

발간등록번호

11-1541000-001209-01

보안과제(), 일반과제(○)

식물-유래 TGEV/PEDV 항원을 이용한 돼지 설사병 백신의 개발

Development of edible vaccine against porcine diarrhea
using plant-derived TGEV/PEDV antigen

한국생명공학연구원

농림수산식품자료실



0004575

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물-유래 TGEV/PEDV 항원을 이용한 돼지 설사병 백신의 개발”의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 29일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 현 순

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 태 금

협동연구기관명 : 국립축산과학원

협동연구책임자 : 허 태 영

요 약 문

I. 제 목

식물-유래 TGEV/PEDV 항원을 이용한 돼지 설사병 백신의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 돼지설사병에 대한 식물-백신 상용화 가능성을 제시하기 위한 것으로, 개발되어 있는 TGEV 및 PEDV 항원단백질을 발현하는 식물체를 목적동물 돼지에 적용하는 단계를 진행한다. 그 결과로 형질전환 식물을 이용한 식물-유래 백신의 유용성을 확인하고 돼지설사병에 대한 백신을 개발함으로써 작물 재배 농가의 소득 향상에 도움이 되고 또한 저가의 백신 공급을 통해 가축을 기르는 축산농가에 경제적인 혜택을 주고자 하는 목표를 가진다.

III. 연구개발 내용 및 범위

① TGEV 및 PEDV 항원 단백질을 발현하는 형질전환 식물체 대량생산

- TGEV spike protein 전체 중 antigenic site A와 D epitope를 발현하도록 설계된 유전자 발현 벡터에 의해 형질전환된 감자 식물체의 선별한다
- 분자분석방법에 의해 최종 선발된 감자 식물체를 기내배양과 온실재배를 통하여 대량으로 확보하여 마우스 실험과 목적동물 돼지의 실험을 위한 시료로 공급한다
- 본 연구에서는 PEDV epitope 유전자와 점막면역체계에 항원단백질의 효용을 높이기 위하여 LTB와 융합된 융합항원유전자를 발현하는 식물체를 대량으로 확보한다. 선발된 식물체에서 융합항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 genomic DNA PCR, western blot 분석과 ELISA를 시행하여 확인한다.

② 마우스 실험동물을 이용한 식물-유래 항원 단백질의 면역원성 평가-항체 유도 효과 검증을 통한 백신으로의 개발

- 마우스 실험동물 시험을 통하여 항원-항체 면역 반응 유도; IgG 및 IgA 항체 분석
- 면역력 증대를 위한 경구 투여 형태 연구; TGEV 단독과 PEDV+LTB 융합항원단백질을 발현하는 식물체를 수확하여 동결건조를 시킨 후에 분말 형태로 만든 후에 buffer로 단백질을 추출하여 수용성 단백질만을 사용하여 동물에 경구적인 방법으로 투여

③ 목적동물(돼지) 실험을 통한 식물-백신의 효능 검증

- 형질전환 식물체-유래 TGEV/PEDV 항원의 백신에 따른 항체 형성능 분석
- 형질전환 식물체를 이용한 백신 적용에 따른 돼지의 안전성 평가 (생존 및 몸무게 변화 추이를 관찰)
- TGE/PED 바이러스 공격접종 후 생존능 및 면역 반응 시험

IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) spike protein 전체 중 antigenic site A와 D epitope을 발현하도록 설계된 식물발현벡터에 의해 형질전환된 감자식물체 P0.7-2를 분자분석

방법에 의해 최종선발하였다. 마우스 및 돼지 실험을 위한 시료 확보는 감자식물체의 기내대량 배양과 온실재배를 통하여 수행하였다. 감자의 기내소괴경은 동물실험을 위한 직접적인 시료 확보 뿐만 아니라 대량의 온실재배를 위한 씨감자 확보라는 측면에서 매우 중요하다. 먼저 세력 왕성한 기내줄기 확보를 위하여 MS기본배지에 특수vitamins가 함유된 배지에서 P0.7-2 개체의 줄기를 대량배양하였다. 이 후 기내소괴경 형성용 배지와 환경으로 계대배양하여 우량의 기내소괴경을 확보하였다. 실험에 사용하고자 하는 감자가 형질전환된 LMO 작물임을 고려하여 제한된 온실내에서 감자 튜버를 대량으로 확보하여야 하는데, 대량으로 확보된 기내소괴경을 씨감자로 사용하여 외부 환경과의 차단이 가능한 유리온실 및 비닐온실에서 포트재배를 통하여 이루어졌다.

- 돼지유행성 설사병을 일으키는 porcine reproductive diarrhea virus (PEDV)의 항원단백질을 포함하고 또한 점막면역체계에서 면역반응의 효율을 높이는 것으로 알려진 ligand인 LTB와 융합된 융합항원단백질(LTB-COE)을 생산하는 식물체를 확보하였으며, 온실내 대량재배를 통하여 동물실험 시료를 확보하였다. 동물실험을 시행하기 위한 시료 확보 및 확보된 시료에서 발현된 융합항원단백질을 재검증하기 위하여 형질전환된 식물체의 종자를 선발마커인 가나마이신이 첨가된 MSO 배지에 선발된 형질전환체를 온실에서 화분에 재배하여 완전히 자란 식물체의 잎을 채취하여 융합항원단백질의 발현과 기능을 가지고 있는지 확인하고 발현된 융합항원단백질의 발현량을 최종 확인하였다.

- 마우스 실험동물을 이용한 식물-유래 항원 단백질의 항체 유도 효과 검증을 통한 백신으로의 개발하기 위한 연구에서 1주일 간격으로 3회 연속 투여와 부스팅을 통한 경구면역실험에서 TGEV 특이적인 IgG와 IgA 항체 형성을 확인하였다. 또한 경구투여를 용이하게 하기 위하여 식물-유래 TGEV 항원 단백질의 가공 형태 파악한 결과 동결건조후 TSP추출액을 농축시켜 투여하는 것이 가장 좋았다. 아췌번트의 효과를 확인하였으며, 식물-항원에 의한 부스팅 효과는 기대치 이하였다. 정량화를 위한 가공방법 및 제제화 방법으로는 모든 감자 시료를 동일하게 분말화한 다음 일정한 무게로 나누는 다음 pellet화 하거나 TSP를 추출하여 동일 분량으로 나누는 법이 좋을 것이라고 보았다.

- LTB+COE 융합항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능을 알아보기 위하여 실험동물은 쥐로 하며, 각 실험군은 대조군과 실험군으로 나누어 시행하고 융합항원단백질을 경구적인 방법으로 투여하여 면역화된 쥐로부터 혈액과 분변을 채취하여 투여한 각각의 항원단백질에 대한 면역반응이 효율적으로 유도되었는지 확인하였다. IgG와 IgA 항체가 형성됨을 확인하였다.

- 목적동물(돼지)에서 항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능을 확인하고 실질적으로 목적동물인 돼지에서도 효율적인 면역반응을 유도할 수 있는지 확인하였다. PEDV 및 TGEV 항원 발현 식물체에서 분리한 항원 또는 식물체를 임신한 모돈에 경구 투여한다. 모돈에서 생산된 1-2주령 포유자돈에 대해 PEDV 및 TGEV를 공격접종을 실시하였다. 설사 증상의 정도와 체중 변화에 대한 임상증상의 결과는 형질전환식물-유래 경구백신을 처리한 모돈의 초유를 섭취한 자돈은 상용백신 처리구와 같이 PEDV에 방어력을 가지는 것으로 판단되어진다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통하여 축적된 기술은 경구백신의 장점을 살리고 식용식물자원을 신약의 수준까지 개발하는 infra 구축에 한 몫 할 수 있을 것이다. 타 연구에서 개발된 식물체를 활용하였기 때문에 단해

년이지만 식물재료의 대량생산이 가능하였으며, 이를 이용한 마우스 동물실험에서의 결과는 유의성있게 얻을 수 있었다. 동물 실험에서 면역반응 유도 및 기타 긍정적인 효과를 얻음으로써 충분한 응용 가능성에 대한 밑그림이 그려질 수 있었다고 판단하며 이는 앞으로의 유사한 연구에 중요한 참고가 될 것이다 반면, 목적동물인 돼지의 면역유도 실험의 올해 처음 수행되었기 때문에 완벽한 결과는 확보하지 못하였다. 하지만 PEDV발현 담배의 경구투여에 의한 돼지의 면역실험에서 설사 정도가 경감되었고, 체중변화가 미미하는 등의 임상증상에서 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 본 연구의 성과는 반드시 차후의 추가연구와 타연구에 활용하는 방안을 마련하여야 할 것이다. 식물백신과 같은 첨단 생명공학기술을 통한 복지 향상이라는 명제는 21세기 지구상에서 가장 중요한 이슈가 될 것이 틀림없으며 따라서 이 분야에 대한 공공 및 산업계에서의 기술 수요는 많을 것으로 예상된다.

SUMMARY

(영문요약문)

An alternative vaccine, developed from plant-derived antigens of transgenic plants, is considered to be a good candidate for the next generation of vaccines. A plant-derived vaccine could be orally administered by consumption of the antigen-transformed plant product, ultimately inducing an immune response in the recipient. Diarrhea is considered as one of the most devastating diseases in the swine industry worldwide. Developing a safer and effective vaccine against TGEV and PEDV infection is necessary. Transgenic potato plants were generated expressing the spike (S) protein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV), containing the major antigenic sites of the protein. The TGEV gene was under control of the tuber-specific patatin promoter. The DNA integration and mRNA level of TGEV gene were confirmed in transgenic plants by genomic DNA PCR and Northern blot analysis, respectively. Expression of recombinant antigen was observed in most transgenic potato plants by ELISA using specific anti-TGEV antibody. Extracts from potato tubers expressing S protein were administered orally to mice, and the vaccinated mice developed serum IgG and fecal IgA specific for TGEV. The pentameric B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LTB) was fused with a synthetic neutralizing epitope gene of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) (LTB-COE), and the LTB-COE fusion gene was introduced into a plant expression vector under the control of the ubiquitin promoter. This plant expression vector was transformed into tobacco using the *Agrobacterium*-mediated transformation method. Stable integration and transcriptional expression of the LTB-COE fusion gene was confirmed using genomic DNA PCR analysis and northern blot analysis, respectively. The results of western blot analysis with anti-LTB and anti-COE antibody showed the synthesis and assembly of LTB-COE fusion protein. Transgenic tobacco successfully expressing LTB-COE fusion was tested to induce efficient immune responses against porcine epidemic diarrhea virus infection by administration with raw material in mice. Pigs were given orally three consecutive doses of equal concentration of recombinant TGEV S protein or LTB-COE protein at a weekly interval. Piglets were challenged with PEDV CNU-1 at 1 week after birth. Vaccinated piglets decreased diarrhea compare than non-vaccinated piglets.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	8
Chapter 2. Present status of related R&D in domestic and foreign countries	11
Chapter 3. Contents and results of the research	14
Chapter 4. Degree of achievement against research goal and impact on other research areas	83
Chapter 5. Plan for utilization of results of the research	86
Chapter 6. Information of science and technology of foreign countries	87
Chapter 7. References	88

목 차

제1장 연구개발과제의 개요 (연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술)	8
제2장 국내외 기술개발 현황 (국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술)	11
제3장 연구개발수행 내용 및 결과 (이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술)	14
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 (연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술)	83
제5장 연구개발결과의 활용계획 (추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술) *연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함	86
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	87
제7장 참고문헌 (보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거)	88

제 1 장 연구개발과제의 개요

(* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술)

최근 들어 분자유종 기술을 통해 우수형질을 가진 작물을 개발하는 1세대 식물 생명공학과 함께 식물을 이용해 고부가가치의 의료용, 산업용 소재를 개발하고 생산하고자 하는 2세대 식물 생명공학이 주목을 받고 있다. 2세대 식물 생명공학은 고부가가치 유용단백질을 식물 생산 공장을 이용하여 생산하는 molecular farming 분야, 식물체를 특정질병에 대한 백신으로 활용할 수 있는 식물백신 분야, 식물체를 이용하여 대기, 토양, 수질오염물질을 제거할 수 있는 환경정화 분야 등의 연구개발 및 산업화에 다양하게 응용된다. 이러한 연구 분야 중에서도 지난 20여 년간 많은 관심과 기대를 모으며 연구 흐름을 주도한 분야는 식물-유래 백신 개발 분야라고 볼 수 있다. 경구용 식물 백신 (plant derived oral vaccine)은 병원체의 항원유전자를 식물에 도입시켜 항원단백질을 합성하는 식물체를 만들어 경구로 투여하고자 하는 기술로서, 1980년대 중반 처음 아이디어가 제시된 후 1990년 Cutiss 와 Cardineau 에 의해 처음 시도되어 현재까지 많은 연구가 진행되고 있는 분야이다. 식물을 생산-기반으로 하는 백신은 ① 사람이나 동물의 병원체를 가지지 않는 시스템에서 항원단백질만을 목표로 발현하므로 안정성 확보가 가능하고, ② 식품의 섭취를 통해 처치되므로 백신의 투여에 고통이 따르지 않고 기존 사용 백신에 비하여 거부감이 없으며, ③ 농업체계를 활용한 대량생산으로 백신 생산비용이 저렴하고, ④ 백신의 보관에 cold-chain을 요구하지 않는 등 많은 장점을 가지고 있다. 더욱이, 식물유래 경구백신은 소화관, 호흡기, 비뇨생식 기관의 점막표면을 통해 전달되는데, 이곳은 동물 병원균의 주요 침입구로 백신을 섭취할 경우 면역글로블린 A (IgA)를 생성하여 점막 세포 표면의 수용체에 병원균의 결합을 억제하는 점막 면역 반응 (mucosal immune response)에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다. 또한, 식물경구백신은 항원이 과실이나 곡류와 같은 식용 부분에 발현하기 때문에 식물 세포벽이 백신 항원을 충분히 보호하여 항원이 손상되지 않고 면역원의 상태로 장 관련 림프조직에 도달할 수 있게 한다 (Carter and Langridge 2002).

식물을 이용한 백신생산은 비교적 적은 비용으로 대규모 생산이 가능하고, 수확에서 공정까지 기존 시설을 이용할 수 있다. 분자농업을 위한 초기 비용이 세포배양보다 훨씬 적게 들 뿐만 아니라 공기 중의 탄소원과 태양에너지를 근원적인 에너지원으로 사용하기 때문에 생산단가가 절대적으로 저렴하며, 전문배양기술자도 필요로 하지 않는다. 사실 생산비용을 제외하고서도 백신 단백질 생산과 관련된 비용의 85% 이상이 생산단계보다도 오히려 추출하고 공정하는 생산 이후의 과정에서 소요된다. 그러나 백신 단백질의 생산주체로서 식물을 이용하면 이들 과정을 거치지 않아도 된다. 따라서 동물세포를 이용하는 것의 0.1%의 비용으로 백신생산이 가능하다. 일반적으로 사용되고 있는 백신은 약독화되거나 불화된 병원체로서 접종 후 국소 또는 전신적인 부작용이 가끔 발생하고 있다. 열에 약하기 때문에 저온 보관에 따른 부수적인 경제적 부담과 백신으로 사용된 병원체가 변형을 일으켜 강한 독성과 감염성을 갖게 될 우려도 있고, 접종을 위해 전문인이 필요한 단점들이 있다. 이에 비하여 식물체를 이용한 식품 백신 생산은 대량생산이 가능하고 백신 보존의 안전성이 있으며, 한번에 대상 다수에 대하여 예방접종이 가능하다. 또한, 많은 병원균이 기관지, 장, 생식기 점막을 통하는 감염 경로를 가지는데 식품 백신은 경구 투여하기 때문에 점막면역과 전체적인 면역반응을 증가시키기 용이하고, 불화된 바이러스가 독성을 회복하는 것과 같은 위험이 전혀 없다는 장점이 있다.

지금까지는 단일 항원을 식물체 발현 벡터에 도입하여 단일-특이 항체를 유도하는 연구가 주로 이루어진 반면 최근에는 질병에 대한 다중 항체 유도를 위해 복합 항원을 단일 프로모터에 의해 연결하여 발현시키는 시스템이 연구되고 있다. 또한, 초기의 식물 백신 연구에서는 담배를 모델시스템으로 이용하였으나 실질적인 상용화를 위하여 감자를 비롯한 토마토, 당근, 시금치, 알팔파 등 식용이 가능한 식물에 대하여 연구가 진행되고 있다. 특히 식물-유래 경구백신의 경우 의료 후진국인 개발도상국에서 그 가치를 더 높게 평가 받을 수 있으며 이 때 각 국가의 여건에 맞는 바나나와 같은 현지 재배 가능한 식물체의 활용 시도도 이루어지고 있다. 하지만 식물체 개발에 이는 실험동물 효능 실험 이후 많은 연구들이 담보 상태에 머물러 있으며 임상을 비롯한 목적동물 실험에 나아가지 못하고 있는 실정들이다.

그 원인으로는 외래 유전자의 발현 수준이 낮은 점이다(Doran 2006). 이러한 낮은 발현 수준을 극복하기 위하여 많은 노력과 시도가 이루어지고 있는데 도입하고자 하는 유전자의 codon을 식물에서 많이 이용되고 있는 codon으로의 치환에 의한 유전자의 최적화 (Mason et al. 1998; Kang et al. 2004), 유전자의 안정성에 영향을 미치는 요소 제거 (De Jaeger et al. 2002; Ibrahim et al. 2001; Outchkourov et al. 2003), 강력한 프로모터 및 발현 시스템의 개발 등이 있다. 또한 엽록체 형질전환(Daniell et al., 2005), viral vector 시스템을 이용한 고발현(Gleba et al. 2007), 저장 액포에 targeting을 통한 고축적 등이 수행되고 있다.

또한 식물의 생장 조건과 채집하는 식물체의 부위와 시기에 따라 발현 단백질량이 다를 수 있으므로 이에 따른 문제점이 지적되고 있다. 즉, 면역성을 유도할 수 없는 양의 형질전환 식물을 계속 섭취할 때 항원 단백질을 자신의 단백질로 인식하게 되어 실제로 병원이 공격했을 때 감염될 수밖에 없는 상황까지도 가능하다는 지적이다. 또한, 경구 투여는 목적 대상의 신체조건에 따라서 그 섭취량을 달리해야 하기 때문에 표준화하기가 어렵다는 지적도 있다. 이와 같은 문제를 극복하기 위하여 백신생산 식물을 모아서 분쇄한 다음 균일화시키고 생물검정에 의하여 투여량을 적시하는 방법, 초기 면역반응이 유도된 동물이나 인체에 면역반응 유도증가를 위한 경구백신으로 사용하는 방법 등 여러 가지 방법이 고려되고 있다. 비록 초기에 고려되지 않은 문제점이 돌출되고 있지만, 다방면의 연구에 의하여 머지 않은 미래에 식물 백신이 현실화되리라 전망된다.

본 연구에서 직접적으로 언급하고 있는 식물-유래 경구용 돼지 설사병 백신 개발은 생산성이 질병에 따른 피해의 정도에 의하여 크게 좌우되며, 따라서 질병의 예방이 산업의 생산성과 직결되는 축산업에서 중요한 위치를 차지한다고 본다. 양돈산업 경쟁력에 타격을 주는 많은 질병 중 경구백신 적용에 의하여 큰 효과를 볼 수 있는 것은 점막과 관련이 높은 설사병을 들 수 있다. 돼지의 경우 대부분 복합감염에 의한 피해가 많아 직접적인 산출은 어렵지만 설사병에 의한 양돈산업의 피해액은 연간 수백억원에 달하는 것으로 알려져 있다. 설사병의 경우 PED 생독백신, TGE 생독백신과 같은 단독 백신 뿐만 아니라 T-P혼합백신도 개발되어 시장에서 유통되고 있다. 그러나, 돼지 백신의 경우 백신 접종에 따른 스트레스로 인한 성장지연 문제 해결의 필요성, 접종에 소요되는 경제적 부담의 경감 필요 등을 이유로 대체백신의 개발이 매우 높은 당면성을 가진다. 가축백신의 경우 GMO의 접근이 보다 용이한 면도 본 연구의 진행 가능성을 높여준다고 본다. 즉, 이미 대부분의 수입용 사료들이 GMO인 점을 감안한다면 가축백신에서 GMO 식물 투여에 따른 많은 위해성 추가 검사에 대한 부담은 줄어들 것이라고 보여진다. 따라서 본 연구 보고서를 통하여 식물-유래 백신의 경구투여에 의한 질병 면역반응 유도 여부

를 파악하여 현장 적용 가능한 기술로의 개발 가능성을 알아보았다.

본 연구는 돼지 설사병 예방을 위한 차세대 백신 개발의 일환으로 두 종류의 원인균인 TGEV와 PEDV 항원 단백질을 발현하는 식물체를 이용하여 목적동물 돼지에서의 면역 시험을 수행하고, 그 결과를 통하여 경구백신으로서의 유용성을 최종 확인하는 것으로 한다. 이를 위하여 TGEV 및 PEDV 항원 단백질을 발현하는 형질전환 식물체를 대량생산하고, 마우스 실험동물을 이용한 식물-유래 항원 단백질의 면역원성 평가-항체 유도 효과 검증을 통한 백신으로의 가능성을 알아본다. 끝으로, 목적동물(돼지) 실험을 통한 식물-백신의 효능 검증하는 단계로서 형질전환 식물체의 TGE/PED 단독 투여에 의한 항체 형성능 분석, 형질전환 식물체를 이용한 백신 적용에 따른 돼지의 안전성 평가 (생존 및 몸무게 변화 추이) 및 TGE/PED 바이러스 공격접종 후 생존능 및 면역 반응 시험을 수행하여 그 결과를 보고한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

(* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술)

분자농업은 1980년대 후반, 1990년대 초반에 그 연구 기초를 마련하였다. 인간 성장 호르몬과 인터페론을 성공적으로 식물에서 발현시킴으로서 재조합 의약품에 대한 생산 시스템으로서 식물의 이용 가능성을 최초로 제시하였고 (Barta et al. 1986; De Zoeten et al. 1989), 담배의 잎에서 항체를 발현시킴으로서 식물에서 복잡한 형태의 치료용 동물단백질을 생산할 수 있다는 가능성이 제시되었다 (Hiatt et al. 1989). 1990년 초기의 연구들은 주로 식물체에서 항원단백질의 발현에 주력한 것으로, 1992년 B형 간염 바이러스 표면항원을 감자에 발현한 것을 처음 보고한 이후로 (Mason et al., 1992) 지금까지 (2003년 기준) 약 45여 종의 항원이 식물체에 도입되어졌다. 이 후, 후반기 연구들은 식물체내 발현을 향상을 위한 연구들이 주를 이룬 것으로, Arakawa연구팀의 감자에서의 CTB-NSP4의 발현 (1997, 1998), 2001년 Daniell연구팀의 엽록체 형질전환을 이용한 CTB의 발현, 2001년 Kong연구팀의 HBsAg의 발현 증대 (PNAS), 2005년 Daniel연구팀의 Chloroplast-derived 백신 생산(Vaccine), 2005년 Pogrebnyak연구팀의 SARS에 대한 식물백신 개발 (PNAS), 2006년 Santi연구팀의 deconstructed virus-based system (Icon vector system)을 이용한 plaque antigen의 발현 향상(PNAS) 등이 큰 흐름을 이루어왔다. 20mg/kg Tobacco 정도의 수준으로 Botulinum neurotoxins scFv 생산을 보였으며 (Vaccine, 2006), Anthrax protective antigen을 총가용단백질의 14.2% 정도 수준으로 발현시킨 결과도 발표하였다 (Daniell et al., 2005). 발현을 향상을 위해 보고된 주된 시스템은 크게 핵 형질전환 시스템, 엽록체 형질전환 시스템, 그리고 식물-바이러스 활용 시스템으로 나눌 수 있으며, 2005년 Daniell 등에 의해 보고된 Bacillus thuringiensis cry2Aa2 단백질이 엽록체 형질전환에 의해 무려 총 엽단백질의 46.1% 발현되었으며, 더 나아가 Gleba 등 (2005년)은 'Maginfection'이라는 방법에 의해 총가용단백질의 80%의 발현율을 보고한 바 있다.

이들 외에도 Sandhu 등은 유아에게 가장 치명적인 respiratory syncytial virus (RSV)의 F-단백질 부분을 식물체 발현백터에 접합시켜 토마토에 형질전환시킨 후 (Transgenic Res. 2000) 성숙한 토마토를 쥐에 투여한 결과 이 바이러스에 대한 항체가 형성되고 뚜렷한 면역효과가 있었음을 보고하였다. Tuboly 등도 어린 돼지의 치명적인 설사병인 Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)의 spike 단백질을 담배에 도입하여 항체형성 실험을 수행한 결과 TGEV-S에 특이적인 면역반응이 성공적으로 유도됨을 보고하였다 (Vaccine, 2000). 많은 감염성 질병에 대한 재조합 백신 개발과는 달리 Youm 등은 인간의 치매 질환을 타겟으로 하는 베타아밀로이드 발현 형질전환 감자를 개발하여 항체 형성 가능성을 동물실험에서 보고한 바 있다 (FEBS letters, 2005). 감염성 질환을 벗어난 또 다른 대표적인 질환으로 암을 들 수 있다. Mason 그룹 (J. of Virology, 2003)과 독일의 Martin Muller 그룹 (J. of Virology, 2003)은 여성들에게서 빈발하는 자궁경부암 원인 유전자인 파필로마 바이러스 (human papilloma virus) 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 각각 개발하였다. 이 기술은 이미 국내 연구진 Sohn 등에 의해 먼저 시도되어 졌으며, 이 유전자가 도입된 형질전환 식물체 개발 기술에 대한 국내 뿐만 아니라 미국등의 특허까지 받은 상태로 알려져 있다. 자궁경부암 예방용 식물백신 연구는 최근 FDA 승인을 받아 전 세계적으로 관심을 받고 있는 자궁경부암 백신의 개발과

때를 같이 하여 앞으로 유망한 아이템이 될 것으로 보인다.

최근의 연구는 경구투여에 의한 면역 유도기전에 관한 연구 및 임상시험이 주를 이루고 있다. 대표적인 연구 결과로 Yang 팀에 의해 PEDV spike 단백질을 담배에 발현시켜 neutralization 효과와 systemic & mucosal 면역반응을 검사 (Vaccine, 2005), Matoba연구팀의 HIV-1 transcytosis를 차단하는 항체를 만들어 내는 백신 후보물질에 대한 점막면역 (Vaccine, 2006), Companien연구팀의 경구투여에 따른 humoral immune response (Fish&Shellfish Immuno. 2006) 등을 들 수 있다. 캐나다 과학자들이 GM식물을 이용하여 구제역 백신을 개발하는데 한 걸음 다가갔다. 구제역바이러스 coat protein VP1을 인식하는 siingle chain variable antibody fragment (scFv) 유전자를 담배식물체에서 대량으로 축적하는 시스템을 개발하여 잎이 생산하는 수용성 단백질 대비 약 0.8%까지 축적하였다. 구제역은 해당국가의 축산 농가뿐만 아니라 사회 전반의 경제에 심각한 영향을 주는데 값싼 재조합 항체를 이용한 예방주사로 면역력을 높이는 것은 구제역 발생지점의 주변지역 동물들을 보호하기 위한 합리적인 대안이 될 수 있음을 주장한 바 있다 (Current issue of transgenic research). 멕시코 국립자치대학 연구원들은 식물체 내에 상당량의 광견병 바이러스 당단백질을 축적하는 GM당근을 개발했다. 광견병은 백신이 개발되어 있음에도 불구하고 전 세계적으로 특히 개발도상국들에서 지속적으로 보건상의 문제가 되어오고 있다. 연구원들은 식용식물에서 생산되는 백신이 기존 백신을 대신할 수 있는 좋은 대안이 될 것으로 전망하였다.

이와 같은 식물-유래 백신의 경우 중치 예방을 위한 분비형 항체 백신이 유럽연합에서, 닭의 Newcastle 병 예방을 위한 백신이 USDA에서 승인 받았고 B형 간염백신 예방을 위한 식물경구 백신이 쿠바 시장에 나온 것으로 보고되어 있다. 이외에도 많은 재조합 의약품들이 개발되어 임상 실험 중에 있으며 현재로서 가장 앞선 단계를 진행하고 있는 것은 이스라엘의 Protalix사가 당근 현탁세포 배양을 이용하여 생산하는 Gaucher병 치료제인 Glucocerebrosidase로써 판매권을 가진 대형 제약회사인 Pfizer가 6천만불에 계약한 사실은 곧 본 제품이 시장에 출현 할 것으로 기대하는 증거가 된다. Vainstein박사 (히브리대학의 기술이 전회사인 Yissum 연구개발회사)는 항말라리아 천연물질인 artemisinin 생산에 필요한 생합성 경로 전체를 코딩하고 있는 형질전환 담배를 보고하였다. 이 기술은 담배식물체를 이용해 저렴한 가격의 artemisinin을 생산할 수 있으며 이는 말라리아로 고통받고 있는 개발도상국의 큰 도움을 줄 것으로 기대되고 있다.

현재 국내에서도 식물 경구백신에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 인간 질병에 대한 식물 경구백신보다는 비교적 용이하고 기간이 짧게 소요되는 동물 질병에 집중하는 경향이 있다. 농촌진흥청 김종범 박사팀은 돼지열병(돼지콜레라) 바이러스의 외피단백질 유전자를 사료 작물인 알파파에 형질전환하여 그 식물체를 먹인 돼지에 바이러스를 주사로 접종한 결과 돼지 콜레라가 발병하지 않았다고 밝혔다. 또한 전북대학교 양문식 교수팀은 돼지 바이러스성 설사병(Porcine Epidemic Diarrhea Virus), 돼지 흉막 폐렴균인 *Actinobacillus pleuropneumiae*, cholera toxin B subunit 등 다양한 항원단백질에 대한 식물 경구백신 개발을 진행하고 있다. 특히, 돼지설사병 및 흉막폐렴균에 대한 연구에서는 실험동물 및 목적동물에서 효능이 검증되었음을 보고하였다 (Bae et al. 2003; Kim et al. 2010). 전주생물소재연구소 권태호 박사팀은 돼지 콜레라 바이러스 항원유전자를 이용하여 식물 경구백신을 개발하는 연구를 진행하고 있으며, 단국대학교 황철호 교수팀은 돼지 설사병원균(돼지 대장균 2종과 살모넬라 1종)에서 특이 유전자의 단백질을 생산하는 당근세포를 대량생산하여 당근을 먹인 돼지의 자돈에서 면역

효과가 있음을 확인하였다. 또한 배재대학교 최창원 교수팀은 개 파보바이러스(Canine parvovirus)에 대한 항원단백질을 생산하는 식물을 개발하였고, 이를 이용한 식물경구백신에 대한 연구를 하고 있다. (주)젠다스의 정화지 박사팀은 능성어류에 감염하는 노다바이러스의 항원단백질을 이용한 식물 경구백신에 대한 연구를 수행하고 있다 (Kim et al., 2010).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

(* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술)

제 1 절 TGEV 항원 단백질을 발현하는 형질전환 식물체 대량생산 및 면역 반응 검증 (제 1 세부과제-한국생명공학연구원)

1. 항원 유전자 발현 벡터

돼지 설사병은 폐사율이 아주 높을 뿐만 아니라 일단 감염되었다가 회복된 자돈의 성장률이 떨어지고 여타 질병에 대한 감수성이 높아지는 등 양돈 산업에 있어 생산성 저해에 가장 중요한 요인의 하나로 작용한다. 이러한 바이러스성 설사병의 주요 원인으로서는 전염성 위장염의 원인균인 Transmissible Gastroenteritis Coronavirus (TGEV)와 돼지 유행성 설사증의 원인균인 Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)로 나눌 수 있다. 돼지 전염성 위장염 (TGE)은 전파력이 매우 높아 폭발적으로 발생하며 2주령 이하의 자돈이 감염되면 심한 구토와 설사를 하게 되며 폐사율이 매우 높다.

TGEV는 coronaviridae에 속하며 단일가닥의 RNA genome을 가진다. Spike, envelope, membrane, 그리고 nucleocapsid 단백질로 구성되어 있다. TGEV spike protein에는 총 4개의 antigenic site가 있고 이들 중 site A와 D가 중요하다고 보고되어졌다 (Arch Virol (1994) 137:55-67) (그림1). 본 연구에서는 유효한 epitope A와 D를 발현하도록 설계된 식물체 벡터를 각각 제작하였다 (그림 2). 700bp의 TGEV 유전자를 cauliflower mosaic virus 의 35S 프로모터에 의하여 발현 유도되는 벡터 M-0.7, 35S double enhancer 프로모터에 의해 발현 유도되는 D-0.7, 그리고 감자의 괴경 특이적인 patatin 단백질의 프로모터인 patatin프로모터에 의해 발현유도되는 P-0.7 벡터를 각기 제작하였다.

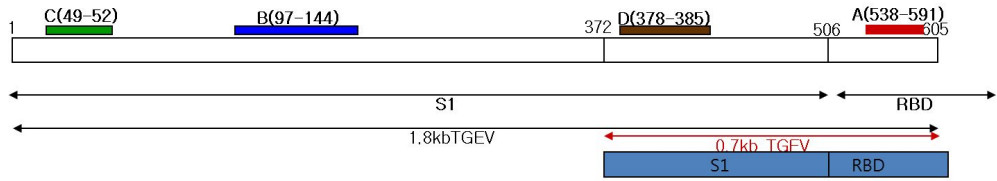
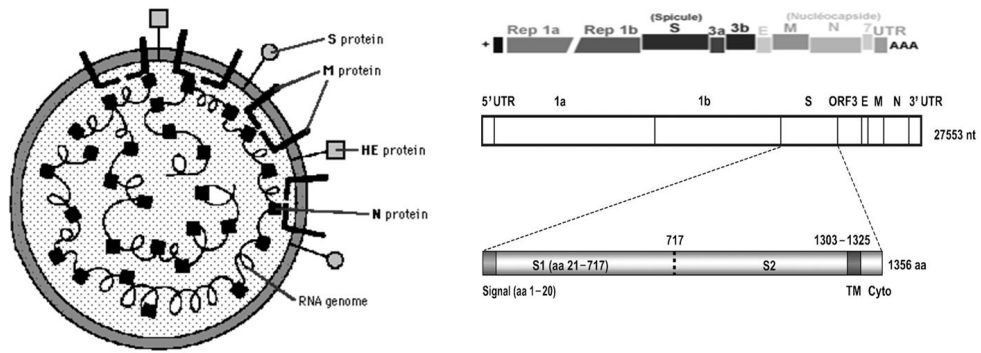
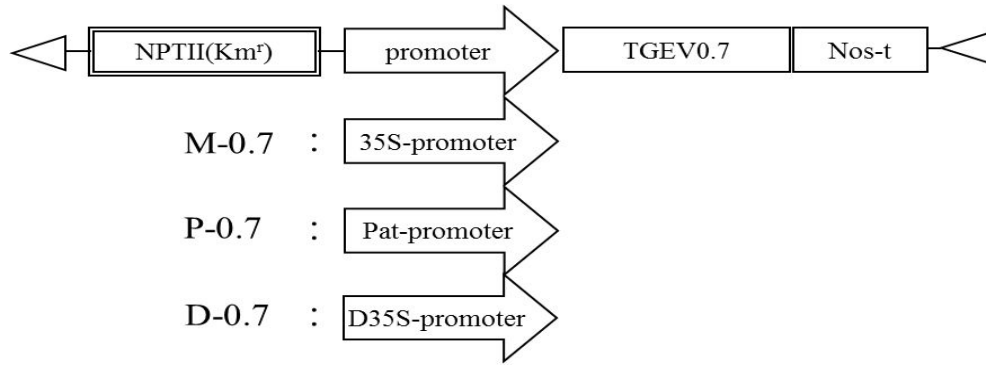


그림. 1 Transmissible Gastroenteritis Coronavirus (TGEV)의 구조 및 genome



NPTII: neomycin phosphotransferase gene cassette
 TGEV0.7: transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein 0.7kb
 M-0.7: CaMV35S promoter, 800bp
 P-0.7: tuber-specific patatin promoter, 900bp
 D-0.7: double 35S promoter, 800bp
 Nos-t: Nos terminator

그림. 2 Plant expression vector containing TGEV0.7 for potato transformation

2. 공시 식물체 재료

감자의 형질전환은 다음과 같은 방법에 의해 수행되었다. 본 실험에 사용한 식물 재료는 기내에서 2주 내지 3주간 생육시킨 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv Desiree)의 잎절편으로서 배양 조건은 Murashige & Skoog (1962)의 3% sucrose 기본배지에 vitamin과 100 mg/L의 myo-inositol을 첨가한 배지를 사용하였다. 기내줄기의 증식을 위해 광도 4000 lux, 16시간 광주기 및 23℃ 항온실에서 배양하였다. 왕성하게 자란 감자의 기내줄기에서 잎을 채취하여 약 1cm²의 넓이로 잎절편을 준비한 뒤, YEP(km) 배지에서 적정 밀도로 자란 (OD600=0.6) *A. tumefaciens* LBA4404와 약 10분간 공동배양 하였다. 공동배양 후 멸균종이에서 건조시킨 후 2,4-D가 2.0 mg/L 첨가된 배지에서 2일간 배양하였다. 이들 절편에서 재분화된 식물체를 얻기 위하여 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA3, 2.0 mg/L Zeatin, 100.0 mg/L kanamycin, 500.0 mg/L carbenicillin이 첨가된 MS 기본배지에서 배양하였다. 약 2~3주 이후부터 항생제가 첨가된 배지에서 녹색을 띠면서 유기되는 어린 싹을 캘러스로부터 분리함으로써 형질전환체를 1차 선별하였다. 이들 식물체의 DNA를 Hong 등 (1993)의 방법으로 분리한 다음 NPTII primer와 TGEV 특이 primer를 사용한 PCR 반응을 실시하였다. Genomic DNA 분석, Northern blot에 의한 RNA 발현 분석 및 항원-항체 반응에 의한 TGEV 특이 단백질 분석 등에 의하여 최종적으로 P0.7-2 독립 개체를 마우스 및 돼지 면역 반응 유도 실험을 위해 선발하였다 (그림 3). 이 때 genomic DNA는 잎과 싹부분에서 1 g을 채취해 CTAB (cethyltrimethyl ammonium bromide) buffer를 이용한 방법 (Doyle & Doyle, 1990)을 변용하여 추출하였다. Total RNA는 감자의 잎과 싹부분을 포함하여 1 g 정도를 채취한 다음 RNagents^R Total RNA Isolation System (Promega co.)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 검출은 Dig-labeled probe를 이용하였다. 단백질 추출은 PBS 버퍼를 사용하였으며 (PBS; pH7.4, 1 mM EDTA, 0.2% β-mercaptoethanol, and protease inhibitor cocktail), NBT/BCIP 검출을 수행하였다. 1:1000 rabbit polyclonal anti-TGEV 항체와 1:5000 HRP-conjugated anti-rabbit IgG 2차 항체를 이용하여 western을 수행하였다.

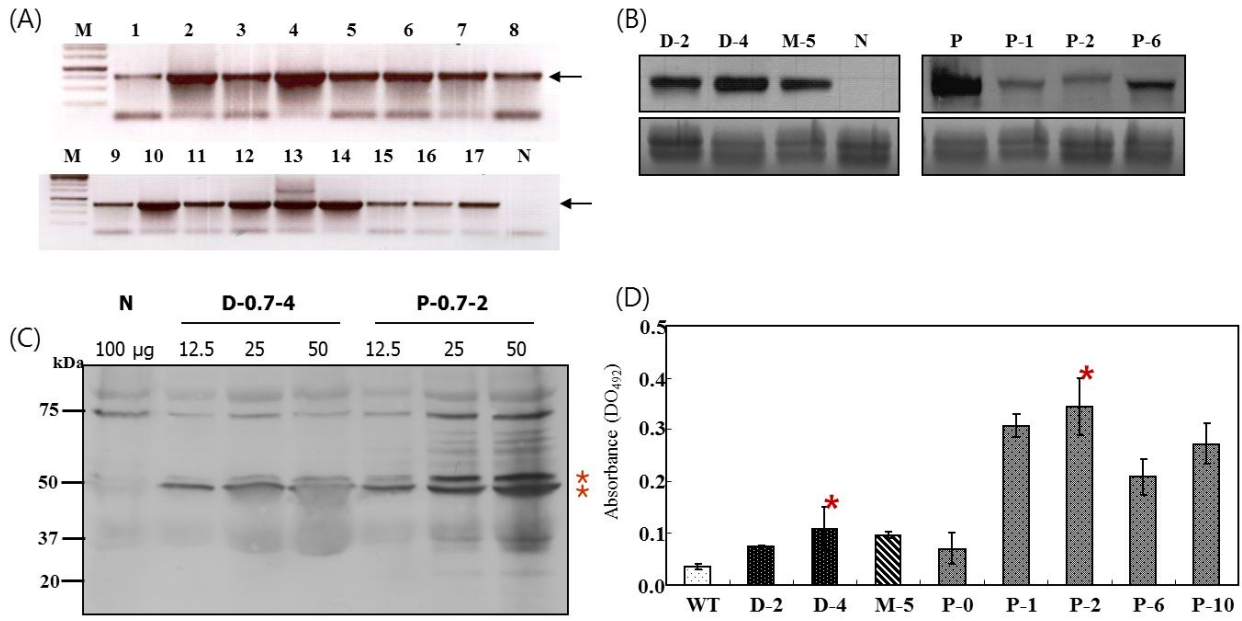


그림. 3 TGEV 발현 식물체 분석. (A) NPTII 유전자의 genomic PCR에 의한 재분화 개체 선별. (B) TGEV0.7 specific transcript 검출을 위한 Northern analysis. (C) TGEV0.7 단백질 검출을 위한 western blot analysis. (D) TGEV 단백질의 정성 및 정량 분석을 위한 ELISA

3. 공시 감자식물체의 대량생산

감자 줄기의 기내 대량배양법 및 microtuber의 기내 대량배양법 적용에 따라 실험시료를 대량생산하였다. 그 구체적인 수행방법은 다음과 같다.

(1) 최종적으로 선발한 P0.7-2 개체의 급속 대량증식을 위하여 본 연구실의 조직배양 시스템을 활용하였다. 먼저 3% sucrose의 MS 기본배지에 각종 비타민류를 감자의 생육에 적합하게 조절 첨가된 배지에 치상하여 2주일 간격으로 계대배양하였다. 기내배양 줄기의 생육을 데지레 대조군과 비교하였을 때 차이가 없음을 나타내었다 (그림 4). 이 때 급속 대량 증식을 위하여 2-3 마디를 포함하는 줄기를 잘라서 새로운 증식용 줄기로 사용하였다. 2주일 간격으로 계대배양을 수행 결과 감자 줄기는 기하 급수적으로 증식하게 된다. 이 때 특수한 배양용기의 사용으로 인해 직립으로 자라는 줄기에 비해 매우 세력이 우수한 감자 줄기를 얻게 된다. 확보된 기내배양줄기를 소형기내감자 튜버를 만들기 위하여 줄기의 하단 부분을 9% sucrose가 포함된 MS 배지에 치상한 후 18℃ 암배양실에서 약 3달 가량 배양하였다. 기내 배양용기에서 수확한 마이크로튜버는 휴면 상태에 있으며 적정조건에서 발아를 유도한 후 온실 대량재배를 위하여 파종하였다.

(2) 본 연구실에서 유지중인 소형 마이크로튜버를 미니튜버용 소형 포트에 파종하는 방법과 온실에 멸균토양을 준비해 놓고 토양에 직파하는 두가지 방법을 병행하여 마우스 실험 및 목적동물 면역 반응 유도를 위한 시료용 감자 확보에 주력하였다.

(3) 또 다른 방법으로는 대량으로 확보한 기내줄기를 곧바로 소형 멀티포트에 이식하여 재배하는 방법을 취하였다. 배양용기에 계대배양한지 약 1주일이 지나서 뿌리가 어느 정도 자란 감자 줄기를 흐르는 물에서 배지 잔여물을 깨끗이 씻어내고 하루 정도 습기가 유지되는 상태에서 외부 조건에 적응 순화시킨 후 소형 멀티포트에 이식하였다. 곧바로 온실로 옮기기 전에 온도, 습도, 광이 일정하게 조절되는 생장상에서 약 2주일 정도 순화과정을 거친 후 온실의 큰 포트에 옮겨심거나 준비된 포장에 이식하는 방법으로 감자 시료를 많이 확보하고자 하였다 (그림 5).

(4) 발아한 마이크로튜버를 2011년 4월 10일 경 온실에 파종하여 생육을 면밀히 관찰하였다. 형질전환 하지 않은 데지레 품종을 대조구로 하였다. 두 감자의 생육을 비교한 결과 P0.7-2 형질전환 감자에서 다른 특징적인 외형상의 차이는 관찰되지 않았다. 재배상의 특이사항으로는 2011년 여름의 이상 기후로 (젖은 장마와 부족한 일조량) 대조구 감자의 생육이 예년의 것과 비교하였을 때 매우 저조하였다는 것을 감안하여야 할 것이다.

(5) 온실토양에 마이크로튜버를 직파하였을 경우, 지상부 생육은 데지레 대조구의 길이가 39.3cm, 무게 97g이었던 반면, P0.7-2 형질전환 감자는 길이가 40.7cm, 무게 77 g이었다. 한 식물체당 얻어진 감자 튜버의 개수는 데지레 대조구가 6.3개, P0.7-2 가 7개 이었다. 감자의 개수에 상관없이 한 식물체당 얻어진 감자의 총 무게는 데지레 대조구가 96g, P0.7-2 가 82.3g 이었다. 데지레와 P0.7-2 개체간의 약간의 차이는 있었으나 이는 오차범위내에 있어 고려할 만큼의 수준은 아니었다 (그림 6). 수확한 총 감자 무게는 데지레 대조구 20kg, P0.7-2는 10kg 정도였다.

(6) 형질전환된 LMO 작물임을 고려하여 제한된 온실내에서 감자 괴경을 대량 확보하는 것이 필수적이다. 대량으로 확보된 기내소괴경을 씨감자로 사용하여 외부 환경과의 차단이 가능한 유리온실 및 비닐온실에서 포트재배를 통하여 대량으로 돼지 경구투여를 위한 감자 확보를 수행하였다. 화분에 의한 유전자 전이와 같은 환경 위해성의 우려를 불식시키기 위해서는 엽록체

형질전환 시스템이 유리하다. 즉, 엽록체는 모계유전을 하기 때문에 화분에 의한 유전자의 다른 작물로의 전이는 원천적으로 방지할 수 있는 장점을 가진다. 엽록체 형질전환을 이용한 단백질의 고발현 시스템은 세포에 존재하는 수많은 엽록체 게놈에 도입된 유전자로 인하여 외래 단백질의 발현이 전체 수용성 단백질의 20~50%로 아주 높은 발현을 보이는 것으로도 충분한 장점을 가진다 (Daniell 2005).

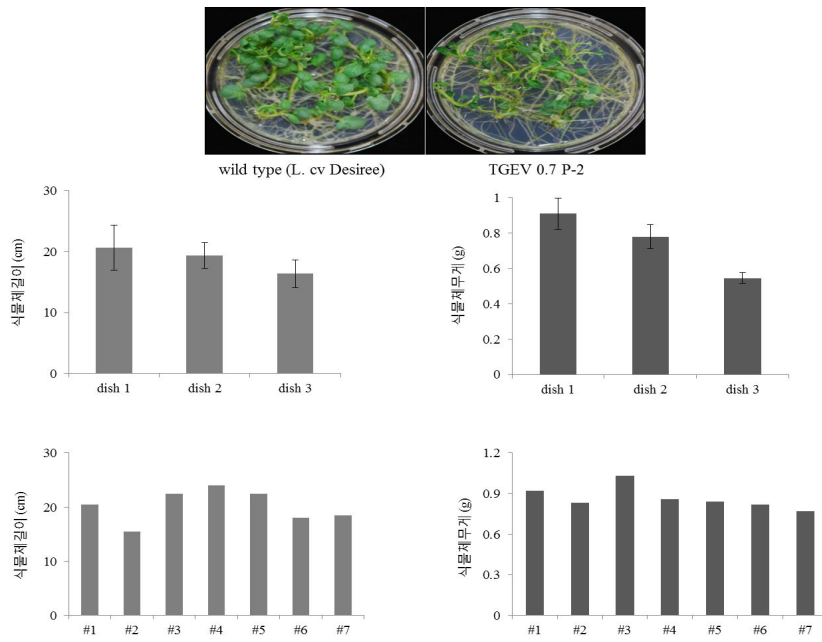


그림. 4 기내배양줄기의 생육비교 분석. (위) 사진은 데지레 감자와 P0.7-2감자의 비교. (중간) 각 배양용기안의 4개의 줄기의 평균비교. (아래) 무게 비슷한 줄기 7개의 평균 생육

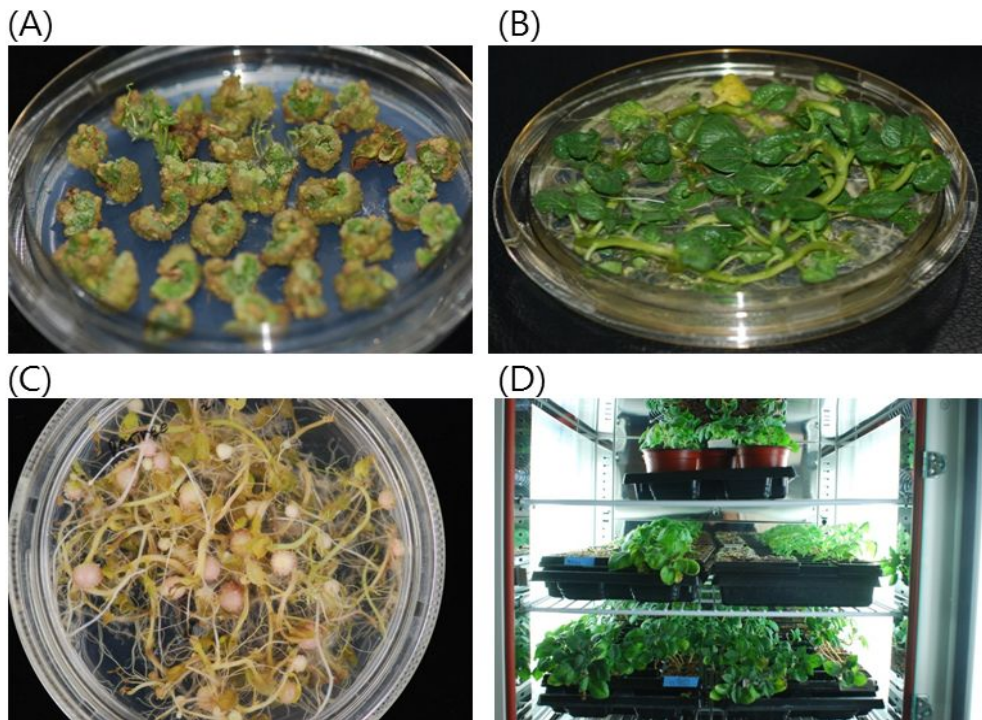


그림. 5 공시재료인 감자의 대량증식을 위한 시스템 개발. (A) TGEV 유전자를 도입하기 위한 감자의 형질전환. 기내신초를 유기중임 (B) 유전자 발현을 분자생물학적 분석에 의해 선별한 P0.7-2 개체의 기내줄기 대량증식 (C) TGEV P0.7-2 기내줄기의 대량증식 후 감자 마이크로튜버의 유도 및 생산 (D) 휴면이 타파되어 발아한 P0.7-2 마이크로튜버를 소형 멀티꽃에 파종하여 초기 생육을 성장상에서 유도하고 있음. 초기 생육이 이루어지고 난 후 이들은 온실의 토양에 직파하거나 큰 개별 포트에 이식하여 재배하게 됨.

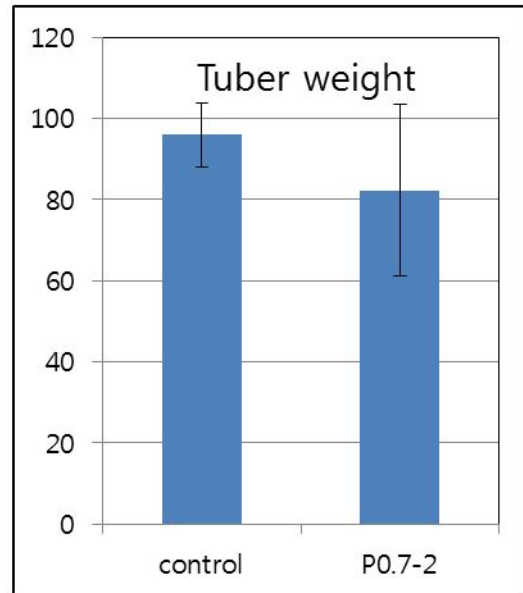
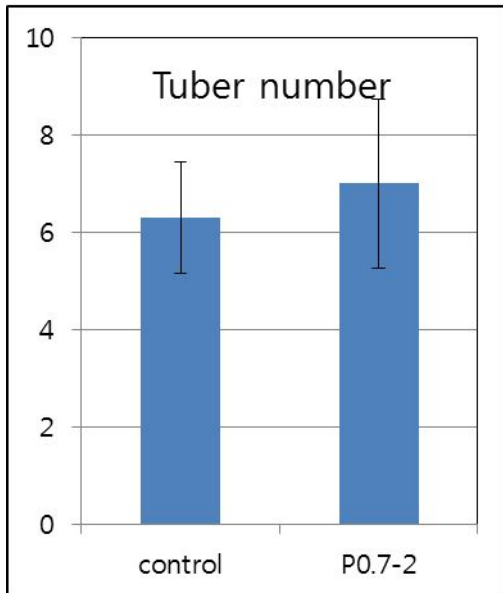
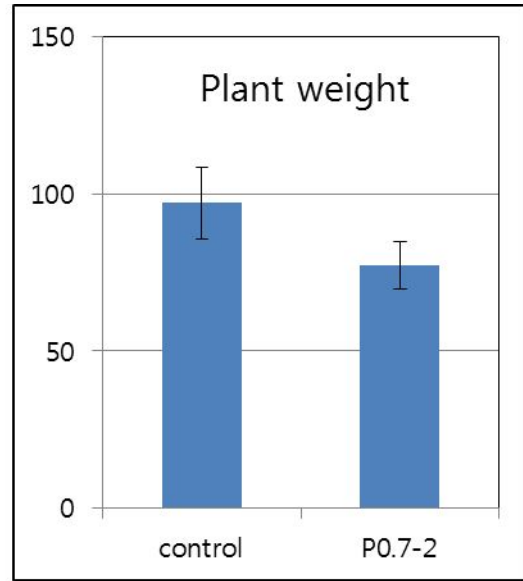
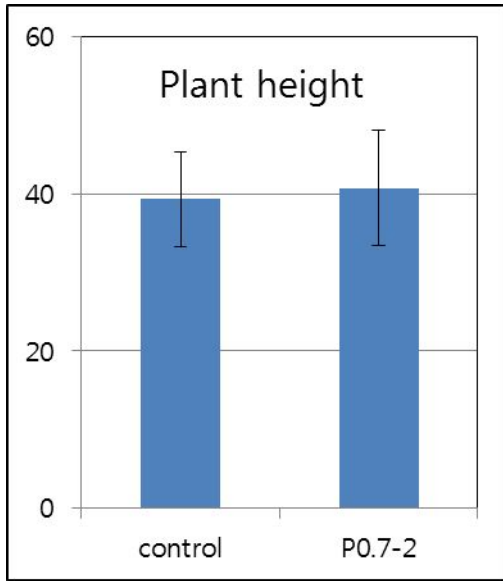


그림. 6 온실토양에 테지레 대조군 (control)과 TGEV P0.7-2 형질전환 감자의 마이크로튜버를 직파하여 초장, 무게, 튜버의 개수 및 튜버의 무게를 비교 분석한 결과

4. 마우스 실험동물을 이용한 식물-유래 항원 단백질의 면역원성 평가-항체 유도 효과 검증을 통한 백신으로의 개발

본 연구는 식물-유래 TGEV 항원 단백질의 마우스 실험동물에 경구 투여를 통하여 항원-항체 면역 반응 유도 여부를 가늠해보고자 수행하였다. Vaccination protocol 완료 후 채취한 serum에서 IgG 및 IgA 항체를 각기 분석하여 체액 면역 뿐만 아니라 점막 면역 가능성도 알아보았다. 경구 투여를 위한 시료의 가공 형태 파악하고자 1회 경구 투여량을 최대한으로 높일 수 있는 방법에 대한 실험적 자료를 제시하고자 한다. 즉, slice tuber의 freeze-dry를 통한 분말 형태, 열-건조에 의한 분말 형태 및 총수용성단백질 형태 등 다양한 방법에 의한 단순 가공을 도입하여 점검하였다. 감자 각각의 튜버가 포함하고 있는 항원양을 정량적으로 비교 분석하였으며, 감자-유래 항원에 의한 부스팅 효과를 알아보았다.

가. 감자-유래 항원 시료 준비

실험에 사용한 감자 시료는 온실에서 수확한 것을 곧바로 깨끗이 세척한 후 약 0.1cm 두께로 얇게 slice한 후 급속 냉동시킨다. 급속 냉동 된 감자 절편은 동결 건조 상태로 만든다. 냉동건조된 감자절편은 분쇄기를 사용하여 분말로 만들어 곧바로 실험에 사용할 수 있는 상태로 준비하였다.

나. 마우스 준비

실험에 사용한 Balb/c 마우스는 (주)오리엔트 바이오에서 구입하였으며, 5주령 된 마우스를 분양받았다. 분양 받은 후 약 1주일 정도 실험에 사용 전 적응단계를 거쳤다. 감자 시료를 투여 하는 본 실험은 6월 14일에 시작하였으며 실험 시작전 채혈을 하여 투여 후 항체 형성여부 변화와 비교하고자 하였다. 3주간 연속적인 주 1회 투여를 실시하였으며, 식물체 경구 투여가 마무리된 2주 후에 부스팅을 실시하였다. 부스팅 이후 가장 항체가가 높게 올라가는 시기를 파악하기 위하여 약 3주간 더 채혈을 실시하였다.

다. 마우스 경구 투여

한 처리군 당 5마리의 반복을 두었으며 동결건조된 감자분말을 PBS buffer로 총단백질 (TSP)을 추출하여 0.5ml 로 최종 volume을 맞추었다. 이 때 투여되는 감자 시료 대비 항원양을 분석하여 보면 감자 생체중당 10g으로 마리당 투여를 실시하였고 이는 항원의 양으로 환산하여 보면 약 1 ug을 포함하였다.

감자 시료 투여는 3주간에 걸쳐 1주일 간격으로 3번 투여하였다. 매번 투여 전에 채혈을 하여 투여에 의한 항체형성을 알아보았다. 마우스 경구 투여는 0.5ml의 시료를 정확히 투여하기 위하여 존데를 이용하였다. 1차 priming (일차 면역 유도)이 완료되고 2주 후에 원TGEV peptide로 부스팅을 수행하였다. 첫 투여가 시작된 후 10주까지 항체형성을 알아보았다.

매주 채혈시에 체중을 조사하였으며, 생존율을 조사하여 독성 여부 등을 알아보려고 하였다.

5. 식물-유래 항원 단백질을 백신으로의 효과 극대화를 위한 다양한 적용법 개발

가. 식물-유래 TGEV 항원의 경구투여에 따른 항체 형성 여부

기본적인 실험군을 만들어 형질전환 감자-유래 TGEV항원을 포함하는 TSP의 경구투여 결과 마우스에서 특이적인 항체를 형성하는지를 알아보았다. 먼저, 대조구는 보통의 조건에서 사육되어진 마우스 (NC), 감자-유래 항원 처리구에 대한 비고구로서 형질전환되지 않은 일반 감자 투여 마우스군 (NT), TGEV 펩타이드 항원의 경구 투여 마우스군 (PC), 그리고 감자-유래 TGEV항원을 포함하는 TSP 투여 마우스군 (T1)으로 나누어 앞의 설명과 같이 3회 투여, 1번의 부스팅을 수행하였다. 그 결과 부스팅을 실시하기 전까지 primary 항체 형성 반응은 대조군과 처리군에서 모두 없거나 매우 낮았다 (그림 7).

부스팅이 수행되고 이 후 9주부터 항체 형성이 눈에 띄게 증가하여 10주에서는 식물-유래 항원 투여구에서 TGEV 펩타이드 항원 투여구 수준에 준하는 항체 형성이 확인되었다. 반면, 일반 감자 투여구의 경우 부스팅 이후에도 항체 형성이 이루어지지 않아 감자의 다른 성분에 의한 항체 형성이 아닌 TGEV 항원에 의한 항체 형성이 이루어졌음을 확인하였다.

나. 식물-백신의 실용화를 위한 application

위의 일차 실험을 통하여 식물-유래 항원에 의하여 항체 형성이 확인되었으며 보다 구체적이고 활용 가능한 방안을 알아보기 위하여 1차 vaccination 항원 (priming)이 아닌 boosting용도로의 가능성을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 결과에 의하면 (그림 8), 감자항원에 투여에 의하여 미미하던 항체 형성이 원펩타이드항원을 이용한 부스팅 이후 눈에 띄게 증가한 것을 확인할 수 있었던 반면, 감자-유래 항원에 의한 부스팅의 경우 항체 형성이 여전히 미미함을 보였다. 감자항원에 의한 부스팅 효과는 미미한 것으로 나타났으며 다만, 원항원에 의한 priming 이후 감자항원에 의한 부스팅을 확인하는 실험구가 빠져있어 보다 면밀한 검토는 이루어지지 못하였다.

대부분의 백신 사용에서 아쥬번트는 백신의 효능을 증대시키기 위해 필수적으로 사용하는 부가제이다. 이러한 아쥬번트의 효능을 본 감자-유래 항원 투여에서도 그 효능을 평가해보고자 다음과 같은 처리군을 나누어 실험을 수행하였다. 먼저, 다른 실험에서와 같이 일반감자 투여 마우스군, TGEV 원펩타이드 항원 투여 마우스군을 공히 처리하였으며, 일반감자 처리군에서 아쥬번트만의 효과에 의한 항체 형성 여부를 명확히 알아보하고자 일반감자 투여시 아쥬번트를 같이 처리하는 마우스군을 나누었다. 또한 감자-유래 항원 투여시에 아쥬번트를 같이 처리한 마우스군과 아쥬번트를 첨가하지 않은 마우스군으로 나누어 실험하였다. 결과를 분석하면 (그림 9), 일반감자를 경구투여 할 때 아쥬번트를 첨가하여 같이 처리한 마우스군에서도 항체 형성은 이루어지지 않음을 알 수 있었다. 이로서 항원이 존재하지 않은 것에 아쥬번트만 처리하여도 항원-특이적인 항체 형성은 일어나지 않음을 알 수 있었다. 반면, 감자-유래 항원의 경구투여시에 아쥬번트를 첨가하지 않은 마우스군에서는 그 값이 절반에도 미치지 못함을 알 수 있었다. 이는 아쥬번트 (본 실험에서는 콜레라 독신을 사용하였음)는 면역반응의 증대에 큰 효과가 있음을 입증하였다. 지금 현재 많은 백신 개발 연구팀들에서는 효과가 우수한 백신 개발과 더불어 같은 비중으로 아쥬번트의 연구에도 박차를 가하고 있다. 즉, 적은 항원 dosage로서 큰 면역 반응 효과를 가져올 수 있는 아쥬번트의 개발은 황금알을

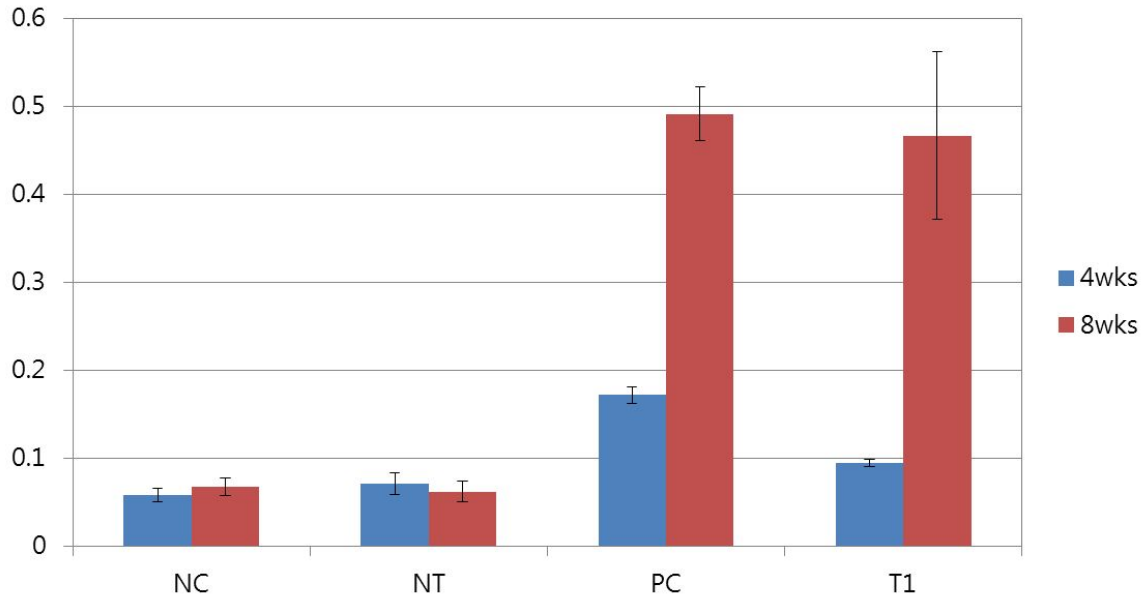


그림. 7 형질전환 감자-유래 TGEV항원을 포함하는 TSP의 경구투여를 마우스에서 수행하여 특이적인 항체의 형성을 분석. NC, 처리되지 않은 일반 마우스; NT, 일반 감자 투여 마우스군; PC, TGEV펩타이드 항원 투여 마우스군; T1, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군

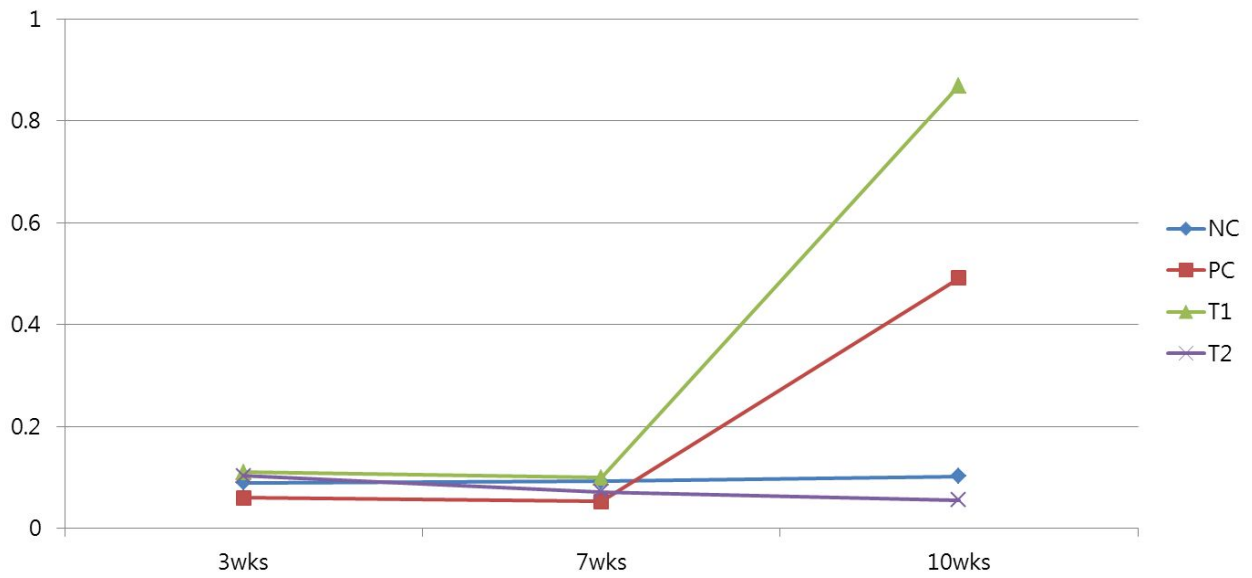


그림. 8 감자항원에 의한 부스팅 효과. NC, 일반 감자 투여 마우스군 (-아주번트); PC, TGEV 펩타이드 항원 투여 마우스군 (+아주번트); T1, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군 (+아주번트), 원항원 부스팅; T2, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군 (+아주번트), 감자항원 부스팅. 아주번트는 콜레라톡신을 사용하였음.

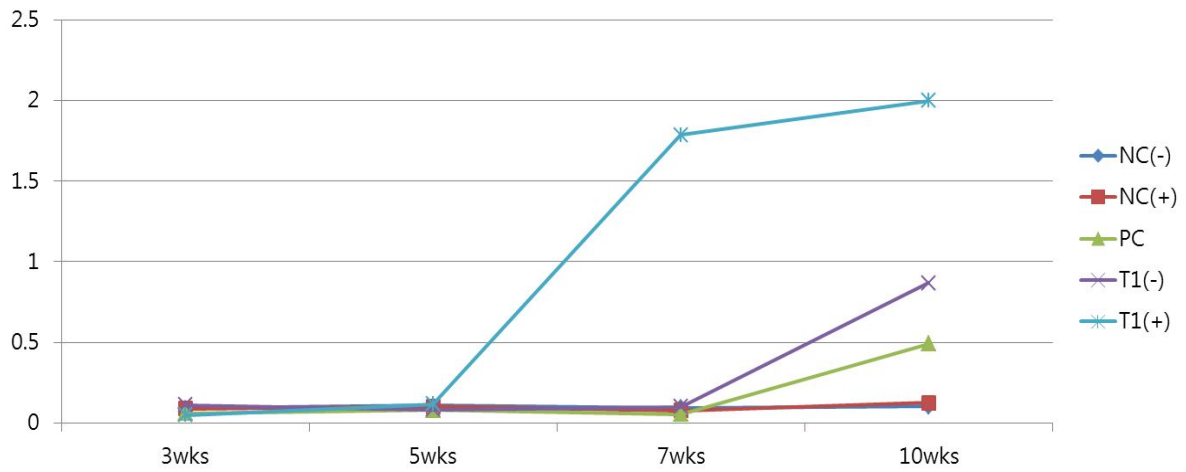


그림. 9 아쥬번트의 유무에 따른 항체 형성 반응. NC, 일반 감자 투여 마우스군 (-아쥬번트); PC, TGEV 펩타이드 항원 투여 마우스군 (+아쥬번트); T1, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군 (+아쥬번트), 원항원 부스팅; T2, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군 (-아쥬번트), 원항원 부스팅

낮는 거위에 비유될 정도로 높은 시장가치를 지닌다고 볼 수 있다.

식물-유래 항원을 이용한 백신개발의 실용화에 있어 가장 큰 장애요인 중의 하나는 낮은 발현율이라고 볼 수 있다. 이를 해결하기 위하여 발현율을 높이기 위한 많은 방법들이 제안되고 있는 실정이다. 마우스실험의 결과를 바탕으로 목적동물인 돼지로 실제 적용하였을 경우 항원양을 생체중 대비로 결정하는 것이 어려운 것이 현실이다. 따라서 마우스 실험에서 항원양 대비 항체 형성이 정비례로 증가하는지 파악하여 보고자 하였다. 실험결과 (그림 10), 투여한 항원양이 5ug (T-5)일 때 비해 15ug (T-15)일 경우 항체 형성 반응 값이 증가하였지만 (약 28% 증가) 그 정도가 반드시 정비례하는 것은 아님을 알 수 있었다. 따라서 마우스와 목적동물 돼지의 생체중을 대비하여 항원양을 결정하는 것보다 목적동물에 알맞은 protocol을 만들기 위한 기초 실험부터 이루어져야 할 것으로 판단된다.

즉, 일반적으로 백신의 dose는 생체중 대비로 계산하고 있는 것이 일반적이다. 실험동물 쥐에서의 최적의 면역유도 최대 dose를 바탕으로 목적동물에 적용하는 방안이 고안되어야 한다고 본다. 예를 들어, 30ug 항원 (30g 이상의 감자생체중)/30g 마우스에서 면역 유도 효과가 확인이 되었을 경우, 돼지 (30kg 기준)의 생체중 대비로 전환 하면 30kg 정도의 감자를 투여하여야 하는 계산이 나온다. 이는 실제적으로 불가능하다고 판단되므로 최대 1/100의 정도의 dose에서 면역 반응 여부를 확인하도록 하여야 하고 이를 위하여 면역반응을 극대화시킬 수 있는 여러 가지 방법의 연구가 절실하며, 특히 고효율의 아쥬번트의 활용이 매우 중요하다고 보여진다.

다. 정량화를 위한 가공방법 및 제제화 방법 고안

영양번식을 하는 감자식물체의 경우 한 개체에서 얻어진 감자 개개별로 항원의 함유량이 거의 동일하다고 보여지나 이는 실험적 자료로 뒷받침되어야 하기 때문에 본 연구에서는 동물 실험을 위하여 재배, 수확한 감자의 개개별 항원양을 파악하기 위하여 10개의 감자 튜버에서 독립적으로 TSP를 추출하여 ELSIA에 의한 정량화를 시도하였다. 데지레 품종의 총 수용성 단백질은 약 1.7%로서 그 안에 함유되어 있는 TGEV 항원 단백질은 약 0.013% 가 평균값이었고 표준편차 0.000863 인 점을 감안하면 개체간 항원양의 차이는 크지 않음을 알 수 있었다 (그림 11). 따라서 (1) 한 클론에서 수확되어진 감자를 무게별로 나눈 다음 생체중 대비 항원 함량을 나누는 정량법 (2) 모든 감자 시료를 동일하게 분말화한 다음 일정한 무게로 나눈 다음 pellet화 하는 법 (3) 수확된 모든 감자들에서 총수용성단백질을 추출한 다음 액상으로 정량화하는 법 등으로 나누어 이들 각 정량화 방법을 경구투여법에 동일하게 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

라. Fecal IgA 분석

경구투여백신의 큰 장점 중의 하나는 점막면역을 유도할 수 있다는 것이다. 질병의 원인이 침입할 때 가장 먼저 인식하게 되고 면역을 유도할 수 있는 침병 역할을 하는 점막 면역는 질병 방어에 있어 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 IgG 분석에 의하여 체액면역반응 유무를 확인하는 반면 점막면역은 IgA 분석에 의하여 면역 항체 형성을 확인한다.

매 주 마우스의 serum 채취 할 때 군별로 분변을 채취하여 IgA분석에 사용하였다. 동결건조시킨 분변을 마쇄한 후 PBS 단백질 추출buffer로 TSP를 추출 후, ELISA 를 수행하였다. 우

선적으로 serum 분석 시와 동일하게 1:100 비율로 한 결과 너무 낮은 농도로 인하여 분석값을 읽을 수 없었다. 하여 적정 fecal 농도를 찾기 위하여 dilution 비율에 따른 분석을 수행하였다. 결과, 80:20 비율 이상에서 항체 형성 값을 읽을 수 있었다 (그림 12). priming 전, priming이 끝나고 부스팅 전, 부스팅 후 로 나누어 fecal 분석을 실시하여 항체형성가를 조사한 결과 부스팅이 끝나고 10주째에 항체가 검출되었다 (그림 13). 특이한 사실은 TGEV 펩타이드 항원으로 백신 투여를 실시한 마우스군에서는 IgA 항체가 검출되지 않았으며 감자-유래 항원으로 백신투여하고 원항원으로 부스팅을 실시한 마우스군에서 항체가 뚜렷함을 확인하였다. 이 결과에 의하면 점막면역 유도에는 감자-유래 항원이 긍정적인 효과를 유도함을 해석할 수 있었다.

마. 식물-유래 항원의 혼합 투여에 의한 항원 반응

본 연구에서 돼지설사병의 원인이 되는 두 바이러스 항원 TGEV와 PEDV를 동시에 경구 투여하여 면역반응을 유도하고자 실험을 수행하였다. TGEV를 발현하는 감자의 TSP와 PEDV를 발현하는 담배의 TSP를 혼합하여 앞의 마우스 경구투여 방법과 동일하게 수행하였다. 이 때 PEDV를 발현하는 담배가 LTB 아주번트를 같이 발현하기 때문에 따로 아주번트를 첨가하지 않았으며 부스팅은 시판하고 있는 돼지 T-P 혼합백신 (대성백신)을 사용하였다. 결과에 의하면 (그림 14), 식물-유래의 TGEV/PEDV 혼합 투여에 의한 TGEV 특이 항체형성은 이루어지지 않았다. 이는 몇가지 원인을 추론해 볼 수 있겠는데, 먼저 혼합투여의 방법이 확립되어 있지 않은 상태이기 때문에 방법상에서 문제가 있을 수도 있을 것이다. 또한 담배에서 PEDV 항원과 공동으로 발현되는 아주번트의 효능이 확실하지 않을 수 있는 점, 부스팅에 사용한 상용혼합백신 역시 사전 마우스 실험 자료가 없기 때문에 마우스에서의 그 효능을 명확히 주장할 수 없다는 문제점도 있을 수 있다. PEDV 특이 항체 형성 여부는 추후 파악되어져야 할 것이다.

이와 같은 식물-유래 형질전환 식물을 이용한 동물 실험 수행에는 반드시 그로 인한 부가적인 독성이 동물에게 영향을 미치는지를 파악하는 것이 향후의 지속적인 실험 진행에 매우 중요한 요인이 된다. 따라서 모든 GMO 관련 실험에는 안전성 평가를 수행하여야 한다. 본 실험의 경우, 따로 연구내용을 편성하여 독성 평가를 진행하기에는 무리가 있어 마우스 면역반응 평가를 수행하면서 외형상의 변화, 체중의 변화 및 생존 여부를 확인함으로써 독성 여부를 대체적으로 판단하였다 (그림 15).

바. 돼지에 대한 식물체 발현 PEDV와 TGEV 항원 단백질의 효능성 검증

임신모돈에 대한 식물-유래 항원 각각의 면역원성 비교하는 시험을 수행하였다. PEDV 및 TGEV 항원 발현 식물체에서 분리한 항원 또는 식물체를 임신한 모돈 3개의 그룹 (항원 발현-식물체 경구 투여군, 대조군-식물 투여군, 일반백신 접종군)으로 나누어 사육하였다. 본 실험은 모돈에 백신을 경구투여한 뒤 자돈에서의 항체 형성 및 공격접종에 의한 방어능을 평가하는 실험이며 그 실험은 제2협동과제인 축산과학원에서 이루어졌다. 이에 대한 실험 내용 및 결과는 제 3절에서 보고하였다.

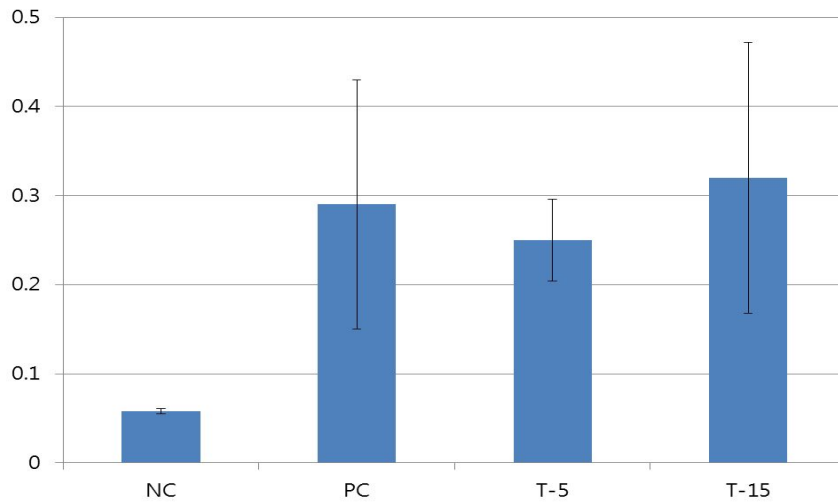


그림. 10 식물-유래 항원양에 따른 항체 형성 반응의 정도 비교. NC, 일반 감자 투여 마우스 군 (-아쥬번트); PC, TGEV 펩타이드 항원 투여 마우스군 (+아쥬번트); T-5, 감자-유래 TGEV 항원 5ug 투여군; T-15, 감자-유래 TGEV 항원 15ug 투여군

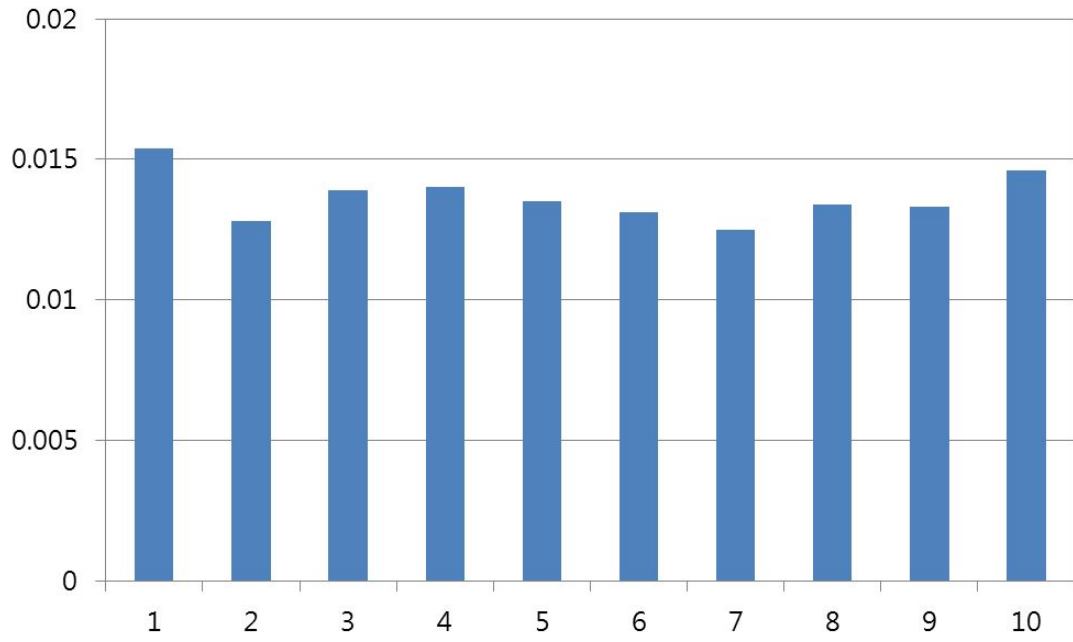


그림. 11 형질전환 감자 P0.7-2에서 수확된 독립된 튜버 각각 10개의 향원양 비교. TSP 대비 향원양의 %로 표시되었음

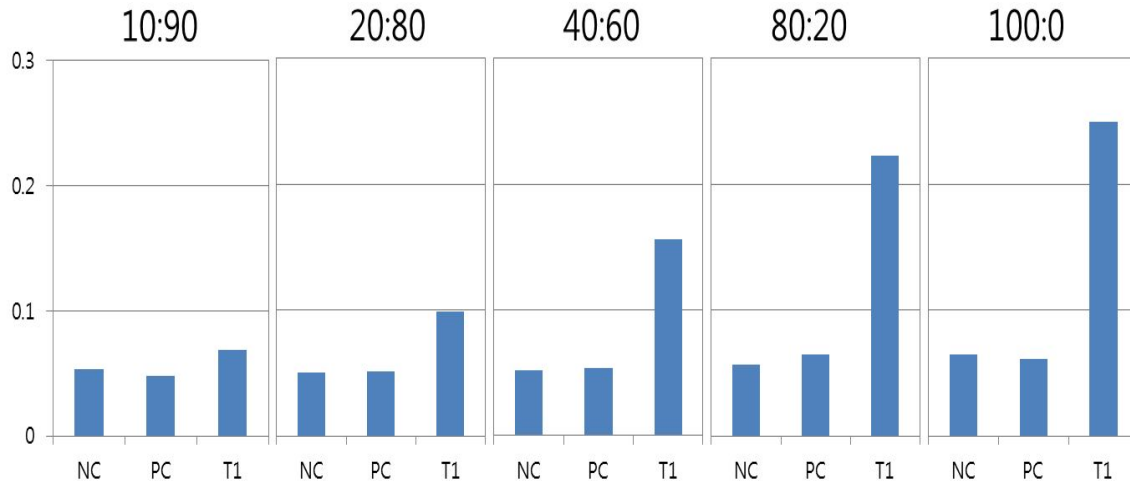


그림. 12 Fecal dilution 농도에 따른 항체가 검출 정도 분석. ELISA 분석에 적합한 농도를 찾기 위해 fecal양:PBS 버퍼 비율을 10:90, 20:80, 40:60, 80:20, 및 100:0 으로 하여 분석. NC, 처리되지 않은 일반 마우스; PC, TGEV 펩타이드 항원 투여 마우스군; T1, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군

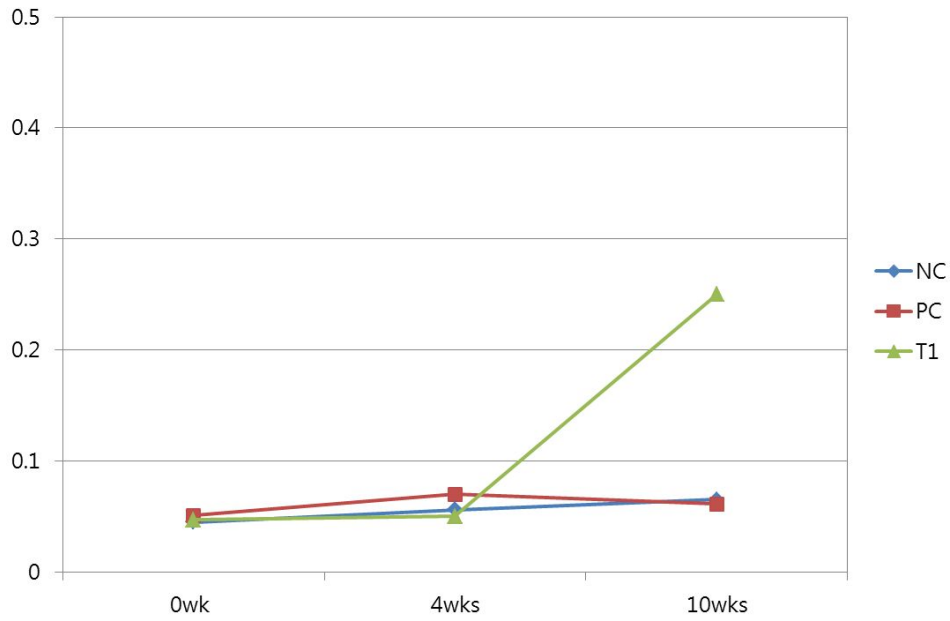


그림. 13 priming전 (0wk), priming이 끝나고 부스팅 전 (4wks), 부스팅 후 (10wks)로 나누어 fecal분석을 실시하여 항체형성가를 조사. NC, 처리되지 않은 일반 마우스; PC, TGEV 펩타이드 항원 투여 마우스군; T1, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군

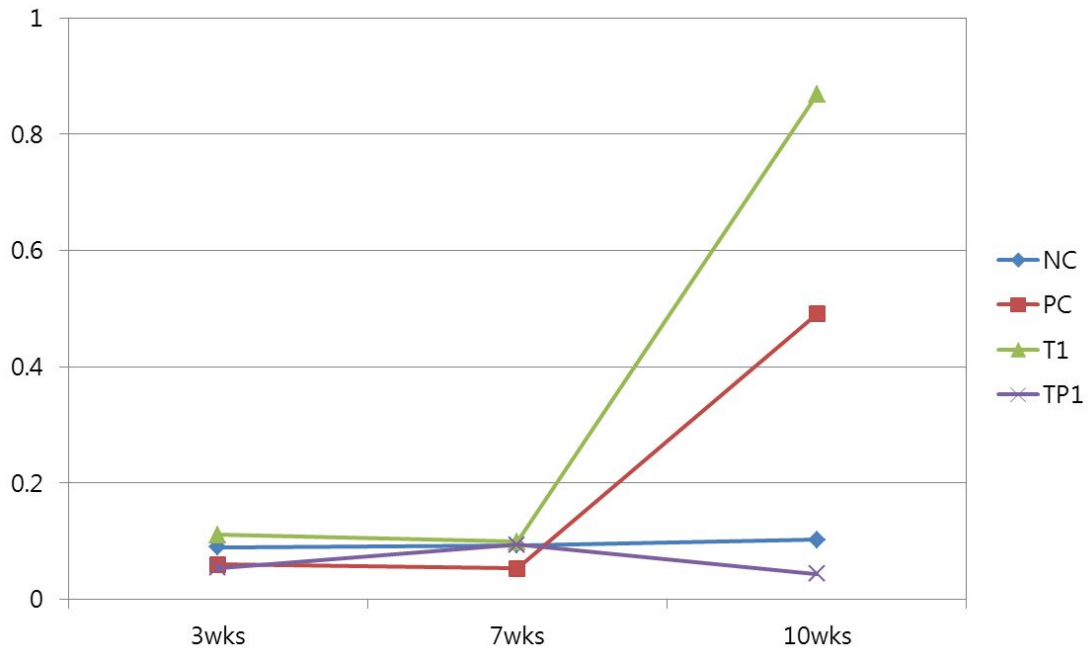


그림. 14 돼지설사병의 원인이 되는 두 바이러스 항원 TGEV와 PEDV를 동시에 경구 투여 하여 면역반응을 유도. NC, 처리되지 않은 일반 마우스; PC, TGEV 펩타이드 항원 투여 마우스군; T1, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군; TP1, TGEV를 발현하는 감자의 TSP와 PEDV를 발현하는 담배의 TSP를 혼합하여 경구 투여

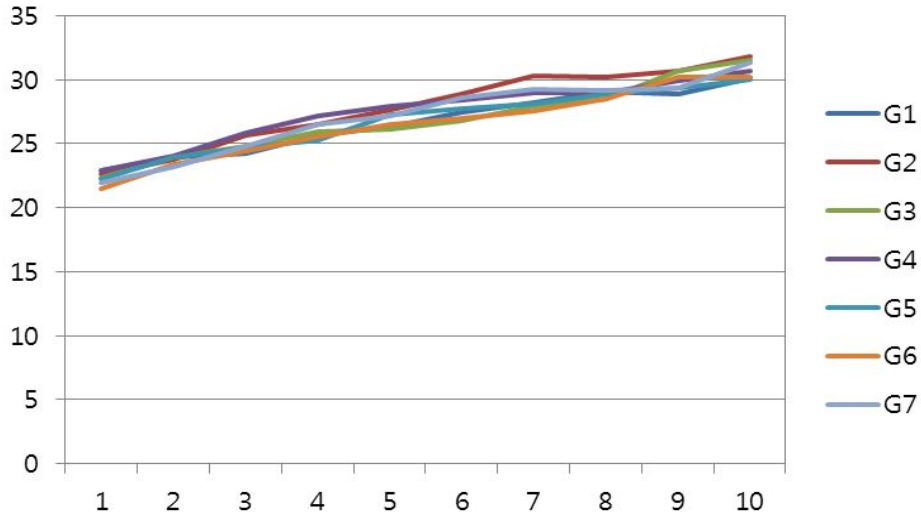


그림. 15 감자-유래 항원의 경구투여에 따른 마우스의 체중 변화. G1, 처리되지 않은 일반 마우스; G2, 일반 감자 투여 마우스군 (-아쥬번트); G3, TGEV 펩타이드 항원 투여 마우스군; G4, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군 (+아쥬번트), 원항원 부스팅; G5, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군 (+아쥬번트), 감자항원 부스팅; G6, 감자-유래 TGEV 항원 TSP 투여 마우스군 (-아쥬번트), 원항원 부스팅; G7, TGEV를 발현하는 감자의 TSP와 PEDV를 발현하는 담배의 TSP를 혼합하여 경구 투여

제 2 절 PEDV 항원단백질을 생산하는 식물-유래 백신의 효능 검증 (제 1 협동과제-전북대학교)

1. PEDV 항원단백질을 생산하는 식물-유래 백신의 효능 검증

본 연구에서는 돼지설사병 예방을 위하여 돼지설사병의 원인균인 PEDV의 epitope를 포함하는 항원유전자를 포함하고 또한 점막면역계에서 항원단백질의 흡수를 증진시키는 기능을 가지고 있는 ligand인 LTB를 포함하는 융합항원단백질을 생산하는 식물체를 이용하여 실험동물과 목적동물을 상대로 경구백신으로서의 효용성을 확인하는 것이 목표이다. 이와 더불어 돼지설사병의 다른 원인균인 TGEV 항원단백질을 생산하는 식물체와 같이 백신으로 이용하여 돼지설사병 예방을 위한 식물유래백신의 효용성을 확인 하는 것이 목표이다.

가. PEDV 항원단백질을 발현하는 식물체 대량생산

(1) 돼지유행성 설사병을 일으키는 PEDV의 항원단백질을 포함하고 또한 점막면역체계에서 면역반응의 효율을 높이는 것으로 알려진 ligand인 LTB와 융합된 융합항원단백질(LTB-COE)을 생산하는 식물체를 확보하고 있음 (Kang et al., Protein Expr Purif 2006 46;16-22).

(2) 동물실험을 시행하기 위한 시료 확보 및 확보된 시료에서 발현된 융합항원단백질을 재검증하기 위하여 형질전환된 식물체의 종자를 선발마커인 가나마이신이 첨가된 MSO 배지에 선발된 형질전환체를 온실에서 화분에 재배하여 완전히 자란 식물체의 잎을 채취하여 융합항원단백질의 발현과 기능을 가지고 있는지 확인하고 발현된 융합항원단백질의 발현량을 확인한다

나. 실험동물에서 융합항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능

(1) 실험동물은 쥐로 하며, 각 실험군은 대조군과 실험군으로 나누어 시행하고 융합항원단백질을 경구적인 방법으로 투여하여 면역화된 쥐로부터 혈액과 분변을 채취하여 투여한 각각의 항원단백질에 대한 면역반응이 효율적으로 유도되었는지 확인하여 융합항원단백질을 생산하는 식물체가 경구백신으로 효용성을 확인한다.

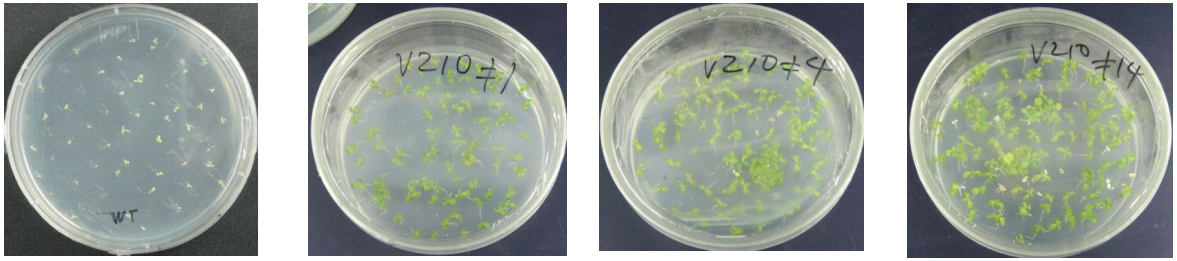
2. PEDV 항원단백질을 생산하는 식물-유래 백신의 효능 검증

가. 동물실험을 위한 항원단백질 고발현 식물체 대량생산

(1) LTB-COE 융합항원단백질을 고발현하는 담배 식물체 line #1, #4, #14의 T1 세대 씨앗을 표면 소독하여 Murashige and Skoog salts (30 g/l), 0.2% Gelrite, 가나마이신 (150 mg/l)이 첨가된 MSO배지를 포함하고 있는 배양병에서 발아를 시켜 가나마이신에 저항성을 보이는 형질전환 식물체를 선발하고 재배하는데 이용하였다. 그림. 1에서와 같이 형질전환 식물체는 항생제가 첨가된 배지에서 정상적인 성장을 보인 반면에 일부는 성장을 보이지 않았다. 3 개월 정도 자란 식물체는 재배를 하기 위하여 화분으로 옮겨 온실에서 재배하였다.

(2) 다자란 형질전환 식물체와 동물실험에서 대조군으로 이용될 형질전환 되지 않은 식물체의 잎을 수확하고 냉동시킨 후에 냉동건조기를 이용하여 냉동건조 시키고 막자사발을 이용하여 곱게 간 후에 보관하였다(그림 1).

A



WT V210#1 V210#4 V210#14
Germination of transgenic plants in MS medium containing 150 mg of Km/l

B



Growth of transgenic plants in green house

그림. 1 형질전환 식물체의 가나마이신이 첨가된 배지에서 선발(A) 및 재배(B).

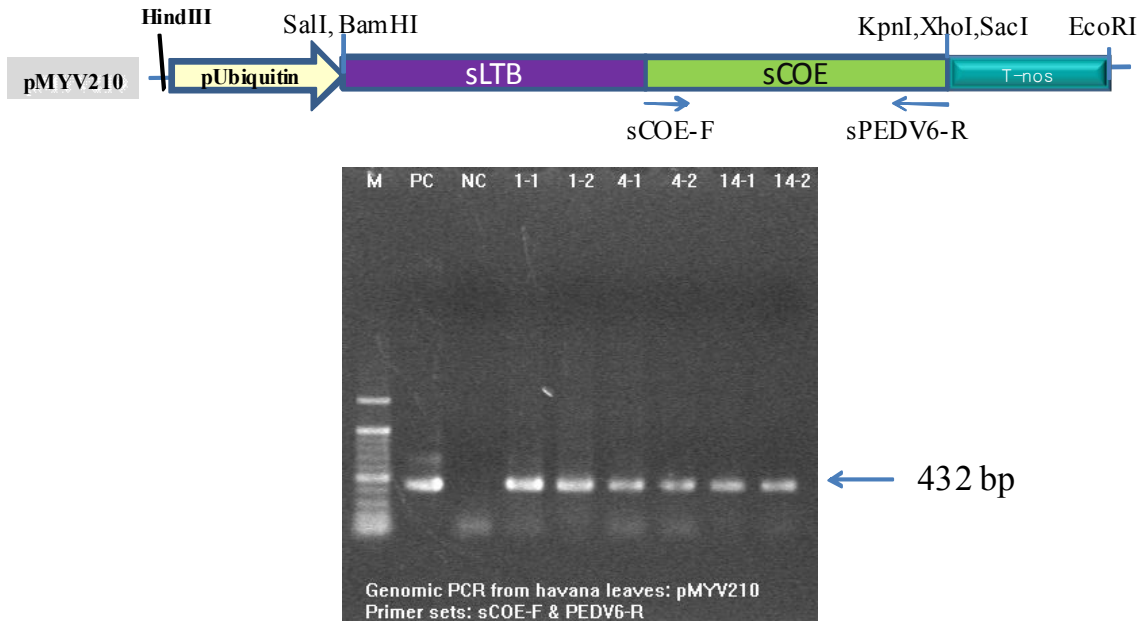


그림. 2 형질전환 식물체에서 항원유전자에 대한 genomic DNA PCR 분석.

M: 100 bp DNA ladder; PC: plant expression vector(pMYV210) as positive control; NC: wild-type havana leaf tissues as negative control; 1-1, 1-2: transgenic havana leaf tissues of line #1; 4-1, 4-2: transgenic havana leaf tissues of line #4; 14-1, 14-2: transgenic havana leaf tissues of line #14.

나. 형질전환 식물체에서 항원단백질의 발현 분석

(1) 항원유전자의 도입을 재확인하기 위하여 항생제가 첨가된 선발배지에서 선발된 형질전환 식물체의 잎으로부터 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 항원유전자의 도입은 LTB-COE 융합유전자에 특이적인 primers (foreward primer, sCOE-F: 5'-gga tcc GTT ACT TTG CCA TCC TT-3'; reverse primer, sPEDV6 R: 5'-GGG GGT ACC TTA AAC ATC TGT GAT TCC-3')를 이용하여 94°C에서 5분 동안 denaturing하고, 94°C에서 30초 동안 denaturing, 55°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 30초 동안 polymerization를 30번 반복하였고 마지막으로 72°C에서 5분 동안 반응을 시키는 조건으로 PCR를 수행하였고 PCR products를 1.0% agarose gel에 전기영동을 수행하였다. 그림 2에서와 같이 형질전환 식물체에 positive control에 확인된 LTB-COE 융합항원유전자에 해당하는 432 bp band를 확인하여 항원유전자가 존재함을 확인하였고 negative control에서는 이와 같은 크기의 band가 확인되지 않았다.

(2) 항원유전자의 도입을 확인한 후 융합항원단백질의 발현을 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 잎을 액체 질소를 이용하여 얼린 후 막자사발을 이용하여 곱게 간 후에 단백질 추출 버퍼를 이용하여 추출하였고 Bradford protein assay를 이용하여 정량을 하였다. 추출한 단백질을 10% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였고 mini-transblot apparatus를 이용하여 Hybond C membranes에 transfer 한 후에 rabbit anti-LTB antiserum과 mouse anti-COE ascites를 이용하여 LTB-COE 융합항원단백질이 발현된 것을 확인하였다. 그림 3에서와 같이 western blot 분석 결과 anti-LTB 항체를 이용하여 LTB-COE 융합항원단백질의 monomer와 assembly 형태를 확인하였다. Anti-COE ascites를 이용한 결과에서도 anti-LTB와 같은 결과로 LTB-COE 융합항원단백질의 monomer와 assembly 형태를 확인하였다. Anti-LTB serum과 mouse anti-COE ascites를 이용하여 같은 위치에 band가 위치하는 것으로 보아 LTB-COE 융합항원단백질이 발현되었음을 확인하였다.

(3) 형질전환된 식물체에서 발현된 LTB-COE 융합항원단백질이 수용체인 GM1-ganglioside에 대한 결합 능력을 가지고 있는지 확인하기 위하여 GM1-ELISA를 수행하였다. GM1-ganglioside를 coating한 ELISA plate를 이용하여 형질전환 식물체 line #1에서 GM1-ganglioside에 대한 결합 능력이 가장 높은 것으로 확인하였고 GM1-ELISA 결과를 토대로 하여 수용체에 결합능력을 가진 LTB-COE 융합항원단백질의 발현량을 측정된 결과 fresh weight 100 mg당 42 ng이었고 전체 수용성 단백질의 0.01%에 해당하는 양임을 확인하였다.

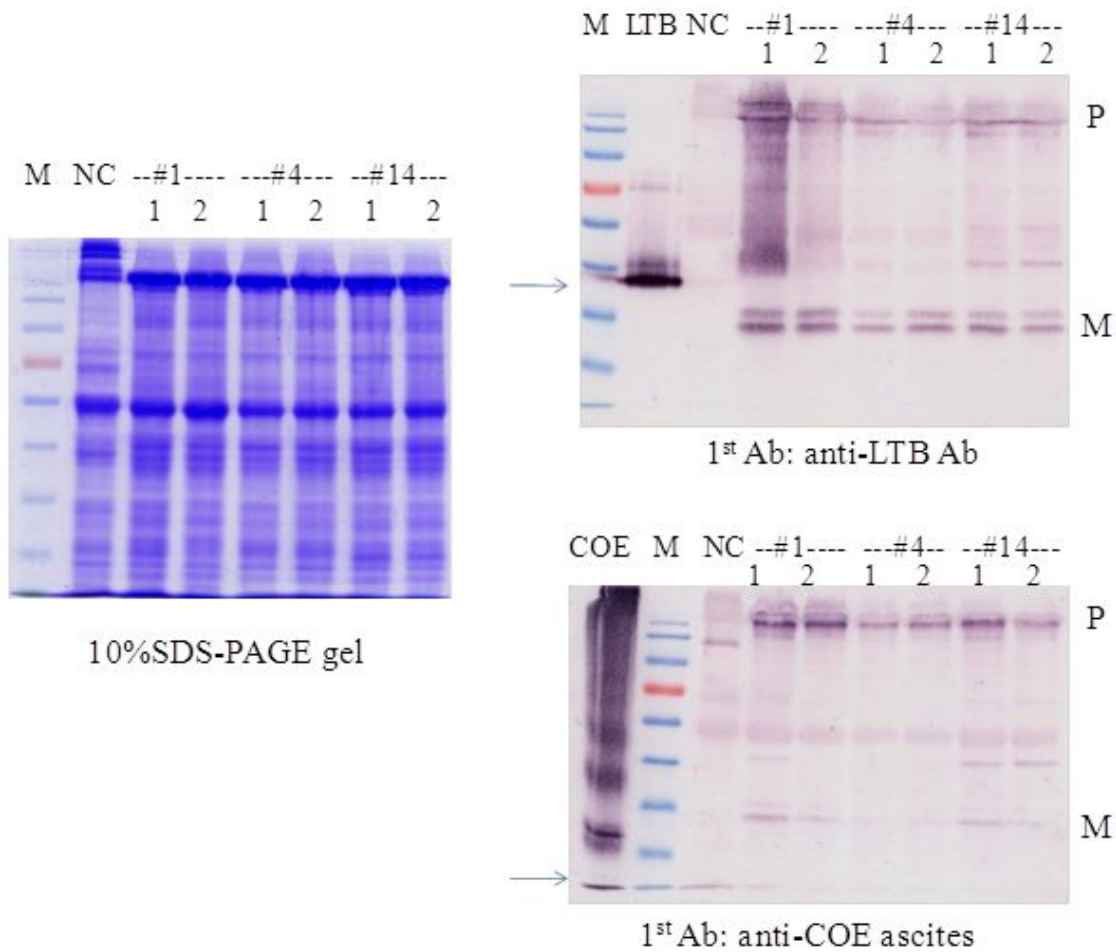


그림. 3 형질전환 식물체에서 LTB-COE 융합항원단백질의 발현 확인.

A. 10% SDS-PAGE gel of protein extract from wild-type (NC) and transgenic havana leaf tissues (line #1: 1, 2; line #4: 1, 2; line #14: 1, 2). B. Western blot analysis with rabbit anti-LTB antibody (B) or with anti-COE ascites (C) as the primary antibody. M, monomer LTB-COE protein, P, pentamer LTB-COE protein.

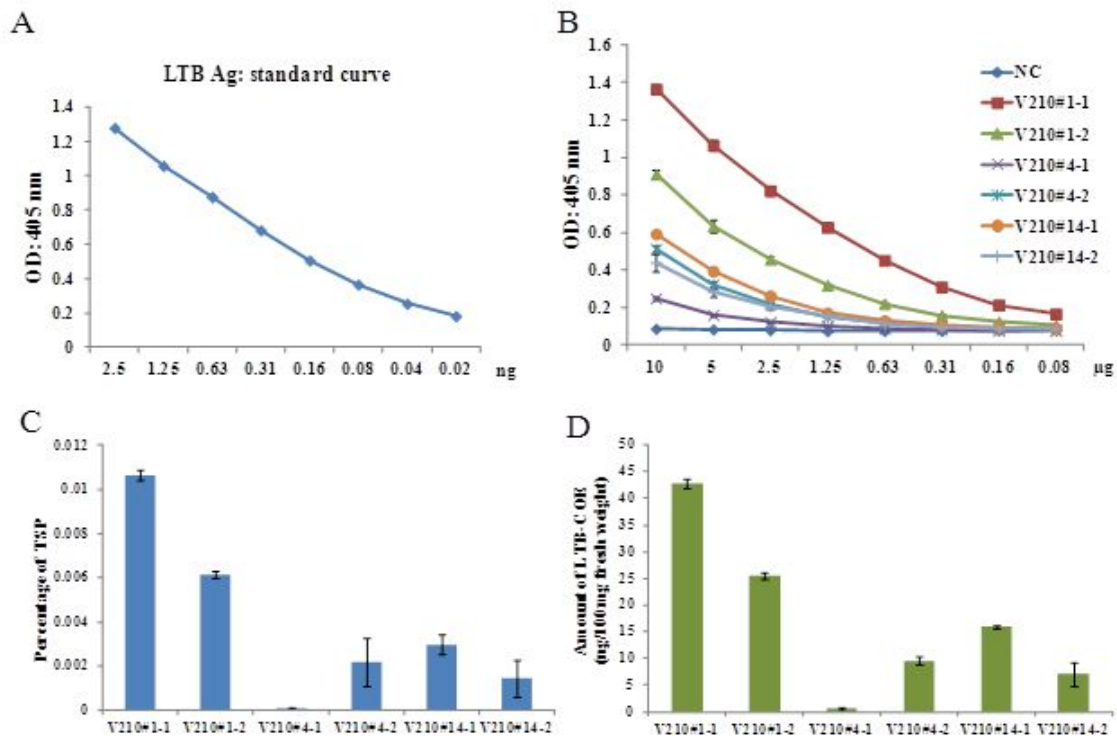


그림. 4 형질전환 식물체에서 LTB-COE 융합항원단백질의 GM1-ganglioside에 대한 결합 능력과 항원단백질의 발현량.

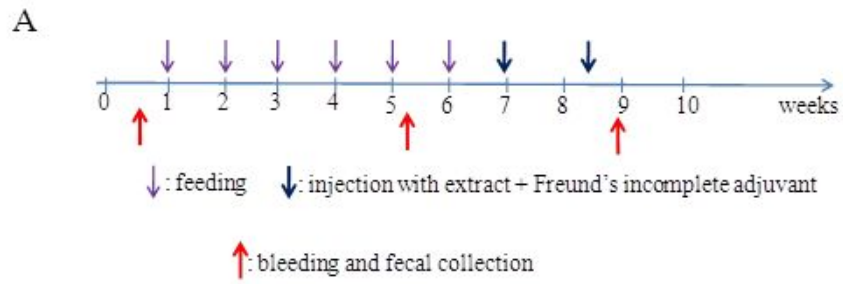
A. The known amount of bacterial LTB was used to make a standard curve. B. The binding affinity of protein extract to GM1-ganglioside. Estimation of the percentage of TSP (C) or amount per 100 mg of fresh weight (D) of LTB-COE fusion protein expressed in transgenic leaf tissues line #1, #4 and #14.

다. 형질전환 식물체를 이용한 실험동물에서 면역반응 유도 분석

(1) 실험동물 BALB/c 쥐를 Dong Yang Oriental company에서 구입하여 6 마리씩 3 그룹으로 나누어 사용하였다(그림 5). 6 주 동안 매주 경구적인 방법으로 냉동건조한 형질전환 식물체의 가루를 PBS buffer 2 ml에 녹여서 먹이는 방법을 사용하였다. 쥐에 먹이기 전 8 시간 동안 먹이를 주지 않았다. 4 주째 먹인 후 10일이 지난 후에 혈액과 분변을 채집하였다. 채집한 혈액은 실온에서 1 시간 동안 방치하고 얼음에 한 시간 동안 보관한 뒤에 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리를 하여 serum을 얻은 후에 -70°C 에 보관하였다. 분변은 200 mg당 0.01% sodium azide를 포함하는 PBS buffer 1 ml로 녹이고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 추출물을 -70°C 에 보관하여 항원단백질에 대한 항체 분석을 하는데 이용하였다.

(2) 항원단백질에 특이적으로 유도된 serum IgG를 분석하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 항원단백질에 특이적인 serum IgG 항체를 분석하기 위하여 bacterial LTB (0.8 ug/ml) 또는 bacterial COE (0.8 ug/ml)을 가지고 ELISA plates를 coating하고 채취한 serum을 각각 1:25와 1:4로 희석하여 사용한 후에 anti-mouse IgG (Sigma A-3688)를 이용하여 coating한 항원단백질에 결합하는 IgG 항체를 분석한 결과 그림 6에서와 같이 그룹 2와 3에서 LTB에 특이적인 항체를 대조군에 비해서 많이 유도되는 것을 확인하였고 COE 항원단백질에 대한 IgG 항체 유도는 대조군에 비해 크게 증가되지 않았음을 확인하여 LTB에 대한 IgG 항체는 강하게 유도되었음에 불구하고 융합된 COE에 대한 IgG 항체는 강하게 유도되지 않은 것으로 확인하였다.

(3) 항원단백질에 특이적으로 유도된 fecal IgA를 분석하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 항원단백질에 특이적인 fecal IgA 항체를 분석하기 위하여 bacterial LTB (0.8 ug/ml) 또는 bacterial COE (0.8 ug/ml)을 가지고 ELISA plates를 coating하고 채취한 fecal 추출물을 첨가하여 항원단백질에 결합 시킨 후에 anti-mouse IgA (Sigma A-4937)를 이용하여 coating한 항원단백질에 결합하는 IgA 항체를 분석한 결과 그림 7에서와 같이 그룹 2에서 LTB에 특이적인 항체를 대조군에 비해서 유도되는 것을 확인하였고 특히 마지막 2 주간 주사로 boosting하여 얻은 IgA 항체는 면역반응이 강하게 증가되었음을 보였다. LTB-COE를 발현하는 형질전환 식물체와 adjuvant로 cholera toxin을 같이 먹인 그룹 3에서 LTB 특이적인 IgA 항체가 아주 강하게 유도됨을 확인하여 CT를 adjuvant로 사용하여 IgA 항체가 크게 증가함을 확인하였다. COE 항원단백질에 대한 IgA 항체 유도는 대조군에 비해 크게 증가되지 않았음을 확인하였다.



B

No.	Constructs	Amount of LTB-COE Ag
Group 1	Wildtype leaves	0 μg
Group 2	200mg of transgenic leaves	1 μg of LTB-COE
Group 3	200mg of transgenic leaves + 5 μg of CT	1 μg of LTB-COE+5 μg of CT

그림. 5 항원단백질을 발현하는 형질전환 식물체를 이용한 실험동물을 이용한 동물실험.

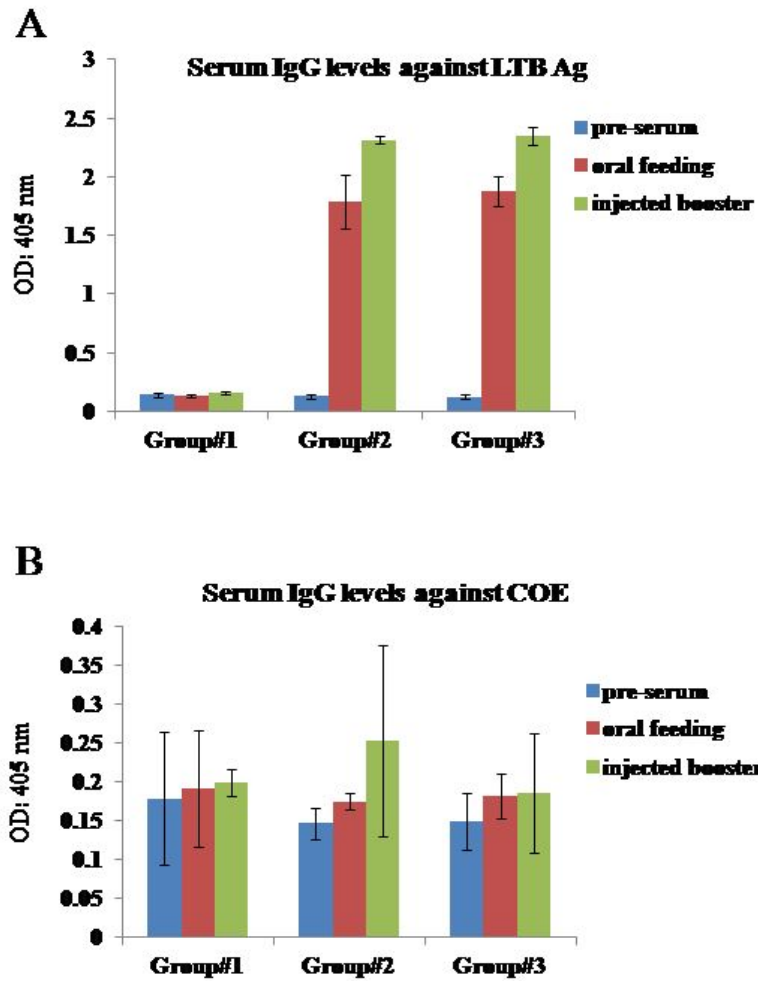


그림. 6 Serum LTB 또는 COE-특이적 항체 분석.

Serum IgG antibody levels against bacterial LTB (A) or COE (B) were determined by ELISA. Blood samples were collected 10 days after feeding for 4 weeks and 3 days after booster for 2 time injections with 10 day interval. The mouse sera were diluted 25-fold. The representative results show the average OD results from six experimental mice.

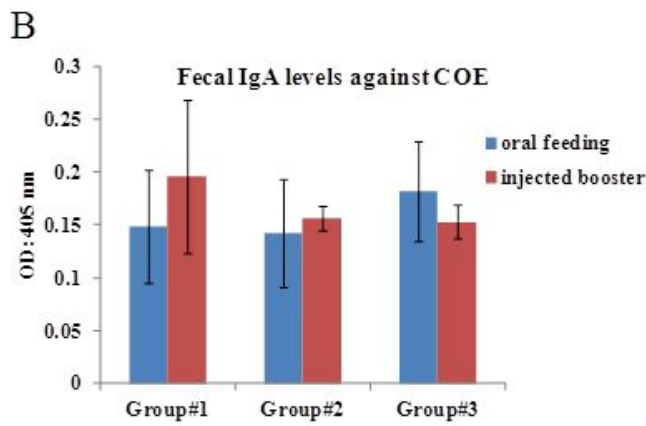
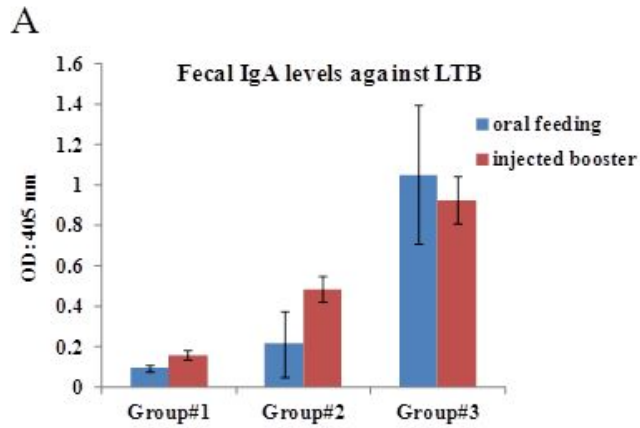


그림 7. Fecal LTB or COE-특이적 IgA 항체 분석.

Fecal IgA antibody levels against bacterial LTB (A) or COE (B) were determined by ELISA. Feces were collected 10 days after feeding for 4 weeks and 3 days after booster for 2 time injections with 10 day interval. The fecal extracts were diluted 4-fold. The representative results show the average OD results from six experimental mice.

다. 형질전환 식물체를 이용한 실험동물에서 ELISPOT 분석

(1) 경구 면역 유도반응

(가) COE 특이적 전신 면역반응 검증

LTB-COE 융합항원단백질을 발현하는 형질전환 식물체의 냉동건조된 가루를 200 mg씩 경구 투여한 mouse의 spleen에서 얻은 lymphocyte로부터 COE 특이적 IgG와 IgA를 분비하는 세포의 수를 ELISPOT으로 확인하였다(그림 8과 9).

그림 8에서 보는 것처럼 각각 transgenic, LTB-COE, LTB-COE + CT를 경구 투여한 mouse에서 얻은 splenic lymphocyte에서 COE-specific IgG를 분비하는 세포수가 LTB-COE group의 세 마리 중 한 마리에서 신뢰도 있는 증가를 확인할 수 있었다.

그림 9에서 보는 것처럼 각각 transgenic, LTB-COE, LTB-COE + CT를 경구 투여한 mouse에서 얻은 splenic lymphocyte에서 COE-specific IgA를 분비하는 세포수를 확인한 결과 세포의 수는 3 group에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

경구 투여로 유도되는 전신면역반응이 T 세포에 의한 면역반응인지 확인하기 위하여 spleen 으로부터 얻은 lymphocyte를 *in vitro*에서 recombinant COE로 stimulation 시킨 후 tritium uptake 정도를 liquid scintillation counter를 통해 측정하여 항원 특이적 proliferation의 정도를 분석하였다(그림 10).

그림 10에서 보는 바와 같이 control havana group에서도 항원의 자극에 의해 proliferation 경향을 보이며, 다른 두 그룹에서의 세포들의 proliferation 경향이 havana와 유사하기 때문에 항원 특이적 전신 면역반응의 유도 가능성 보다는 식물에서 나오는 면역반응 증강 효과나 혹은 경구내성의 가능성으로 해석할 수 있다.

결과적으로, COE-specific IgG와 IgA를 발현하는 세포 수의 증감이나 항원에 대한 lymphocyte들의 proliferation으로 미루어 보아 항원유전자 형질전환 식물체의 경구 투여를 통해 COE-specific systemic immune response가 유도되었다고 판단하기에는 어려운 것으로 보인다. 그러나 식물에서 발현되는 LTB-COE는 경구 투여 되었을 때 COE-specific IgG를 분비하는 세포 수의 증가 역시 확인되었기 때문에 식물에서 발현되는 항원의 경구 투여 후 전신면역반응 유도의 가능성을 확인하였다고 할 수 있다.

(나) COE 특이적 점막 면역반응 유도 검증

점막면역계는 항원의 유입 및 항원 특이적 면역반응이 유도되는 inductive site와 면역반응의 활동인자 sIgA를 분비할 수 있는 effector site로 나눌 수 있다. 그 중 소장 of inductive site는 Peyer's patch가 effector site는 lamina propria가 가장 대표적이다. 따라서 Peyer's patch와 lamina propria의 lymphocyte를 분리하여 COE-specific IgA secreting cell의 변화를 ELISPOT 을 통하여 확인하였다 (그림 11과 12).

그림 11에서 보는 것처럼 Peyer's patch에서는 COE-specific IgA를 분비하는 세포의 수가 3 group에서 모두 비슷하거나 LTB-COE group에서 COE-specific IgA를 분비하는 세포의 수가 감소하는 경향을 보이는 것을 확인하였다.

그림 12에서 보는 바와 같이 COE-specific IgA를 분비하는 세포의 수가 CT를 adjuvant로 사용하여 경구 투여한 LTB-COE + CT group에서 증가한 것을 확인하였다. 결과적으로 점막에서 COE specific immune response는 유도되지 않았지만, CT와 같은 adjuvant의 사용은 경구면역 반응 유도를 결정하는 주요 요인으로 작용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

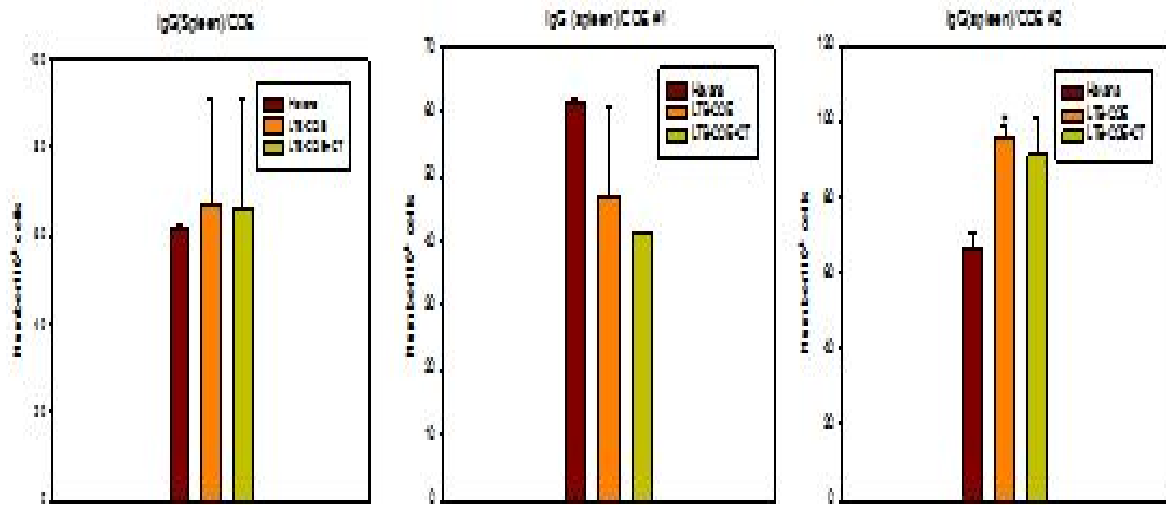


그림 8. The number of COE-specific IgG-secreting cells in spleen

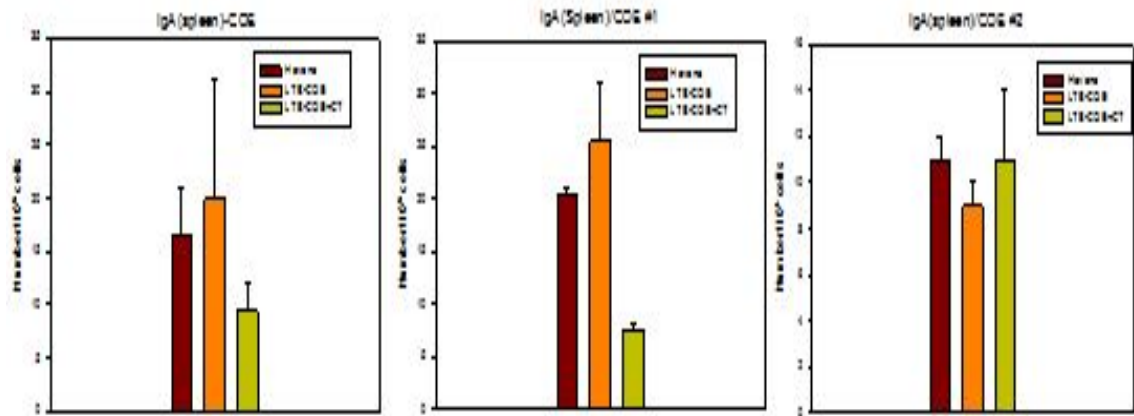


그림 9. The number of COE-specific IgA-secreting cells in spleen

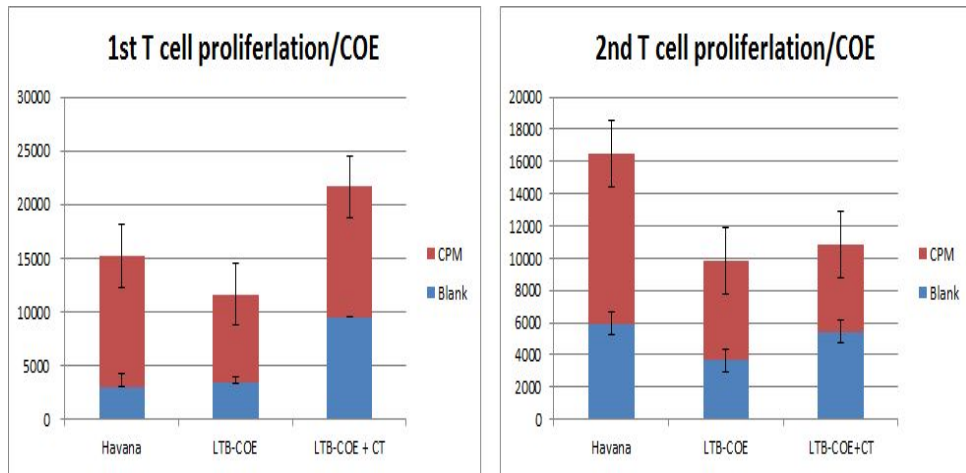


그림 10. Splenocyte proliferation against recombinant COE protein

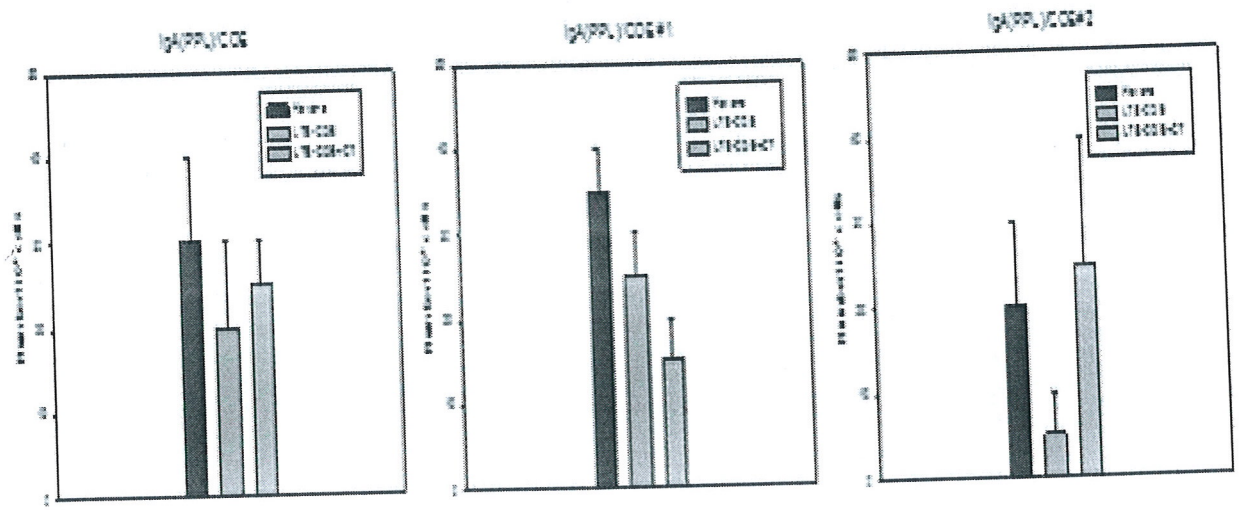


그림 11. The number of COE-specific IgA secreting cells in Peyer's patch

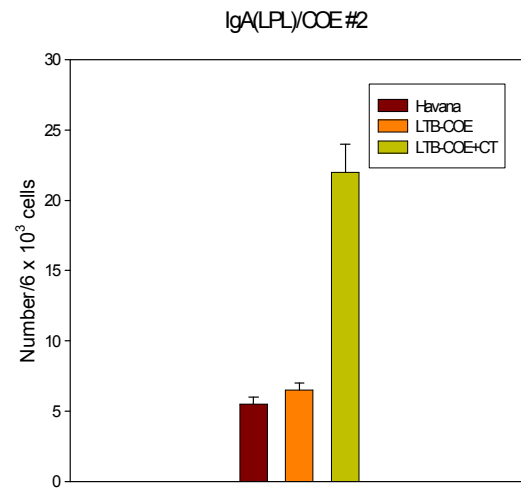


그림 12. The number of COE-specific IgA-secreting cells in lamina propria

(다) LTB 특이적 전신 면역반응 유도 검증

그림 13과 14에서 보는 바와 같이 각 group의 mouse로부터 얻은 splenocyte는 LTB-specific IgG와 IgA를 분비하는 세포를 일부 포함하고 있지만, 그 수가 control인 havana와 비슷한 수준이었다. 따라서 식물에 의한 비특이적 면역증강으로 인한 효과의 가능성이 있으며, LTB-specific IgG와 IgA를 분비하는 세포 수의 감소는 경구내성의 유도에 의한 가능성으로 보인다.

그림 15에서 보는 바와 같이 control havana group에서도 항원의 자극에 의해 proliferation 경향을 보이며, 다른 두 그룹에서의 cell proliferation 경향이 havana와 유사한 것으로 보아 항원 특이적 전신 면역반응의 유도 가능성보다는 식물에서 나오는 면역반응 증강 효과 혹은 경구내성의 가능성으로 해석될 수 있다.

(라) LTB 특이적 점막 면역반응 유도 검증

그림 16 및 17에서 보는 바와 같이 control인 harvana로 인한 면역반응의 결과와 LTB를 포함하는 항원에 의하여 면역반응이 유도된 그룹 사이의 LTB-specific secretory IgA를 발현하는 세포수 변화가 관찰되지 않았기 때문에 LTB 특이적 면역반응의 유도보다는 식물투여에 의한 항원 비특이적 면역증강 효과로 해석된다.

(2) 경구내성이 아닌 oral priming effect 확인

경구백신의 큰 장애물중 하나는 점막을 통해 유입되는 항원에 대한 경구내성의 유도이다. 따라서 경구내성 유도를 파악하기 위하여 systemic challenge(intraperitoneal) 후 항원에 대한 면역반응이 유도되면(COE-specific IgG-secreting cell 수가 증가하고 lymphocyte proliferation이 유도됨) 경구내성이 유도되지 않은 것으로 해석할 수 있다.

(가) Systemic challenge 후 COE 특이적 전신면역 반응 검증

그림 18과 19에서 보는 바와 같이 Set #1에서는 3가지 group에서 모두 COE-specific IgG와 IgA를 분비하는 세포수가 비슷한 것을 확인 할 수 있었으며, 그림 8과 18을 비교해 볼 때 세포수가 비슷하기 때문에 oral priming이 유도되었다고 판단하기에는 문제가 있었다. 하지만 Set #2에서는 control havana에 비교하여 LTB-COE group이 COE-specific IgG-secreting cell이 많은 것으로 측정되었다.

그림 20에서 보는 바와 같이 systemic challenge 후 얻은 splenocyte들은 항원에 대해 proliferation을 하지 않아 경구내성의 유도 가능성이 보다 높은 것으로 판단되었다.

(나) Systemic challenge 후 COE 특이적 점막면역 반응 검증

점막면역 유도조직인 Peyer's patch와 lamina propria의 경우 Set #1은 3 group에서 COE-specific IgA가 발현되는 세포 수가 비슷한 경향이 확인되는 반면 Set #2는 LTB-COE group이 2배 이상 많은 수가 관찰된다. Set #1의 경우 havana group의 높은 수의

COE-specific IgA 세포들의 관찰은 식물에 의한 면역 증강효과로 생각되며, Set #1 과 #2에서 점막면역반응은 유도 되고 있지만 항원 특이적 경향성 보다는 식물에 의한 면역증강효과 가능성이 더 높은 것으로 해석되었다.

(다) Systemic challenge 후 LTB 특이적 전신면역 반응 검증

그림 23에서 보는 것처럼 Set #1에서는 havana의 결과로 미루어 식물에 의한 면역증강효과로 해석되며, Set #2의 경우 LTB-COE에 의한 LTB-specific IgG를 분비하는 세포가 spleen에서 증가한 것으로 관찰된다. 또한 그림 24을 통해 항원에 대해 splenocyte들이 proliferation 하지 않았음을 확인하였다.

(라) Systemic challenge 후 LTB 특이적 점막면역 반응 검증

그림 25에서 보여 주는 것처럼 LTB 특이적 점막 면역반응이 유의성 있게 유도 되지 못한 것으로 파악된다. 결과적으로 systemic challenge 후 개체별 큰 차이를 보이기는 하지만 전신면역에서는 경구내성이 유도 되었거나 oral priming이 유도 되지 못하여 항원에 대한 면역반응이 낮은 것으로 생각되고, 점막면역에서는 havana의 결과와 미루어 항원 특이적 면역반응보다는 항원 비특이적 면역 증강효과가 유도된 것으로 판단되었다.

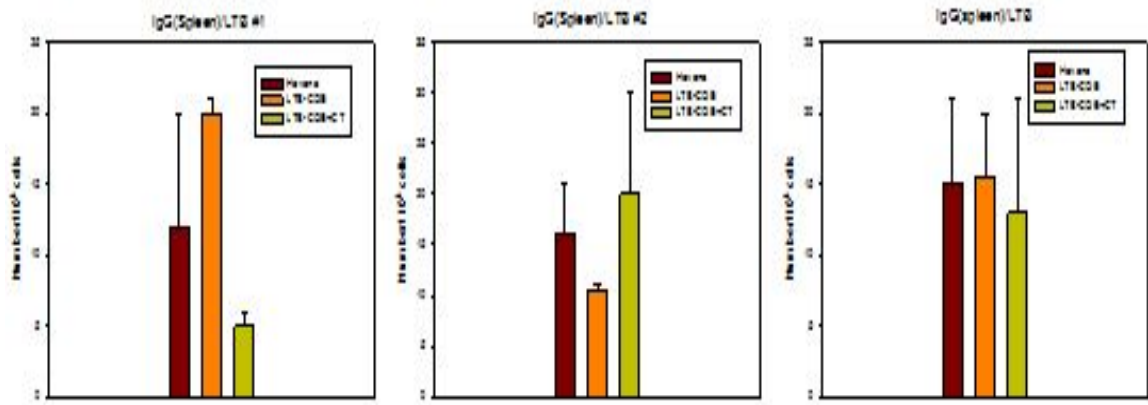


그림 13. The number of LTB specific IgG secretory cells in spleen

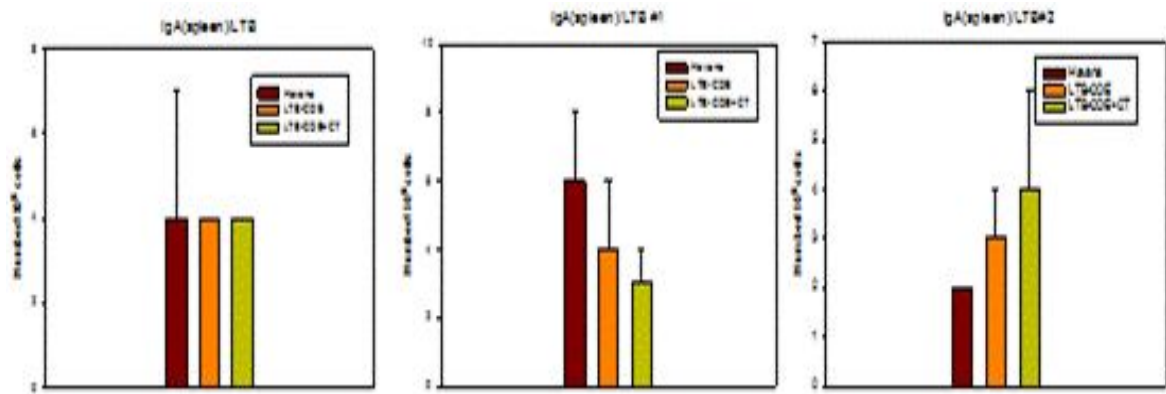


그림 14. The number of LTB specific IgA secretory cells in spleen

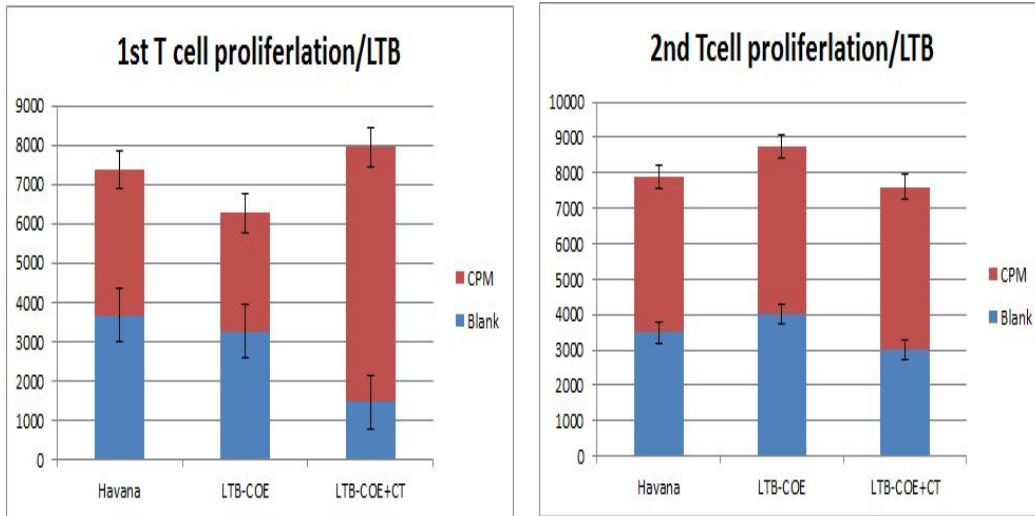


그림 15. Splenocyte proliferation against LTB protein

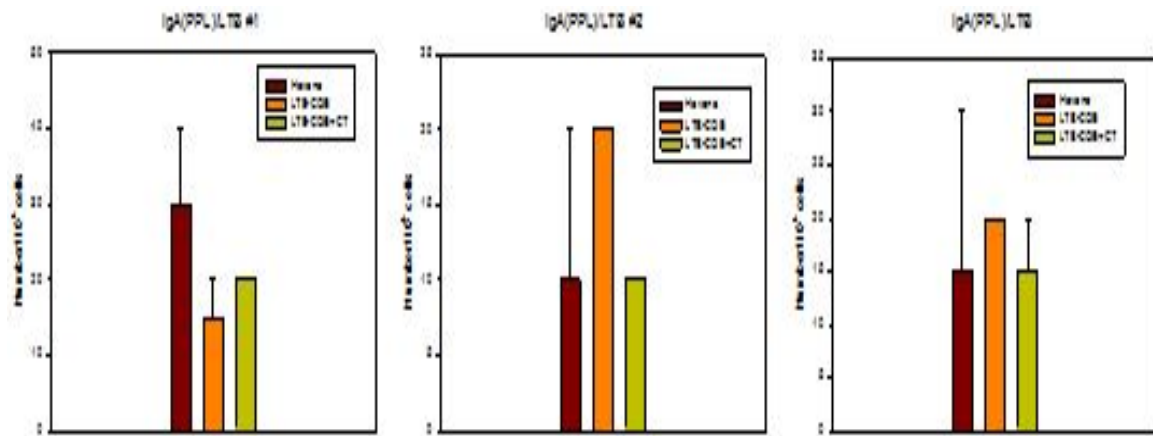


그림 16. The number of LTB specific IgA secretory cells in peyer's patch

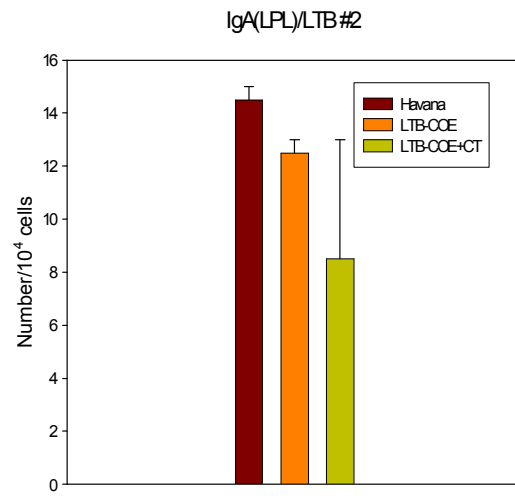


그림 17. The number of LTB specific IgA secretory cells in lamina propria

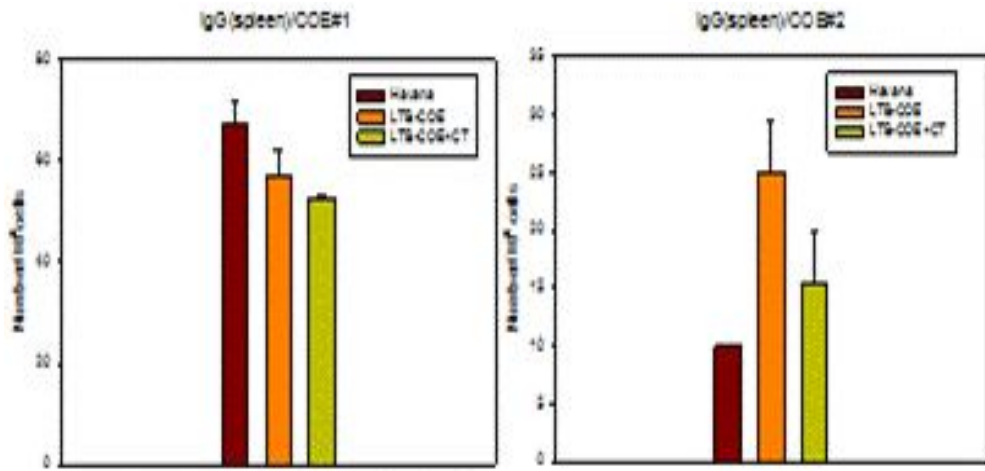


그림 18. The number of COE-specific IgG-secreting cells in spleen

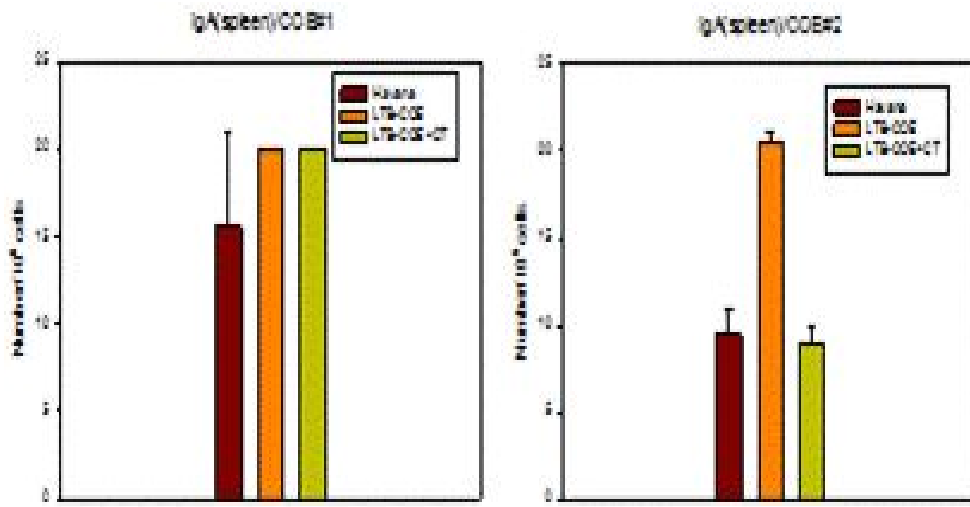


그림 19. The number of COE-specific IgA-secreting cells in spleen

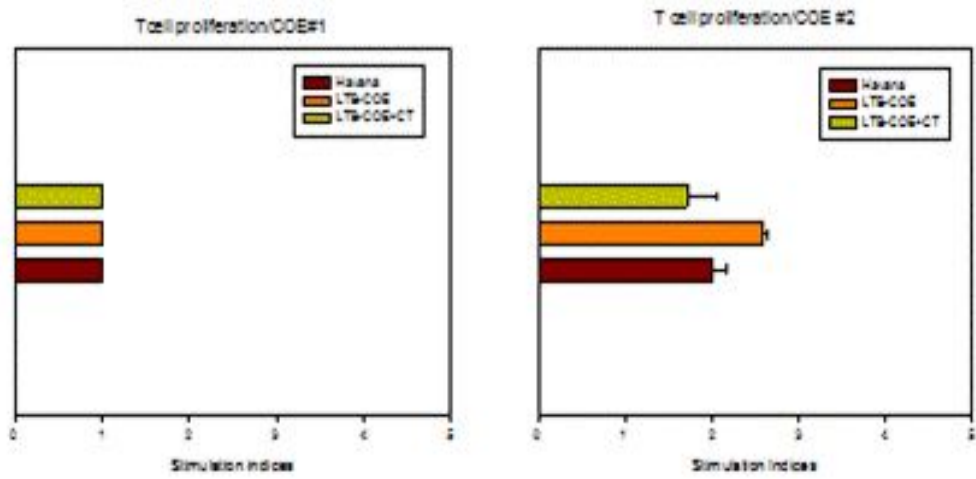


그림 20. Splenocyte proliferation against recombinant COE protein

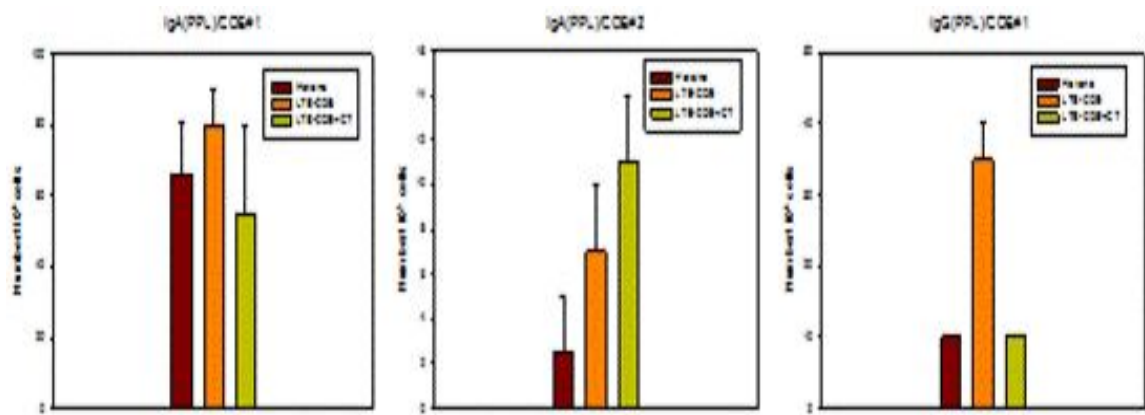


그림 21. The number of COE-specific IgG- or IgA-secreting cells in Peyer's patch

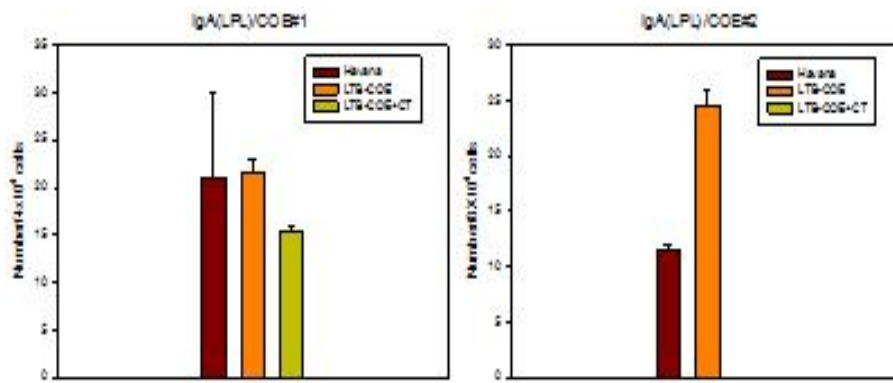


그림 22. The number of COE specific IgA secretory cells in lamina propria

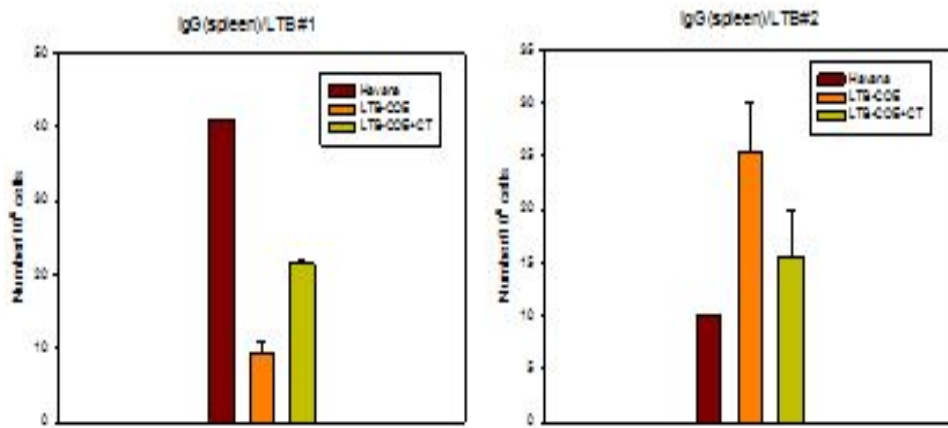


그림 23. The number of LTB-specific IgG-secreting cells in spleen

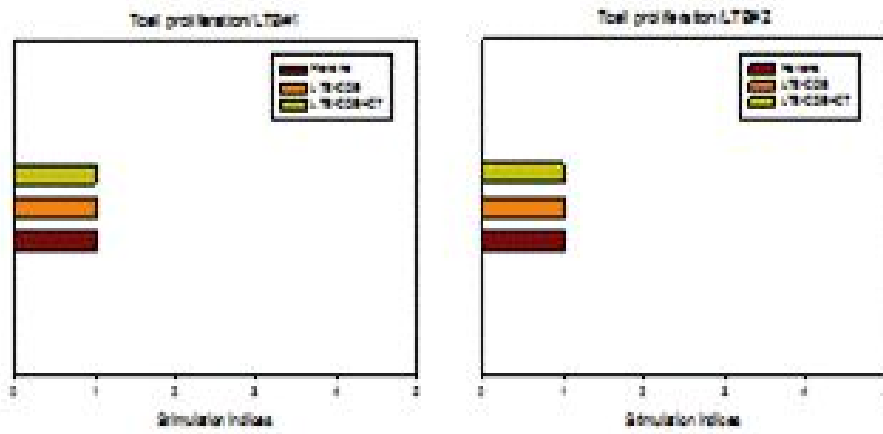


그림 24. Splenocyte proliferation against LTB protein

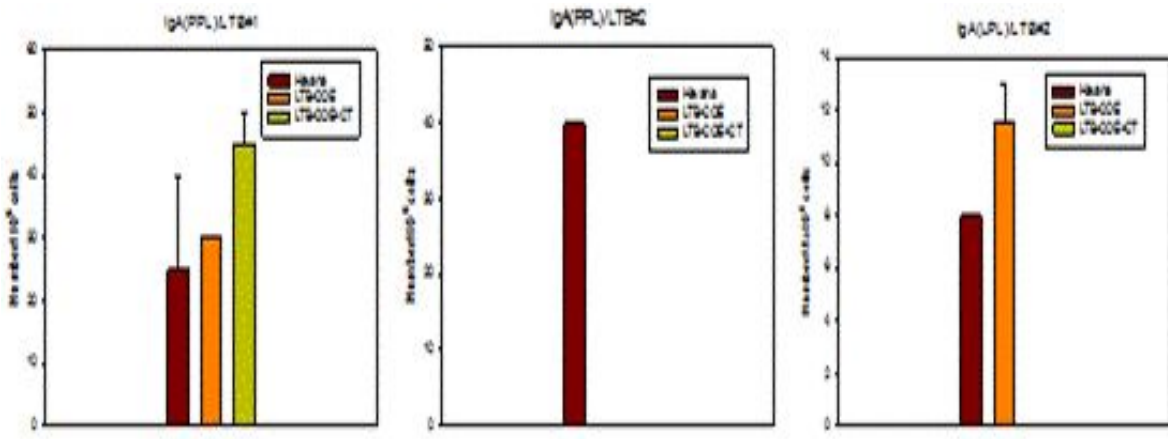


그림 25. The number of LTB specific IgA in peyer's patch or lamina propria

제 3 절 목적동물을 이용한 돼지유행성설사병 및 전염성위장염 생체방어 능력 검정 (제 2 협동과제-국립축산과학원)

실험동물을 이용한 형질전환 감자 및 담배의 항체 유도효과가 확인됨으로 목적동물인 돼지를 이용한 돼지유행성설사병 및 전염성위장염 생체방어능력을 검정하였다.

1. 시험동물

가. 시험목장

본 시험은 국립축산과학원 축산자원개발부가 보유하고 있는 순종돼지(랜드레이스 및 요크셔)를 이용하였다. 돈군은 종돈장방역관리규정에 따라 구제역(FMD), 돼지열병(HC), 오제스키, 돼지생식기호흡기증후군(PRRS) 검사를 실시하고 있으며 이러한 질병에 대해 음성을 유지하고 있다. 또한 본 시험의 대상 질병인 돼지유행성설사병(PED)과 전염성위장염(TGE) 바이러스 항원에 음성으로 유지되어 온 목장이다. 본 시험에 공시된 모돈은 돼지유행성설사병 및 전염성위장염 혈청학적 중화항체가 음성이었으며, 모든 시험은 국립축산과학원 동물실험윤리위원회 승인을 받고 규정에 따라 실시하였다.

PED 및 TGE에 대한 형질전환 임신모돈의 항체 형성을 조사를 위한 시험구 배치와 처리는 표 1과 같이 구분하여 실시하였다. 모돈은 종부 후 임신진단을 거쳐 임신이 확인된 개체를 선발하여 공시하였고, 임신모돈 사양관리는 한국표준사양지침 및 국립축산과학원 관행에 따라 실시하였다.

나. 모돈 백신접종

각 처리구당 형질전환식물체 경구백신 처리구는 3두, 형질전환식물체 대조구는 처리구당 1두, 기존 상용백신 처리구는 2두씩 배치하였다. 임신모돈에 사용된 형질전환식물체인 형질전환담배 및 일반담배 건조 분말은 전북대학교에서, 형질전환감자 및 일반감자 건조분말은 한국생명공학연구원에서 공급받아 사용하였다. 형질전환식물체 건조분말은 분만 예정일 4주전부터 1주 간격으로 총3회 사료에 혼합하여 급여하였다. 상용백신처리구는 TGE와 PED 혼합백신(고려B&P, 한국)을 분만전 5주와 3주에 근육접종하였다. 구제역백신(Decivac[®], Intervet, Netheland)은 임신모돈에 대하여 분만전 4주에, 호흡기혼합백신(Res-Vac[®], 한국미생물, 한국)은 분만 3주전에 근육접종하였다.

다. 샘플채취

백신 항체가 측정을 위한 임신모돈 채혈은 백신처리 또는 접종전부터 1주일 간격으로 분만 후 2주까지 경정맥에서 채혈하였고, 분만시 임신모돈의 초유 50cc를 채취하여 항체가 분석에 사용하였다. 처리한 모돈 전두수에 대한 백신접종과 형질전환식물체 급여로 인한 부작용 등은 사료섭취 행동, 백신접종 부위 이상유무, 혈액검사 수치로 판정하였다. 혈액학치는 채혈 후 EDTA3K 진공튜브에 담아 자동혈구분석기(Hema-Vet HV950FS, Drew Scientific Inc. USA)로 검사하였다.

모돈과 자돈에서 채취한 혈액은 항응고제가 들어있지 않는 튜브에 담아 실험실로 이송한 후

300rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 eppendorf tube에 옮겨 담아 -20℃에 보관하였다. 검사시 해동 후 56℃에서 30분간 비동화 후 이용하였다. 초유 채취는 분만 당일 시험 모돈의 유방과 유두를 깨끗이 소독한 후 손으로 50ml 멸균튜브에 채취하였고, 초유는 -20℃에 보관하여 해동 후 14,000rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액을 분리하여 56℃에서 30분간 비동화 후 이용하였다.

2. 모돈에 대한 형질전환식물체 경구백신 급여효과

가. 시험돈 분만 결과

PEDV-형질전환담배 급여 처리 모돈 2두는 11두, 1두는 10두를, PEDV-담배 대조구 급여 처리 모돈은 10두를 분만하였다. TGEV-형질전환감자 급여 처리 모돈 1두에서 13두와 모돈 2두에서 각각 10두씩 분만하였다. 상용백신 처리구는 모돈에서 각각 10두씩 분만하였다. 이러한 분만 결과는 일반 임신모돈에서 분만한 결과와 차이가 없는 것으로 나타났다.

나. 시험모돈 안정성평가 결과

처리한 모돈 전두수에서 백신접종과 형질전환식물체 급여로 인한 부작용 등은 관찰되지 않았으나 형질전환식물체를 임신모돈 사료에 혼합하여 급여시 모돈 개체의 섭취형태에 따라 섭취 시간의 차이만 관찰되었다. 또한 혈액검사 결과는 정상참고범위 내에 있어 형질전환식물체 급여로 인한 모돈의 이상반응은 없는 것으로 판정되었다.

다. 초유 및 혈청 면역글로블린

초유 및 혈청면역글로블린 측정은 다음과 같이 실시하였다. ELISA용 항원은 KPEDV-9(10^5 TCID₅₀/ml) 바이러스를 초원심 분리하여 정제한 항원을 carbonate coating buffer(pH 9.6)에 적당량 희석배수로 하여 ELISA용 plate에 100 μ l씩 각 well에 넣은 다음 4℃에서 overnight시킨다. PBS-T(PBS with 0.05% Tween20)에 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 세척한 다음 5% skim milk 함유된 PBS 200 μ l를 각 well에 넣어 37℃에서 1시간 blocking시킨다. PBS-T(PBS with 0.05% Tween20) 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 세척한다. 가검 혈청은 PBS-T로 1,000배, 초유는 PBS-T로 10,000배 희석하여 각 well에 100 μ l씩 넣어 37℃에서 1시간 반응시키고, PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 세척한다. anti-porcine IgG와 IgA로 HRP conjugate는 PBS-T를 25,000배로 희석하여 각 well당 100 μ l씩 넣어 37℃에서 30분에서 1시간 반응시킨다. TMB substrat(eBioscience) 10분간 발색시킨 후 2NH₂SO₄로 중단시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정한다.

모든 초유 IgA와 IgG 수치는 각 처리구에서 비슷한 경향을 나타내었으나 PEDV-형질전환담배 처리구 1두에서 약간 높은 수치를 나타내었다. 모돈 혈청내 IgG와 IgA 수치도 각 처리구 간 차이가 나타나지 않고 유사한 경향을 나타내었다.

표1. 형질전환식물체 경구백신 시험모든 처리구 배치 및 분만 결과

처리구	모든두수	처리 방법	분만자돈	비고
PEDV-경구	3	건조분말 58g/두 1주간격 3회 급여	31두	PEDV-형질전환담배
PEDV-경구 대조구	1	건조분말 58g/두 1주간격 3회 급여	10두	일반담배
TGEV-경구	3	건조분말 125g/두 1주간격 3회 급여	28두	TGEV-형질전환감자
TGEV-경구 대조구	1	건조분말 125g/두 1주간격 3회 급여	12두	일반감자
상용백신구	2	TGE/PED 혼합생균백신 분만4주, 2주전 2회	20두	T·P vac [®] (고려 B&P)

표 2. 형질전환식물체 경구백신 처리 전·후 시험모돈의 혈액학치 변화

처리구 (두수)	항목*	평균 값							참고 범위
		4주전	3주전	2주전	1주전	분만	1주	3주	
PEDV-경구 (3)	WBC	20.5	29.1	39.7	25.0	20.6	20.3	19.5	WBC : 10-22 NE : 3.2-10 LY : 4.5-13 RBC : 5-8 HB : 10-18 HCT : 33-50
	NE	11.2	18.3	25.6	14.3	12.9	10.6	8.5	
	LY	6.1	7.7	9.7	8.8	6.0	7.6	9.6	
	RBC	7.3	7.6	6.0	6.4	6.7	6.2	8.4	
	HB	13.3	13.0	10.7	10.6	11.8	11.6	14.5	
	HCT	40.8	43.2	34.5	36.4	43.8	47.5	53.5	
PEDV-경구 대조구(1)	WBC	10.7	14.9	12.9	12.0	21.0	19.0	20.7	
	NE	3.7	8.2	4.3	6.2	12.8	12.5	9.4	
	LY	4.3	4.4	5.1	4.6	6.0	6.2	9.1	
	RBC	7.2	7.4	7.0	6.8	6.9	6.7	7.2	
	HB	13.0	13.2	13.3	11.8	12.5	12.0	14.4	
	HCT	44.2	44.6	43.5	42.3	45.9	44.7	48.9	
상 용 백 신 (2)	WBC	22.1	24.0	28.7	26.0	27.8	22.9	24.3	
	NE	11.8	16.0	18.6	17.0	17.0	12.1	14.9	
	LY	5.8	6.6	6.3	7.3	7.2	7.7	8.0	
	RBC	7.7	7.6	7.2	6.3	5.5	7.0	7.6	
	HB	13.7	13.2	13.0	10.3	9.4	13.0	13.4	
	HCT	44.4	42.0	42.1	36.3	34.4	36.5	47.8	
TGEV-경구 (3)	WBC	15.4	16.8	16.6	13.4	12.2	10.2	11.7	
	NE	6.0	9.4	8.5	4.9	5.0	4.8	4.7	
	LY	5.9	5.3	5.3	6.3	5.1	4.2	6.2	
	RBC	6.4	6.8	7.7	6.2	6.5	6.8	6.5	
	HB	12.0	12.3	16.9	11.5	11.9	12.2	11.8	
	HCT	39.7	42.2	49.0	40.3	48.6	49.2	44.6	
TGEV-경구 대조구(1)	WBC	11.1	12.5	11.3	11.5	11.5	9.5	10.3	
	NE	5.6	7.0	6.2	6.2	6.4	3.5	4.5	
	LY	4.2	3.4	3.9	4.1	4.2	5.2	3.8	
	RBC	6.0	7.8	6.9	6.3	6.9	7.5	7.6	
	HB	11.1	14.4	12.8	11.7	12.1	12.6	14.4	
	HCT	37.6	49.6	44.0	40.1	48.6	51.7	55.6	

*항목) WBC: white blood cell($\times 10^3/\mu\ell$), NE: neutrophil($\times 10^3/\mu\ell$), LY : lymphocyte($\times 10^3/\mu\ell$), RBC : red blood cell($\times 10^6/\mu\ell$), HB : Hemoglobin(g/dL), HCT : Hematocrit(%)

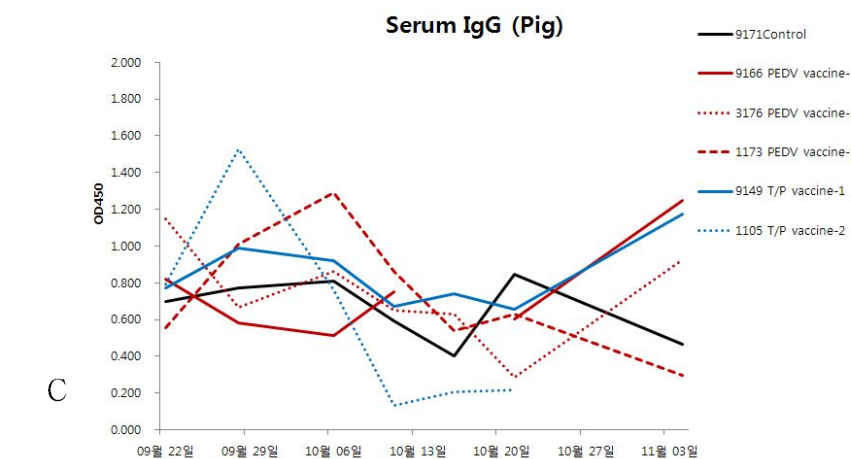
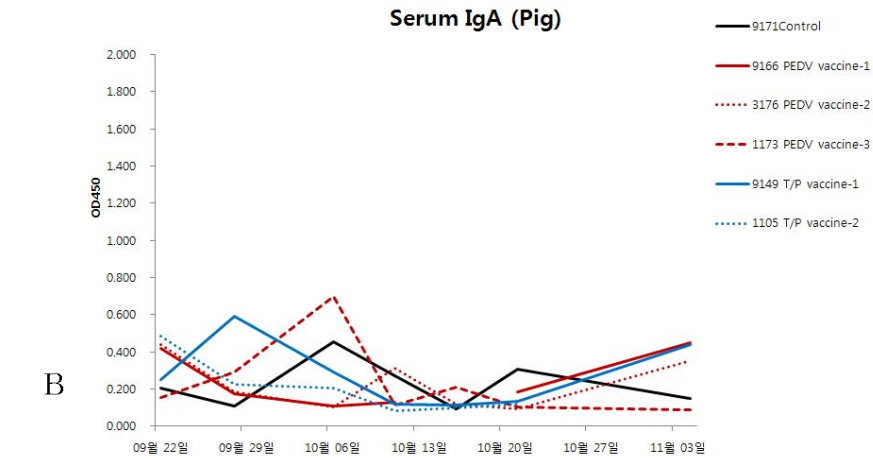
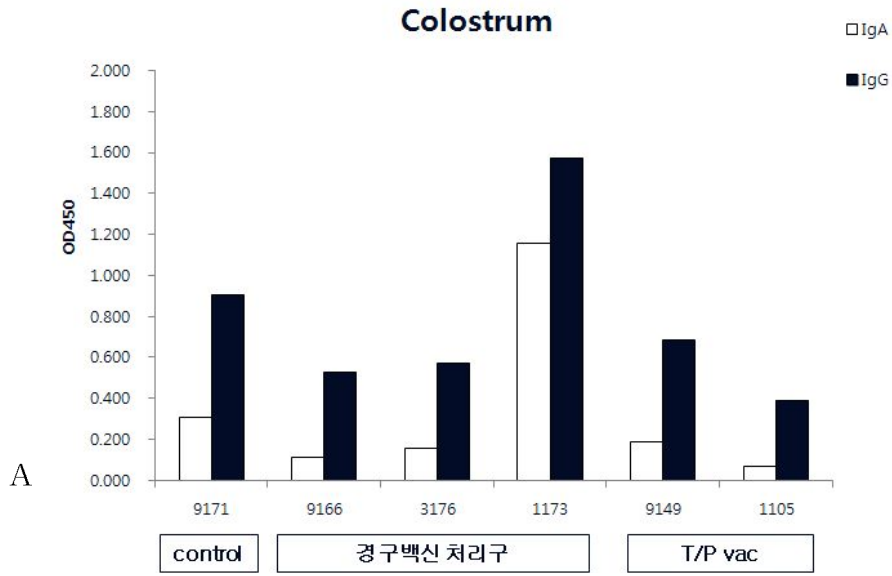


그림 1. PEDV 시험모돈의 초유 및 혈청 면역글로블린 농도 변화. A. 초유, B. 혈청 IgA, C. 혈청 IgG

3. PED바이러스 공격접종에 대한 자돈 방어력 평가

가. 자돈 시험구 배치

공격접종에 공시된 자돈은 생후 1주일령에 모돈에서 이유시켜 국립농수산대학 시험돈사로 이송후 사용하였다. 자돈 시험구 배치는 각 처리구별로 공격접종구 6두씩 3처리, 비공격접종구(대조구) 3두씩 1처리구로 나뉘어, 공격접종구와 비공격접종구를 각기 다른 별도의 장소에 배치하여 처리하였다.

나. 자돈 시험구 관리

이유자돈은 대용유(ISILAC, Hanyang Feed Ind. Korea)를 생후 2주령까지 3시간 간격, 2주 후부터 3주령까지 4시간 간격으로 자유 급식하였으며 사료는 자돈용 1호사료(퓨리나)를 시험시작부터 순차시켜 종료시까지 무제한 자유 급식하였다. 시험에 사용한 격리돈사는 실내온도를 30℃ 전후에 맞춰 조정하였고 보온등과 보온판을 추가 설치하였다. 시험자돈은 공격접종 실시 전 이동 스트레스 완화를 위해 1일 동안 순차 시킨후 공격접종을 실시하였다.

다. 공격접종 및 임상증상 평가

이유자돈에 대한 PEDV 공격접종은 충남대학교 전염병학교실에서 분양받은 PEDV(CNU-1)를 자돈에게 두당 2 ml을 위장용튜브카테터(JMS feeding tube, (주)한국메디칼 사푸라이)를 이용 위내 접종하였다. 이유자돈은 PEDV 공격접종전부터 종료 시까지 매주 채혈과 체중을 조사하였다. 자돈 임상증상 발현여부는 3시간 간격으로 분변 상태에 따라 4단계, 정상(0), 항문주변 오염(1), 설사(2), 심한설사(3)로 분류하여 평가하였다. 분변상태를 확인한 후 자돈 매트와 바닥을 깨끗이 물로 청소하여 설사발생 유무 관찰을 확인할 수 있게 하였다.

라. 혈청중화시험

Vero cell를 α -minimum essential medium(MEM)에 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제를 첨가하여 계대배양하여 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)를 확인한 후 Karber method로 TCID₅₀계산하였다. 혈청은 2배수 희석한 다음 100 μ l의 200TCID₅₀ PEDV를 동량으로 혼합하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 그리고 2 \times 10⁵cell/ml의 Vero cell를 100 μ l씩 전 well에 분주하고 37℃ CO₂ 배양기에 3~7일간 배양 후 CPE를 관찰하였으며 혈청중화항체는 최고 혈청희석배수의 역수로 계산하였다. 실험시에는 세포대조구, 양성혈청대조군 및 사용하는 항원바이러스의 역가감정을 위한 back titration을 실시하였다.



그림 2. PEDV 공격접종 차단 관리사 전경. A. 공격접종 처리구, B. 비접종 처리구

표 3. PED 바이러스 공격접종 및 미접종 자돈의 설사증상 변화

처리구	PEDV 공격접종구(두수)												대조구 (10)				
	PEDV-경구 대조구(6)				상용백신구 (6)				PEDV-경구 (6)								
분변 점수	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
공격 접종 후 기간	0	6			6				6				10				
	3일			6				6				6	8	2			
	1주			3	3			1	3, *(2)			3	3	5	3	1	*(1)
	2주			3	3			2	2			4	2	8		*(1)	
	3주		2	2	*(2)		3	1			6			8			
	4주	4	1			4				6				8			

분변점수 : 분변 상태에 따라 4단계, 정상(0), 항문주변 오염(1), 설사(2), 심한설사(3)로 분류

* (숫자) : 폐사한 두수로 설사로 인한 직접적인 폐사는 없음

표 4. PED 바이러스 공격접종 및 미접종 자돈의 체중 변화

그룹	처리구	두수	평균체중 (kg)					비고
			8일	12일	14일	21일	28일	
PEDV 공격 접 종구	PEDV-경구	6	3.4	3.8	5.2	6.0	9.6	
	PEDV-경구 대조구	6	2.7	3.1	3.7	4.2	6.8	폐사 2두
	상용백신	6	3.0	3.3	4.5	5.6	9.5	폐사 2두
PEDV 비 공격 접종구	PEDV-경구	3	3.7	4.0	5.3	6.3	8.4	
	PEDV-경구 대조구	3	2.9	3.6	5.4	7.1	9.4	
	상용백신	3	3.5	3.5	4	6.1	7.7	폐사 2두(허약자돈)

마. 자돈 임상증상 결과

대조구는 일부 개체에서 생리적인 설사만이 관찰되었으나 공격접종그룹의 모든 시험구 자돈에서는 2일경부터 심한 설사가 발생되었다. PEDV-경구백신구와 상용백신구와는 달리 PEDV-경구대조구는 공격접종 3주후까지 설사가 나타났었고 일부 개체는 4주후까지도 설사 소견을 나타내었다(표 3).

자돈의 평균체중을 비교한 결과 공격접종그룹중 상용백신처리구와 PEDV-경구백신 처리구가 유사한 체중을 나타내었으나, PEDV-경구백신 무처리구는 다른 처리구에 비해 낮은 체중을 나타내었다. 이러한 임상증상의 결과는 PEDV-형질전환담배로 경구백신을 처리한 모돈의 초유를 섭취한 자돈은 상용백신 처리구와 같이 PEDV에 방어력을 가지는 것으로 판단되어진다.

바. 혈청 면역글로블린

자돈에 대한 혈청면역글로블린 수치변화는 그림3과 같다. PED-TGE 상용백신 처리구는 PEDV-형질전환 담배 처리구와 비슷한 혈청내 IgG 변화를 나타내었고, PEDV-대조구 담배 처리구도 차이는 있지만 유사한 변화를 나타내었다.

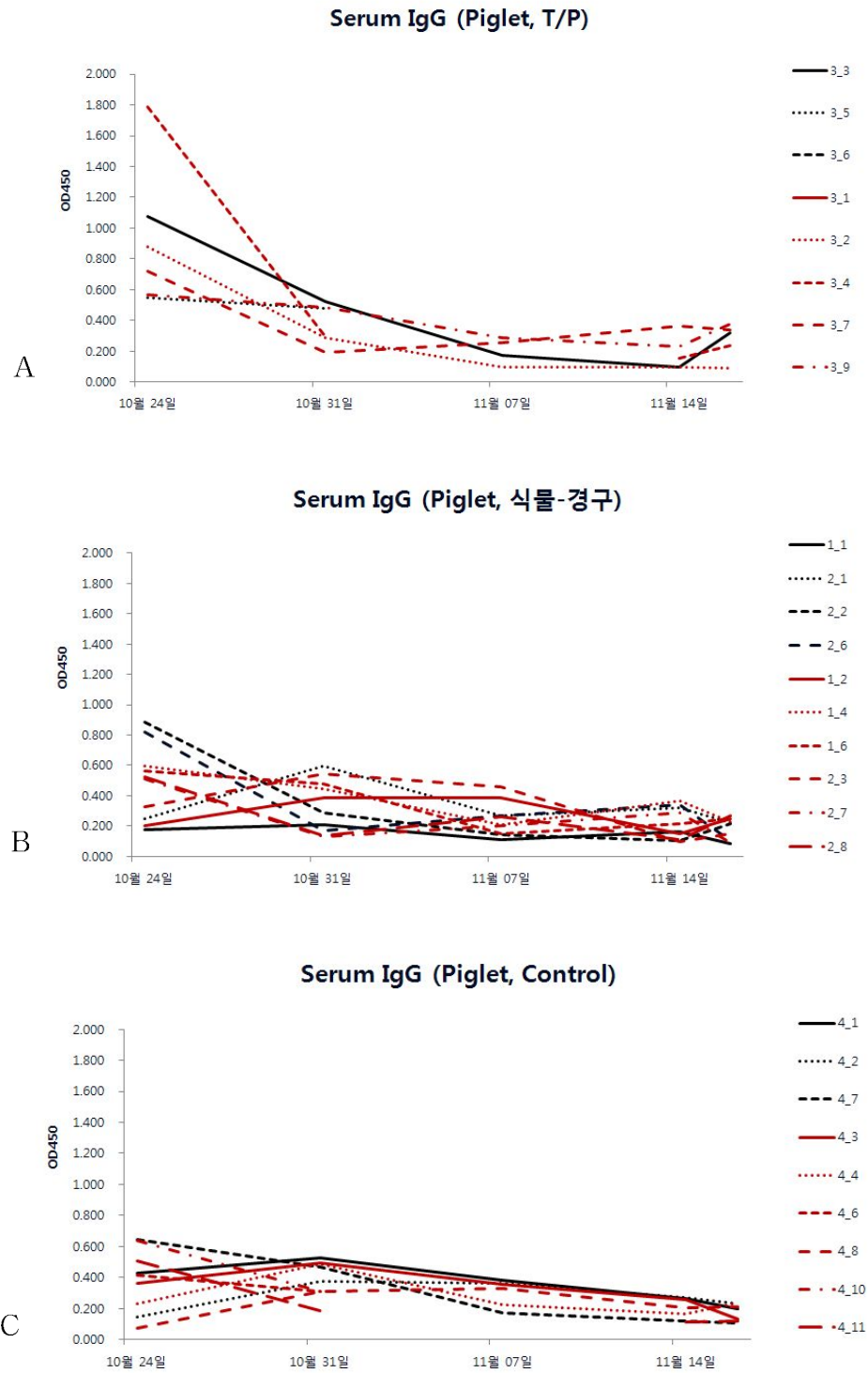


그림 3. PEDV 공격접종자돈 혈청 IgG 농도 분석. A. 상용백신 처리구 생산자돈, B. PEDV-형질전환 담배 처리구, C. 일반 담배처리구.

4. TGE바이러스 공격접종에 대한 자돈 방어력 평가

가. 자돈 관리

공격접종에 공시된 자돈은 생후 1주일령에 모돈에서 이유시켜 국립농수산대학 시험돈사로 이송후 사용하였다. 자돈 시험구 배치는 각 처리구별로 공격접종구 6두씩 3처리, 비공격접종구(대조구) 4두씩 1처리구로 공격접종구와 비공격접종구를 각기 다른 별도의 장소에 배치하여 처리하였다. 이유자돈은 대용유(ISILAC, Hanyang Feed Ind. Korea)를 생후 2주령까지 3시간 간격, 2주 후부터 종료시 4시간 간격으로 자유 급식하였으며 사료는 자돈용 1호사료(퓨리나)를 시험시작부터 순차시켜 종료시까지 무제한 자유 급식하였다. 시험에 사용한 격리돈사는 실내온도를 30℃ 전후에 맞춰 조정하였고 보온등과 보온판을 추가 설치하였다. 시험자돈은 공격접종 실시전 이동 스트레스 완화를 위해 1일 동안 순차 시킨후 공격접종을 실시하였다.

나. 공격접종 및 임상증상 평가

이유자돈에 대한 TGEV 공격접종은 전북대학교 면역학교실에서 분양받은 TGEV로 자돈에게 두당 5 ml을 위장용튜브카테터(JMS feeding tube, (주)한국메디칼 사푸라이)를 이용 위내접종하였다. 이유자돈은 TGEV 공격접종전부터 종료 시까지 매주 채혈과 체중을 조사하였다. 자돈 임상증상 발현여부는 하루 3회 분변 상태에 따라 4단계, 정상(0), 항문주변 오염(1), 설사(2), 심한설사(3)로 분류하여 평가하였다. 분변상태를 확인한 후 자돈 매트와 바닥을 깨끗이 물로 청소하여 설사발생 유무 관찰을 확인할 수 있게 하였다.

다. 자돈 임상증상 결과

대조구는 일부 개체에서 생리적인 설사가 지속적으로 관찰되었으나 공격접종그룹의 모든 시험구 자돈은 공격접종 2일후부터 심한 설사가 발생되었다. TGEV-경구백신구와 상용백신구와는 달리 TGEV-경구대조구는 공격접종 2주후까지 설사가 나타났었고 2두는 지속적인 심한 설사로 인하여 폐사되었다(표 5).

자돈의 평균체중을 비교한 결과 TGEV 접종구와 비접종구 그룹간의 체중 차이는 나타났으나 접종구와 비접종구내 처리구간 차이는 나타나지 않았다. 그러나 공격접종그룹중 상용백신처리구가 TGEV-경구백신처리구 TGEV-대조구에 비해 약간 높은 체중을 나타내는 경향이였다. 이러한 임상증상의 결과는 TGEV-형질전환담배로 경구백신을 처리한 모돈의 초유를 섭취한 자돈은 상용백신 처리구와 같이 TGEV에 방어력을 가지는 것으로 보이나 접종일령, 공격접종 방법 등에 대한 시험이 보강되어야 할 것으로 판단된다.

표 5. TGE 바이러스 공격접종 및 미접종 자돈의 설사증상 변화

처리구		TGEV 공격접종구(두수)												대조구 (12)			
		TGEV-경구 대조구(6)				상용백신구 (6)				TGEV-경구 (6)							
분변 점수		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
공격접 종후 기간 (일)	0	6				5		1		6				8	1	3	
	3			2	4			4	2			4	2		1	6	
	6			5	1	1	2	3			1	5			1		
	9		1	5		2	2	2		2	2	2				4	
	12		*(2)	6		1	5			2		4		10	1	1	
	14	2	2			3	3			5	1			12			

분변점수 : 분변 상태에 따라 4단계, 정상(0), 항문주변 오염(1), 설사(2), 심한설사(3)로 분류

* (숫자) : 폐사 두수

표 6. PED 바이러스 공격접종 및 미접종 자돈의 체중 변화

그룹	처리구	두수	평균체중 (mean ± sd, kg)			비고
			7일	14일	21일	
TGEV- 비공격접종구	TGEV-경구	4	2.8 ± 0.6	3.1 ± 0.7	4.0 ± 0.6	
	TGEV-경구 대조구	4	2.9 ± 0.7	3.3 ± 0.5	4.5 ± 0.4	
	상용백신	4	2.9 ± 0.5	3.5 ± 0.4	4.4 ± 0.5	
TGEV- 공격접종구	TGEV-경구	6	2.7 ± 0.3	2.5 ± 0.2	3.0 ± 0.2	
	TGEV-경구 대조구	6	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.4	3.0 ± 0.6	폐사 2두
	상용백신	6	2.9 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.6 ± 0.3	

4. 결론

실험동물을 이용한 형질전환 감자 및 담배의 항체 유도효과가 확인됨으로 목적동물인 돼지를 이용한 돼지유행성설사병 및 전염성위장염 생체방어능력을 검정하였다. 생후 1주령의 자돈에 대해 돼지유행성설사병 바이러스 10^4 의 TCID₅₀을 2ml을 경구접종(공격접종)하고, 접종 전, 접종 후 1, 2, 3주에 채혈하여 임상증상, 항체 검사를 실시하였다. PEDV-경구백신구와 상용백신구와는 달리 PEDV-경구대조구는 공격접종 3주후까지 설사가 나타났었고 일부 개체는 4주후까지도 설사 소견을 나타내었다. 자돈의 평균체중을 비교한 결과 공격접종그룹중 상용백신처리구와 PEDV-경구백신 처리구가 유사한 체중을 나타내었으나, PEDV-경구백신 무처리구는 다른 처리구에 비해 낮은 체중을 나타내었다. 이와 같은 결과는 돼지유행성설사병바이러스 유전자를 형질전환시킨 담배가 경구백신으로 돼지유행성설사병에 대한 예방효과가 있음을 확인되었다.

생후 1주령의 자돈에 대해 돼지전염성위장염 바이러스 10^5 의 TCID₅₀을 5ml을 경구접종(공격접종)하고, 접종 전, 접종 후 1, 2주에 채혈하여 임상증상, 항체 검사를 실시하였다. TGEV 비정종구는 일부 개체에서 생리적인 설사가 지속적으로 관찰되었으나, 공격접종그룹의 모든 시험구 자돈은 공격접종 2일후부터 심한 설사가 발생되었고, TGEV-경구백신구와 상용백신구와는 달리 TGEV-경구대조구는 공격접종 2주후까지 설사가 나타났었고 2두는 지속적인 심한 설사로 인하여 폐사되었다. 자돈의 평균체중을 비교한 결과 TGEV 접종구와 비접종구 그룹간의 체중 차이는 나타났으나 접종구와 비정종구내 처리구간 차이는 나타나지 않았다. 그러나 공격접종그룹중 상용백신처리구가 TGEV-경구백신처리구 TGEV-대조구에 비해 약간 높은 체중을 나타내는 경향이였다. 이러한 임상증상의 결과는 TGEV-형질전환담배로 경구백신을 처리한 모돈의 초유를 섭취한 자돈은 상용백신 처리구와 같이 TGEV에 방어력을 가지는 것으로 보이나 접종일령, 공격접종방법 등에 대한 시험이 보강되어야 할 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

제 1 절 목표 달성도

1. 연구목표

본 연구의 최종 목표는 돼지 설사병 예방을 위한 차세대 백신 개발의 일환으로 두 종류의 원 인균인 TGEV와 PEDV 항원 단백질을 발현하는 식물체를 이용하여 목적동물 돼지에서의 면역 시험을 수행하고, 그 결과를 통하여 경구백신으로서의 유용성을 최종 확인하는 것이다. 구체적 으로는 TGEV 항원 단백질을 발현하는 형질전환 감자를 대량생산하여 돼지 설사병 예방 백신 개발을 위한 시료로 공급하며 더불어 백신 가능성을 마우스 면역 반응 유도 실험을 통하여 확 인한다. PEDV의 epitope를 포함하는 항원유전자를 포함하고 또한 점막면역계에서 항원단백질 의 흡수를 증진시키는 기능을 가지고 있는 ligand인 LTB를 포함하는 융합항원단백질을 생산 하는 담배식물체를 이용하여 실험동물과 목적동물을 상대로 경구백신으로서의 효용성을 확인 한다. 목적 동물 돼지 실험에서 모든에 각각 단독 투여하여 자돈으로의 면역항체 전이를 확인 하고 공격접종을 통하여 방어능 분석을 하고자 하였다.

2. 연구개발목표 및 평가 착안점

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	TGEV 항원 단백질을 생 산하는 감자 -유래 백신 의 대량생산 및 효능 검 증	○ TGEV 항원단백질을 발현하는 감자의 대량생산	15%	- TGEV 항원단백질의 발현확인 - 마우스 및 목적동물 돼지 실험을 위한 시료 확보
		○ 실험동물에서 항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능	15%	- 실험동물에서 IgG와 IgA 항체 유도여부
	PEDV 항원 단백질을 생 산하는 식물 -유래 백신 의 효능 검 증	○ PEDV 항원단백질을 발현하는 식물체 대량생산	15%	- PEDV 융합항원단백질의 발현 확인 - 동물실험을 위한 시료 확보
		○ 실험동물에서 융합항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능	15%	- 실험동물에서 IgG와 IgA 항체 유도여부
	목적 동 물 을 이용한 TGE 및 PED 생 체 방어 능력 검정	○ 목적동물에서 항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능	20%	- 목적동물에서 IgG 항체 유도 여부 - 혈청중화 시험
		○ 공격접종에 따른 자돈의 방어능 시험	20%	- 공격시험에 대한 방어능 여부 - 형질전환체 급여 안전성 평가

3. 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
○ TGEV 항원단백질을 발현하는 감자의 대량생산	- TGEV 항원단백질의 발현 확인함 - 마우스 및 목적동물 돼지 실험을 위한 시료 확보함	100
○ 실험동물에서 항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능	- 실험동물에서 IgG와 IgA 항체 유도 확인함	100
○ PEDV 항원단백질을 발현하는 식물체 대량생산	- PEDV 융합항원단백질의 발현 확인함 - 동물실험을 위한 시료 확보함	100
○ 실험동물에서 융합항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능	- 실험동물에서 IgG와 IgA 항체 분석함	100
○ 목적동물에서 항원단백질 발현 식물체의 백신으로서의 효능	- 목적동물에서 IgG 항체 유도 여부 - 혈청중화 시험	70
○ 공격접종에 따른 자돈의 방어능 시험	- 공격시험에 대한 방어능 여부 - 형질전환체 급여 안전성 평가	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

현재 국내에서도 식물 경구백신에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 인간 질병에 대한 식물 경구백신보다는 비교적 용이하고 기간이 짧게 소요되는 동물 질병에 집중하는 경향이 있다. 돼지열병(돼지콜레라)에 대한 형질전환 알팔파 백신 개발의 경우 투여 후 돼지에 바이러스를 주사로 접종한 결과 돼지 콜레라가 발병하지 않았다고 밝혔다. 돼지의 흉막폐렴균에 대한 연구에서는 목적동물 돼지에서 효능이 검증되었음이 알려져 있다. 돼지 설사병원균(돼지 대장균 2종과 살모넬라 1종)에서 특이 유전자의 단백질을 생산하는 당근세포를 대량생산하여 당근을 먹인 돼지의 자돈에서 면역효과가 있다고 보고되어 있다. 본 연구는 위와 같은 개발된 식물체의 실제 백신으로서의 효능을 연구하는 사례에 해당되어 앞으로도 계속 이어질 향후 연구의 나아갈 방향을 정하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 식물체에서 항원을 확인하고 마우스동물실험에서 그 효과가 우수하다 하더라도 목적동물을 대상으로 실험할 경우는 투여 방법, 투여 횟수, dosage, 적합한 아주번트의 선택 등과 같은 또 다른 protocol 개발이 반드시 필요하다. 일년으로 끝나는 본 연구의 특성상 부족하거나 시행오차로 생긴 결과물들을 추후 보완하고 반복, 재현하는 실험이 따라준다면 이제 시작 단계에 불과한 이 시점에서 실용화로 이어질 밑바탕이 될 것으로 본다.

다행히 반복적인 추가 실험들이 완성되어 실용 백신으로 자리잡는다면 본 연구에서 직접적으로 언급하고 있는 식물-유래 경구용 돼지 설사병 백신 개발은 앞선 서론에서 언급한 바 대로 축산업에 매우 기여하는 바가 클 것으로 본다. 백신 접종에 따른 스트레스로 인한 생장지연 문제 해결의 필요성, 접종에 소요되는 경제적 부담의 경감이 가능할 것으로 보며, 특히 설사병의 두가지 원인 바이러스에 대한 공동 접근으로 보다 효율적인 설사병 방제가 가능할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- * 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- * 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등
- * 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- * 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

본 연구는 1년차로 종료되는 과제이기 때문에 반복, 재현의 실험을 통한 시행착오를 보완하지 못한다. 하여 본 연구를 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 추가연구를 반드시 수행하여야 한다. 타 연구에서 개발된 식물체를 활용하였기 때문에 단해년이지만 식물재료의 대량생산이 가능하였으며, 이를 이용한 마우스 동물실험에서의 결과는 유의성있게 얻을 수 있었다. 반면, 목적동물인 돼지의 면역유도 실험의 올해 처음 수행되었기 때문에 완벽한 결과는 확보하지 못하였다. TGEV발현 감자의 경구투여군은 일차시험에서 모두가 분만에 실패하여 자돈에의 항체형성 실험과 공격접종을 하지 못하였다. 하여 재실험을 통하여 TGE 바이러스 공격접종에 대한 자돈의 방어력 평가를 수행한 결과, TGEV-경구백신군과 상용백신군과는 달리 TGEV-경구대조군은 공격접종 2주후까지 설사가 나타났었고 2두는 지속적인 심한 설사로 인하여 폐사되었다. PEDV발현 담배의 경구투여에 의한 돼지의 면역실험에서 설사 정도가 경감되었고, 체중변화가 미미하는 등의 임상증상에서 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다. 하여, 본 연구의 성과는 반드시 차후의 추가연구와 타 연구에 활용하는 방안을 마련하여야 할 것이다. 식물백신과 같은 첨단 생명공학기술을 통한 복지 향상이라는 명제는 21세기 지구상에서 가장 중요한 이슈가 될 것이 틀림없으며 따라서 이 분야에 대한 공공 및 산업계에서의 기술 수요는 많을 것으로 예상된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 히브리대학의 기술이전회사인 Yissum 연구개발회사: 항말라리아 천연물질인 artemisinin 생산에 필요한 생합성경로 전체를 코딩하고 있는 형질전환 담배 개발. 이 기술은 담배식물체를 이용해 저렴한 가격의 artemisinin을 생산할 수 있으며 이는 말라리아로 고통받고 있는 개발도상국의 큰 도움을 줄 것으로 기대됨

○ GM식물을 이용하여 구제역을 예방하는 GM 담배 백신 개발: 구제역바이러스 coat protein VP1을 인식하는 siingle chain variable antibody fragment (scFv) 유전자를 담배식물체에서 대량으로 축적하는 시스템을 개발하여 잎이 생산하는 수용성 단백질 대비 약 0.8%까지 축적. 구제역은 해당국가의 축산농가뿐만 아니라 사회 전반의 경제에 심각한 영향을 주는데 값싼 재조합 항체를 이용한 예방주사로 면역력을 높이는 것은 구제역 발생지점의 주변지역 동물들을 보호하기 위한 합리적인 대안 될 수 있음 (캐나다)

○ 항-HIV 단일클론항체 식물체에서 생산, 일부 여성을 상대로 임상실험 돌입: 영국의 Julian Ma 교수는 항-HIV 항체를 생산하는 GM담배를 온실에서 재배하고 있으며 생산된 항체를 이용한 임상실험을 영국 의약건강제품관리청에서 허가받았음을 보고

○ 멕시코 국립자치대학 연구원들은 식물체 내에 상당량의 광견병 바이러스 당단백질을 축적하는 GM당근을 개발: 광견병은 백신이 개발되어 있음에도 불구하고 전세계적으로 특히 개발도상국들에서 지속적으로 보건상의 문제가 되어오고 있다. 연구원들은 식용식물에서 생산되는 백신이 기존 백신을 대신할 수 있는 좋은 대안이 될 것으로 전망됨

○ 세계 최초의 조류독감 저항성 GM 닭 개발: 영국의 에딘버러 대학팀이 인공유전자를 닭에 삽입하여 조류 독감 감염으로부터 집단을 보호할 수 있을 것으로 기대. 조류독감이 가금류 생산에 직면한 실제적 과제이기 때문에 이 연구 결과가 상용화 된다면 우수한 백신 효과를 가져올 것으로 봄

○ Fraunhofer CMB와 iBIO (미국) 은 빨리 자라는 식물의 잎에서 특정 단백질을 대량으로 생산하는 시스템을 개발. 공장의 자동화된 기계들이 씨앗을 심고 묘목을 키우고 목적단백질을 생산하기 위해 바이러트 벡터를 식물에 직접 도입하며 목적단백질에 식물의 조직내에 축적되고 나면 잎을 수거하는 일련의 시스템을 처음으로 개발하였음을 보고

○ 담배와 상추의 잎에서 콜레라 독소와 말라리아의 병원성 단백질을 결합시킨 융합단백질을 생산하는 GMO를 개발 (Henry Daniell 교수): 미국의 플로리다대학 연구팀의 보고에 의하면 이들 식물의 엽록체를 조사한 결과 담배의 경우 각각 13.17%, 10.11% 발현하고 상추의 경우 7.3%, 6.1%를 발현한다고 보고함. 식물에서 백신을 생산하는 작업은 적은 노동력과 기술을 요하며, 간단한 알약의 형태로 공급되고 또한 비싼 비용을 들이는 정제과정이나 냉장보관, 수송, 혈관 내 주입의 필요성이 없기 때문에 기존의 방법에 비해 저렴하여 경쟁력을 가진다고 봄

○ 이들 이외에도 충치 예방을 위한 분비형 항체 백신이 유럽연합에서, 닭의 Newcastle 병 예방을 위한 백신이 USDA에서 승인 받았고 B형 간염백신 예방을 위한 식물경구 백신이 쿠바 시장에 나옴. 많은 재조합 의약품들이 개발되어 임상 실험 중에 있으며 현재로서 가장 앞선 단계를 진행하고 있는 것은 이스라엘의 Protalix사가 당근 현탁세포 배양을 이용하여 생산하는 Gaucher병 치료제인 Glucocerebrosidase로써 판매권을 가진 대형 제약회사인 Pfizer가 6천만불에 계약한 사실은 곧 본 제품이 시장에 출현 할 것으로 기대됨

제 7 장 참고문헌

* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Langridge WHR (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 6:403-413

Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16:292-297

Bae JL, Lee JG, Kang TJ, Jang HS, Jang YS, Yang MS (2003) Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine* 21:4052-4058

Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke M, Matzke A (1986) The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol* 6: 347-357

Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Müller M (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virology* 77:9211-9220

Carter JE, Langridge WHR (2002) Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. *Crit Rev Plant Sci* 21:93-109

Curtiss RI, Cardineau GA (1990) Oral immunization by transgenic plants. *World patent Application*

Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* :1001 - 1009

Daniell H, Chebolu S, Kumar S, Singleton M, Falconer R (2005) Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine* 23:1779-1783

De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A, Angenon G (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 20:1265-1268

De Zoeten GA, Penswick JR, Horisberger MA, Ahl P, Schultze M, Hohn T (1989) The

- expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* 172: 213-222
- Doran PM (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol* 24:426-432
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007) Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23:2042-2048
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76-78
- Ibrahim AF, Watters JA, Clark GP, Thomas CJ, Brown JW, Simpson CG (2001) Expression of intron-containing GUS constructs is reduced due to activation of a cryptic 5' splice site. *Mol Genet Genomics* 265:455-460
- Kang TJ, Han SC, Jang MO, Kang KH, Jang YS, Yang MS (2004) Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Appl Biochem Biotechnol* 117:175-187
- Kang TJ, Kim YS, Jang YS, Yang MS (2005) Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine. *Vaccine* 23:2294-2297
- Kang TJ, Han SC, Yang MS, Jang YS (2006) Expression of synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of E.coli heat-labile enterotoxin in tobacco plants. *Protein Expr Purif* 2006 46:16-22
- Kim TG, Yang MS (2010) Current status in molecular farming. *J of Plant Biotechnology* 37(3):243-249
- Kim YS, Kim MY, Kim TG, Yang MS (2009) Expression and assembly of cholera toxin B subunit (CTB) in transgenic carrot (*Daucus carota* L.). *Mol Biotechnol* 41:8-14
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *PNAS USA* 25:11539-11544
- Mason HS, Lam DMK, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *PNAS USA* 89:11745-11749

Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16:1336-1343

Matoba N, Geyer BC, Kilbourne J, Alfsen A, Bomsel M, Mor TS. Humoral immune responses by prime-boost heterologous route immunizations with CTB-MPR649-684, a mucosal subunit HIV/AIDS vaccine candidate. *Vaccine* 2006

Outchkourov NS, Peters J, de Jong J, Rademakers W, Jongsma MA (2003) The promoter-terminator of chrysanthemum rbsS1 directs very high expression levels in plants. *Planta* 216:1003-1012

Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H (2005) Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *PNAS USA* 21:9062-9067

Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjan MD, Buetow DE. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Research* 20009(3):127-35.

Santi L, Batchelor L, Huang Z, Hjelm B, Kilbourne J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS (2008) An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* 28:1846-1854

Tuboly T, Nagy E (2001) Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. *J Gen Virol* 82:183-190

Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virology* 77:8702-8711

Youm JW, Kim H, Han JHL, Jang CH, Ha HJ, Mook-Jung I, Jeon JH, Choi CY, Kim YH, Kim HS, Joung H (2005) Transgenic potato expressing A β reduce A β burden in Alzheimer's disease mouse model. *FEBS Lett* 579:6737-6744

Youm JW, Won YS, Jeon JH, Ryu CJ, Choi YK, Kim HC, Kim BD, Joung H, Kim HS (2007) Oral immunogenicity of potato-derived HBsAg middle protein in BALB/c mice. *Vaccine* 5:577-584

본문 작성 요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉔ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

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