Liang J, Wan S (2013) Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials* 34(19):4632–4642

Zhang X, Mason H (2006) Bean Yellow Dwarf Virus replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 93(2):271–279

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품개발사업 (첨단생산기술개발사업) 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품개발사업 (첨단생산기술개발사업)의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.