

최 종  
연구보고서

농가 소득 증대를 위한 로타바이러스 감염  
예방성 토마토 작물 개발

Development of rotavirus-infection preventive  
tomato plant for boosting farmer's income

경희대학교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농가 소득 증대를 위한 로타바이러스 감염 예방성 토마토 작물 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 23 일

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 : 정 인 식

연 구 원 : 이 윤 형

연 구 원 : 박 종 화

연 구 원 : 홍 성 현

연 구 원 : 김 경 일

연 구 원 : 이 종 진

연 구 원 : 김 유 정

연 구 원 : 박 성 길

# 요 약 문

## I. 제 목

농가 소득 증대를 위한 로타바이러스 감염 예방성 토마토 작물 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

급성 소아 장염 중 가장 중요한 원인으로 알려진 로타바이러스의 감염은 선진국의 경우 급성 소아설사 입원 환자의 약 50%를 차지하며 개발도상국에서는 문제가 더욱 심각해서 세계보건기구의 추산에 의하면 매년 약 백만 명의 소아가 로타바이러스에 의해 사망한다고 한다. 이처럼 로타바이러스의 감염에 의한 질환이 심각해짐에 따라 백신의 개발에 대한 필요성이 증대되고 있다. 그래서 국내·외적으로 로타바이러스 감염 예방을 위한 백신 개발을 위해 많은 연구를 통하여 여러 백신 후보가 개발 중이지만 이러한 백신 개발 노력은 아직까지 해결되고 있지 않고 있는 실정이다. 최근에 clinical trial을 거쳐 시판된 RotaShield는 부작용으로 장중첩 현상이 보고된 후 생산이 중단되었으므로 전 세계적으로 현재 가용한 로타바이러스 백신은 없다고 생각할 수 있다.

식이성 식물 백신 개발과 관련하여 바이러스 감염 예방성 작물의 개발은 고부가가치를 가지는 작물의 창출로 농가소득의 증대에 긍정적인 효과를 가지며, 이러한 신기능성 작물 이용 기술은 경제적으로 대량생산이 가능하며 재조합 단백질의 순수 정제나 냉장보관이 필요 없게 하므로 식물 유래 의약품 생산에 경제성있게 이용할 수 있는 생명공학기술이 될 수 있다. 본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 로타바이러스 감염에 대해 예방성을 갖게 하는 고부가가치성 형질전환 토마토 작물을 개발하여 농가 소득 증대에 기여하고자 하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서는 농가소득 증대를 위한 로타바이러스 감염 예방성 토마토 작물을 개발하고자 하였다. 이를 위해 로타바이러스 외피 단백질인 VP2, VP6, VP7 코딩 유전자를 확보하고 식물 발현 벡터에 클로닝 한 후 *Agrobacterium*에 의해 토마토 식물체에 형질전환하고 genomic DNA PCR, Southern blot, RT-PCR, western blot 등의 다양한 분자생물학적 기법을 사용하여 유전자의 삽입 및 발현을 확인하였다. 이러한 분석을 통해 형질전환 토마토 식물체로 확인된 개체는 온실에서 배양하여 형질전환 2세대 개체를 유도하고 후대 분석 연구를 수행하였다.

또한 로타바이러스 감염 예방 형질전환 토마토 식물체의 신 기능성을 조사하기 위해 실험동물인 쥐에 형질전환 토마토 식물체를 경구 복용시킨 후 면역 유도성을 확인하여 형질전환 토마토 작물의 효능성을 검증하였다.

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 과제에서는 로타바이러스 감염예방성 토마토 작물 개발 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 우선, 로타바이러스 주요 항원인 VP2, VP6, VP7의 외피 단백질 코딩 유전자를 확보하고 각 유전자를 식물발현벡터에 클로닝 하였다. 로타바이러스 VP2, VP6 또는 VP7 유전자를 포함하는 binary 벡터는 *Agrobacterium*을 이용하여 식물체 내부로 전이하였고, 항생제를 이용하여 형질전환 식물체를 1 차 선발하였다.

그리고 형질전환 식물체를 효율적으로 제조하기 위해 조직배양 과정에서 재분화와 관련한 배지조건을 최적화하여 형질전환 식물체의 재분화율을 증가시켰다. 재분화된 형질전환 식물체는 온실에서 배양하며 genomic DNA PCR, Southern blot, RT-PCR, Western blot 등 여러 분자 생물학적 분석 기법을 이용하여 선발하였다. 분자생물학적 분석으로 형질전환 토마토 식물체로 확인된 개체는 온실에서 배양하면서 형질전환 2세대 개체를 유도하고, 분자육종에 관련한 형질전환 토마토 식물체의 후대 분석연구를 수행하였다.

아울러 로타바이러스 감염 예방 형질전환 토마토 식물체의 신 기능성을 조사하기 위해 실험 동물인 쥐에 형질전환 토마토 식물체를 경구 복용시켜 쥐의 total IgG와 외피단백질 특이(specific) IgG의 농도를 측정하여 면역 유도성을 확인하였으며 로타바이러스 감염 예방성 형질전환 토마토 작물의 효능성을 검증하였다.

또한 형질전환 토마토 작물의 실용화 연구와 관련해서 형질전환 식물체의 안정성 검토를 위한 기초 자료를 확보하였으며, 현재는 순수 계통 (pure line)의 토마토 종자를 확보하여 품종화의 문제점을 검토하고 있다.

본 연구개발의 결과는 로타바이러스 감염 예방을 위한 식이성 토마토 신품종 작물의 실용화를 위한 기초 자료로 이용될 수 있다. 또한 연구개발 결과는 식용 식물을 이용한 항 로타바이러스 백신 개발을 위한 임상 전단계의 기초 자료로서 활용이 가능하다. 아울러 본 연구기술 개발 과정 중에서 확보된 기초자료는 기타 유사한 신 작물의 창출을 가능하게 할 것이다.

## SUMMARY

Development of rotavirus-infection preventive tomato plants for boosting farmer's income

The rotavirus causes acute gastroenteritis in infants and young children. In developed countries, rotavirus has been detected in about 50% of infants and children hospitalized with acute diarrhea. And it is estimated that about a million of infants are died of the infectious diarrhea by the rotavirus in the developing countries. Moreover, the recent withdrawal in the U.S.A. of the first licensed rotavirus vaccine (RotaShield), following investigation into reports of intussusception among a number of vaccinees, has directed attention towards rotavirus vaccine research. In this respect, the goal of this project is related to develop transgenic tomato plants expressing rotavirus capsid proteins. The transgenic plant systems for vaccine production offer several advantages. They are economical and easily adaptable to large-scale operation. Also, the products may not require purification and can be stored at room temperature.

In this project we have accomplished the following results.

- 1) We established the plant expression vector systems to express the rotavirus capsid proteins, VP2, VP6 or VP7. And transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants were generated using *Agrobacterium*-mediated transformation.
- 2) We optimized regeneration conditions for the production of transgenic tomato plants.

- 3) The integration of the rotavirus capsid genes was confirmed by genomic DNA PCR and Southern hybridization. The expression of the genes (VP2, VP6, or VP7) coding capsid proteins in transgenic plants were confirmed by RT-PCR and Western blot analysis. Genetic analysis of T2 plants were also performed using the molecular methods described above.
- 4) Transgenic plant extracts were administered orally to CD1 mice to determine the oral immunogenicity of the plant-derived rotavirus capsid proteins. The titers of total IgG and capsid protein-specific IgG were increased after oral administration of transgenic tomato extracts. Evidently, the presence of detectable antibody responses against the rotavirus capsid protein provides an optimistic basis for the development of edible vaccines against rotavirus.

The results obtained from this study can be used as fundamental data for the commercialization of genetically-modified tomato plants expressing rotavirus capsid proteins and can be of value for clinical studies on edible vaccine development in the future. Also, the availability of these information will lead to the development of other useful genetically-modified plants.

# CONTENTS

Chapter 1.	Introduction of the research development .....	9
Section 1.	Objective and necessity of the research development .....	9
Section 2.	Research aim and scope of the research development .....	12
Chapter 2.	Status of the current research development .....	13
Chapter 3.	Contents and results of he research .....	15
Section 1.	Introduction .....	15
Section 2.	Contents and results of the research .....	16
Chapter 4.	Achievement and contribution of the research .....	59
Section 1.	Achievement of the research .....	59
Section 2.	Contribution of the research .....	60
Chapter 5.	Future applications .....	61
Chapter 6.	Science and technology information obtained from overseas during the process of research development .....	62
Chapter 7.	References .....	63

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	9
제 1 절	연구개발의 목적 및 필요성 .....	9
제 2 절	연구개발의 목표와 범위 .....	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	15
제 1 절	개요 .....	15
제 2 절	연구개발 내용 및 결과 .....	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	59
제 1 절	목표 달성도 .....	59
제 2 절	관련분야에의 기여도 .....	60
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	61
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	62
제 7 장	참고문헌 .....	63

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

농가의 소득 증대를 위해서는 경쟁력 있는 농업이 이루어져야 하는데 이를 위한 사업 중 가장 중요한 것이 새로운 농가 고소득용 작물의 개발이다. 고소득용 작물로는 독창적이며 경쟁력 있는 새로운 작물이 필요한데 인체에 질병을 일으키는 바이러스에 대한 예방효과를 지닌 농작물의 개발은 여러 가지 면에서 큰 의미를 가지고 있다.

본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 로타바이러스 감염에 대해 예방성을 갖게 하는 형질전환 토마토 작물을 개발하여 농가 소득 증대에 기여하고자 하였다. 또한 기술적, 경제·산업적, 그리고 사회·문화적 측면에서의 연구개발 필요성은 다음과 같다.

#### 1. 기술적 측면

- 급성 소아 장염 중 가장 중요한 원인체로 알려진 로타바이러스의 감염은 선진국의 경우 급성 소아설사 입원 환자의 약 50%를 차지하며 개발도상국에서는 문제가 더욱 심각해서 세계보건기구의 추산에 의하면 매년 약 백만명의 소아가 로타바이러스에 의해 사망한다고 한다 (Kapikian et al. 1990, Brandt et al. 1983, Davidson et al. 1975).
- 서울지역의 소아설사군을 대상으로 12 개월 동안 12 종류 이상의 설사유발 원인체들을 조사한 연구보고에 의하면 로타바이러스가 설사군의 47%에서 검출되어 가장 높은 출현빈도를 나타내었으며 이는 세계보건기구의 통계치인 20%의 두배를 웃도는 수치이다 (Kim et al. 1989).
- 국내·외적으로 로타바이러스 감염예방을 위한 백신 개발 노력이 경주되어 왔으며 전통적인 방법과 분자생물학적인 방법이 모두 시도되어 많은 백신 후보가 개발 중이지만 이러한 백신 개발 노력은 아직까지 해결되고 있지 않고 있다 (Bishop et

al. 1993).

- 로타바이러스의 제놈은 11 개의 이중 RNA 절단(segment)으로 되어 있고 polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 각 절단들을 분리 관찰 할 수 있다 (Estes et al. 1989).
- 로타바이러스 감염 예방에는 장내 lumen에서 분비되는 항체가 혈청이나 림프내 항체보다 더 중요하므로 mucosal immunity를 위한 구강으로 복용할 수 있는 식이 성 백신의 개발이 바람직하다 (Halsey et al. 1988).
- 중화항체와 바이러스 사이의 반응실험에 관한 보고를 분석해보면 중화항체가 core 및 outer capsid 단백질에 반응함을 보여준다 (Estes et al. 1989).
- 따라서 로타바이러스 감염 예방 기능성 토마토 작물을 개발한다면 고부가가치를 갖는 신품종의 개발뿐만 아니라 손쉽게 섭취할 수 있는 획기적인 방법으로 생각된다.
- 본 연구를 계기로 형질전환 식물체 유래 백신 개발 연구를 체계적으로 시도할 수 있게 된다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 선진국일수록 로타바이러스 감염의 증가가 더욱 심각하므로 이러한 로타바이러스 감염 예방 기능성 토마토 작물의 개발에 관한 관심이 증대 될 것으로 생각된다.
- 로타바이러스 감염 예방 기능성 토마토의 개발은 고부가가치를 가지는 작물의 창출로 경제산업적 측면에서 매우 의미 있는 일로 생각된다.
- 로타바이러스 감염예방 기능성 작물의 개발 기술은 재조합 단백질의 순수 정제나 refrigeration 보관이 필요없게 되므로 후진국 또는 개발도상국에서 경제성 있게 이

용할 수 있는 실용화 기술로써 산업화가 가능하리라 생각된다 (Mason et al. 1995).

- 그리고 이 기술은 수의백신 개발연구에 응용하여 가축의 로타바이러스 질병으로부터 보호 또는 증산에 기여하게 함으로써 농가소득을 증진시킬 수 있다.
- 아울러 효율적이며 경제성 있는 형질전환기술을 확립할 수 있어 국가적인 산업발전에 기여할 수 있는 생명공학기술로 활용이 가능하다.

### 3. 사회·문화적 측면

- 로타바이러스는 급성소아 장염 유발 원인 중 가장 중요한 요인으로 알려져 있다.
- 선진국의 경우 급성 소아설사 입원 환자의 약 50%가 로타바이러스 감염에 의한 질병이며 개발도상국에서는 문제가 더욱 심각해서 세계보건기구의 추산에 의하면 매년 백 만 명의 소아가 로타바이러스에 의한 설사로 사망한다고 한다 (Kapikian et al. 1990, Brandt et al. 1983, Davidson et al. 1975).
- 대부분의 환자는 적절한 처치를 받으면 회복할 수도 있지만 개발도상국에서는 이러한 처치 조차 보편화 되어 있지 않으며 깨끗한 식수공급, 위생처리 등에 의해 세균성 설사환자의 발생빈도는 감소하고 있으나 로타바이러스에 의한 감염은 이 방법이 큰 효과를 보지 못하고 있어서 로타바이러스 감염방지는 매우 시급한 문제이다 (Birch et al. 1977, Kapikian et al. 1976).
- 우리나라에서도 사회, 문화적 관점에서 이러한 로타바이러스 감염에 의한 질환문제들을 해결해야만 하는 필요성이 있다.
- 따라서 약제에 의한 백신제제의 투여 보다는 토마토의 섭취를 통해 자연스럽게 로타바이러스 감염 예방방법을 선호할 것으로 생각된다.

## 제 2 절 연구개발 목표와 범위

구 분	연구 개발 목 표	연구 개발 내 용 및 범 위
1차 년도 (2000)	로타바이러스 감염 예방 기능성 토마토 작물 개발 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 로타바이러스 감염 예방 기능성 관련 유전자인 VP2, VP6, VP7의 확보</li> <li>· 항시 발현 및 조직 특이 발현을 위한 식물 발현 벡터 구축</li> <li>· 식물체 형질전환 및 형질 전환 토마토 작물의 재분화 연구</li> <li>· 형질 전환 식물체의 분석</li> </ul>
2차 년도 (2001)	형질전환 식물체의 유전 육종 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 신기능성 토마토 작물의 재분화 효율증진 연구</li> <li>· 형질전환 식물체의 선발 및 분석</li> <li>· 형질 전환 식물체의 양성 및 후대 검증</li> <li>· 형질 전환 식물체의 후대 분석</li> </ul>
3차 년도 (2002)	형질전환 토마토 작물의 실용화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 형질전환 토마토 작물의 선발</li> <li>· 형질 전환 토마토 작물의 신기능 효능 검증 연구</li> <li>· 형질 전환 식물체의 실용화 연구</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

급성 소아 장염 중 가장 중요한 원인체로 알려진 로타바이러스의 감염은 선진국의 경우 급성 소아설사 입원 환자의 약 50%를 차지하며 개발도상국에서는 문제가 더욱 심각해서 세계보건기구의 추산에 의하면 매년 약 백만명의 소아가 로타바이러스에 의해 사망한다고 한다. 국내에서도 서울지역의 소아 설사군을 대상으로 12 개월 동안 12 종류 이상의 설사 유발 원인체들을 조사한 연구보고에 의하면 로타바이러스가 설사군의 47%에서 검출되어 가장 높은 출현빈도를 나타내고 있었으며 이것은 세계보건기구의 통계치인 20%를 두 배 이상 넘는 수치이다 (Kapikian et al. 1990, Brandt et al. 1983, Davidson et al. 1975).

급성 소아 장염 중 가장 중요한 원인체로 알려진 로타바이러스의 감염에 의한 질환이 전 세계적으로 더욱 심각해짐에 따라 백신의 개발에 대한 필요성이 증대되고 있다. 따라서 지난 10 여 년 간 로타바이러스 감염 예방을 위한 백신 개발 노력이 경주되어 왔으며 전통적인 방법과 분자 생물학적인 방법이 모두 시도되어 많은 백신 후보가 개발 중이지만 이러한 백신 개발 노력은 아직까지 해결되고 있지 않다 (Bishop et al. 1993). 최근에 Wyeth-Ayerst Laboratory에서 개발한 생체 백신은 약화된 rhesus monkey 로타바이러스에 사람 로타바이러스의 항원 단백질 코딩 유전자중의 일부를 치환하여 만든 것으로 clinical trial을 거쳐 시판되었으나 부작용으로 장 중첩 현상이 보고되어 생산 중단 조치가 되었으므로 전 세계적으로 현재 가용한 로타바이러스 백신은 없다고 생각할 수 있다 (Nigel et al. 2002).

미국 Arizona State 대학의 Arntzen 교수팀은 Boyce Thompson 연구소와 더불어 Hepatitis B와 Norwalk 바이러스를 대상으로 형질전환 식물체에서 생산된 구강 백신의 효능을 실험동물에서 보여주고 식물에서 경구용 백신의 개발 가능성을 소개한 바 있다 (Mason et al. 1996, Qingxian et al. 2001).

국내외적으로 로타바이러스 항원 유전자의 식물세포나 식물체에서의 발현은 뉴질랜드의 Auckland 대학의 연구팀, 미국의 Loma Linda 대학 연구팀, 그리고 경희대 정인식 교수팀 등에서만 보고되었다. 그런데 뉴질랜드의 Auck 대학 연구팀의 연구결

과는 모델식물인 담배 식물체를 대상으로 식물 바이러스 발현백터를 이용한 VP6의 transient expression에 대한 것으로 항원 단백질의 발현이 VP6에 국한되어 있으며 후대발현이 가능하지 않은 형태의 시스템을 이용한 것이다 (O'Brien et al. 2000). 그리고 미국 Loma Linda 대학 연구팀은 감자 식물체에서 쥐의 로타바이러스 VP6 유전자를 발현시키는 연구를 수행한 바 있다 (Jie et al. 2003).

본 과제에서는 식이성 식물인 토마토 작물을 대상으로 VP6의 발현만이 아니라 VP2와 VP7의 발현을 검토하여 백신개발에 필요한 기초자료를 확보하고 있으므로 뉴질랜드의 Auckland 대학 연구팀과 미국 Loma Linda 대학 연구팀에 비해 앞서가는 연구를 수행하였다고 할 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 개 요

본 과제에서는 로타바이러스 감염예방성 토마토 작물 개발 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 우선, 로타바이러스 주요 항원인 VP2, VP6, VP7의 외피 단백질 코딩 유전자를 확보하고 각 유전자를 식물발현벡터에 클로닝하여 항시발현 또는 조직 특이 발현이 가능하도록 하였다. 로타바이러스 VP2, VP6 또는 VP7 유전자를 포함하는 binary 벡터는 *Agrobacterium*을 이용하여 식물체 내부로 전이하였고, 항생제를 이용하여 형질전환 식물체를 1 차 선발하였다.

그리고 형질전환 식물체를 효율적으로 제조하기 위해 조직배양 과정에서 재분화와 관련한 배지조건을 최적화하여 형질전환 식물체의 재분화율을 증가시켰다. 재분화된 형질전환 식물체는 온실에서 배양하며 genomic DNA PCR, Southern blot, RT-PCR, western blot 등 여러 분자 생물학적 분석 기법을 이용하여 선발하였다. 분자생물학적 분석으로 형질전환 토마토 식물체로 확인된 개체는 온실에서 배양하면서 형질전환 2 세대 개체를 유도하고, 분자유종에 관련한 형질전환 토마토 식물체의 후대 분석연구를 수행하였다.

아울러 로타바이러스 감염 예방 형질전환 토마토 식물체의 신 기능성을 조사하기 위해 실험 동물인 쥐에 형질전환 토마토 식물체를 경구 복용시켜 쥐의 total IgG와 외피단백질 특이(specific) IgG의 농도를 측정하여 면역 유도성을 확인하였으며 로타바이러스 감염 예방성 형질전환 토마토 작물의 효능성을 검증하였다.

또한 형질전환 토마토 작물의 실용화 연구와 관련해서 형질전환 식물체의 안정성 검토를 위한 기초 자료를 확보하였으며, 현재는 순수 계통 (pure line)의 토마토 종자를 확보하여 품종화의 문제점을 검토하고 있다.

## 제 2 절 연구개발 내용 및 결과

본 과제에서는 농가소득 증대를 위한 로타바이러스 감염예방성 토마토 식물체를 개발하고자 하였다. 연구개발 수행 내용 및 결과에 관련하여 실험 방법, 연구내용 및 연구결과에 대한 자세한 사항은 다음과 같다.

### 1. 로타바이러스 감염 예방성 토마토 작물 개발을 위한 바이러스 외피 단백질 코딩 유전자의 클로닝 및 식물 발현벡터의 구축

가. 로타바이러스 감염 예방 관련 유전자의 클로닝 및 항시 (constitutive) 발현 벡터의 구축

기존에 본 연구실에서 보유하고 있는 로타바이러스 항원 단백질 VP6, VP7 유전자와 RT-PCT로 합성된 VP2 유전자를 CsVMV 35S 프로모터가 들어있는 식물 발현 벡터 시스템인 pILTAB357 벡터에 클로닝 하였다.

로타바이러스의 항원 단백질 유전자중 VP6와 VP7의 full-length cDNA는 경희대 실험실에서 이미 확보하고 있는 것을 이용하였으며, VP2의 full length cDNA는 로타바이러스 total RNA로부터 RT-PCR을 수행하여 확보하여 사용하였다.

#### 1) 로타바이러스 VP6 유전자의 식물 발현벡터에의 클로닝

PCR 벡터인 pCR2.1 벡터에 클로닝 되어있는 VP6 유전자를 *EcoRI* 제한효소로 처리하여 분리하였다. 식물 발현벡터인 pILTAB357 (CsVMV 35S promoter 함유)도 *EcoRI* 제한 효소로 처리한 후 분리한 VP6 유전자 단편과 T4 DNA ligase를 이용하여 4℃에서 12 시간 반응시켰다 (그림 1). 재조합 식물 발현 벡터는 *E. coli* DH 5 $\alpha$  균주에 형질전환 시켜 사용하였다. 형질전환체의 확인은 plasmid mini-preparation을 통해서 DNA를 얻은 후 제한효소 반응으로 하였으며, 유전자의 방향은 VP6 유전자와 벡터 사이의 제한효소 부위를 이용하여 확인하였다.

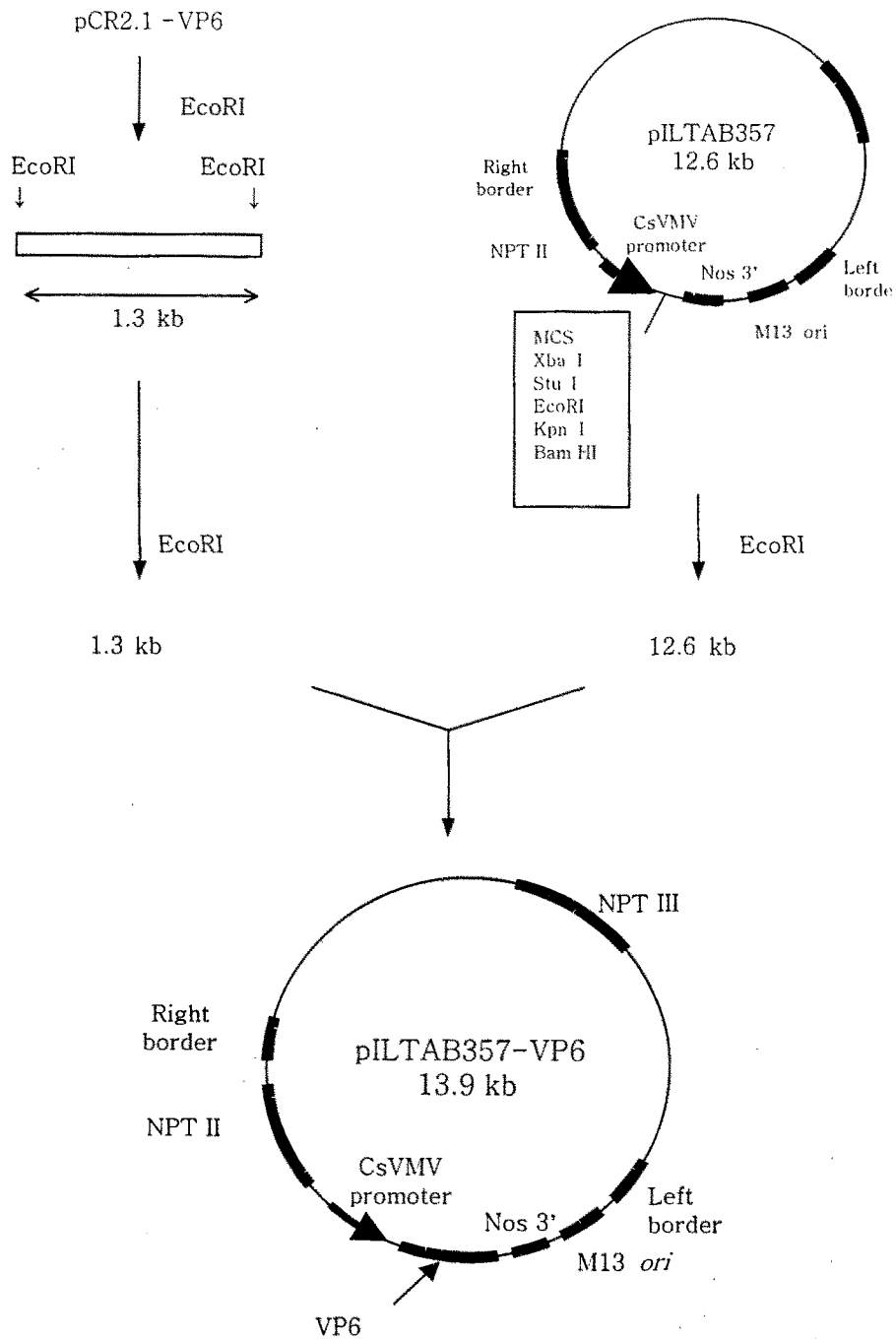


그림 1. pILTAB357-VP6 재조합 plasmid의 제조

## 2) 로타바이러스 VP7 유전자의 식물 발현벡터에의 클로닝

본 연구실에서 이미 보유하고 있는 pMosBlue라는 벡터에 클로닝되어진 VP7 cDNA는 Polymerase Chain Reaction을 이용하여 제한효소 부위를 인위적으로 만들었다. 각각의 primer를 식물 발현 벡터에 클로닝하기 위해 *XbaI*과 *EcoRI*을 넣어 제작하였다. 이 primer를 이용하여 PCR을 수행하여 PCR 산물을 확인하고 그 후 gene cleaning 수행후 PCR 산물을 Promega사의 T-GEM 벡터에 ligation하였다. Ligation 후 JM109로 형질전환 시킨 후 형질전환체는 plasmid mini-preparation을 통해 클로닝 여부를 확인하였으며, 이렇게 확인된 형질전환체로부터 VP7이 클로닝되어진 T-GEM 벡터를 얻었으며 *XbaI*과 *EcoRI*을 이용하여 제한효소 부위를 만들었다. 식물 발현 벡터인 pILTAB357 역시 *XbaI*과 *EcoRI*을 이용하여 제한효소 부위를 만들고 Takara의 EASYTRAP Ver 2.1을 사용하여 gene cleaning을 수행하였다. 그리고 0.7% agarose gel electrophoresis를 통하여 DNA 단편들을 확인한 후 4℃에서 12 시간 ligation 시켰다 (그림 2). 이렇게 만들어진 벡터는 *E. coli* DH 5 $\alpha$  균주에 형질전환시켜 사용하였다.

VP7 유전자의 클로닝에 사용된 PCR primer는 다음과 같다.

5' Primer ( Tm : 62 ℃ )

5' - GCTCTAGAGCGGCTTTAAAAG - 3'

3' Primer ( Tm : 62 ℃ )

5' - GTGAATTTCGAGCTCGGTACC - 3'

PCR 조건은 predenaturation 94℃, 5 분, denaturation 94℃, 1 분, annealing 60 ℃, 1 분, extension 72℃, 1 분, elongation 72℃, 7 분에서 30 cycle을 수행하였다.

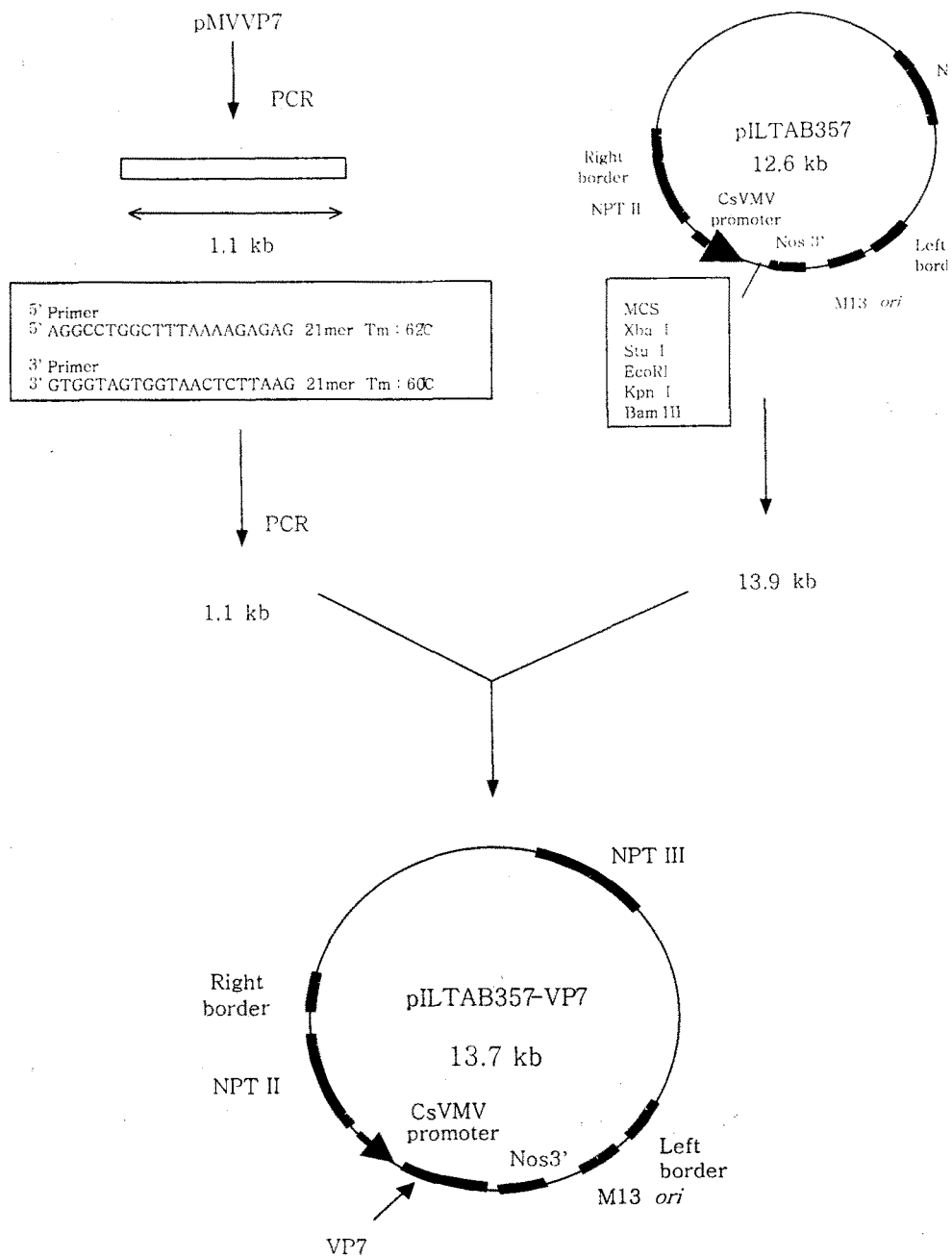


그림 2. pILTAB357-VP7 재조합 plasmid의 제조

### 3) 로타바이러스 VP2 유전자의 클로닝과 식물 발현벡터에의 클로닝

VP2 유전자를 확보하기 위해 로타바이러스 mRNA로부터 RT-PCR을 수행하여 약 2.6 kbp의 VP2 cDNA를 합성하였고 (그림 3) invitrogen pCR 2.1 벡터에 ligation 하여 cDNA를 증폭하였다.

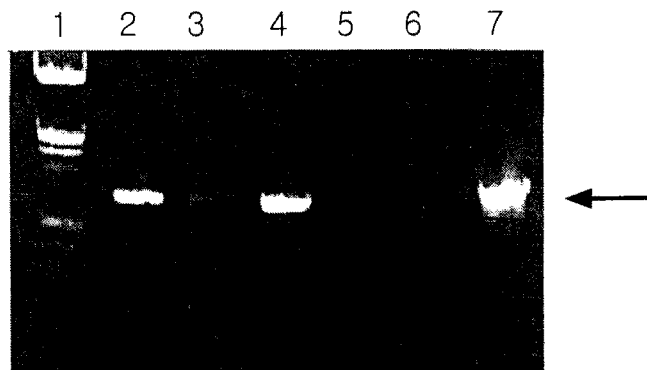


그림 3. RT-PCR을 이용하여 로타바이러스의 mRNA로부터 VP2 cDNA를 합성하여 약 2.6 kbp 크기의 절편을 확인 (lane 1 : DNA size marker, lanes 2-7 : 로타바이러스 RNA sample의 RT-PCR)

클로닝된 pCR 2.1-VP2 재조합 벡터로부터 *EcoRI* 제한효소 site를 이용하여 VP2 유전자를 식물발현 벡터인 pILTAB357에 클로닝 하였다 (그림 4). 제조된 pILTAB357-VP2 재조합 plasmid는 *E. coli* 내부로 전이한 후 재조합 pILTAB357-VP2 벡터를 추출하였고, VP2 유전자가 정확한 방향으로 삽입이 되었는지를 *BamHI* 제한 효소를 이용하여 확인하였다 (그림. 5).

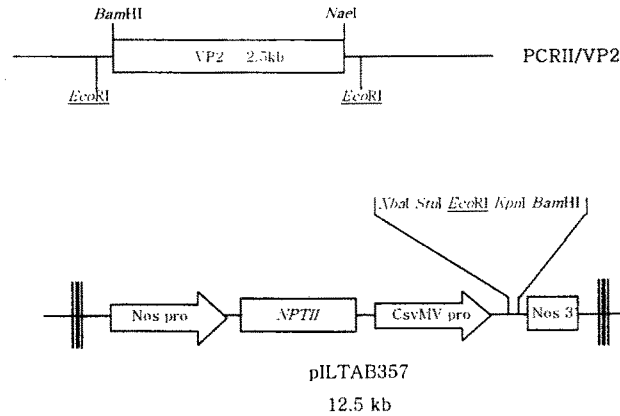


그림 4. pILTAB357-VP2 재조합 plasmid의 제조

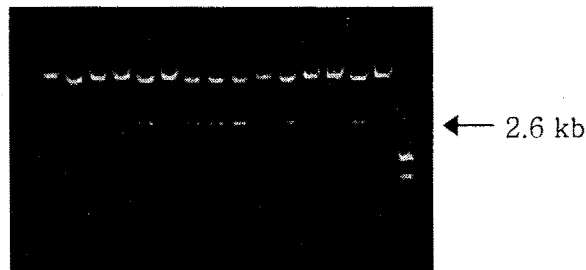


그림 5. Construction of a plant expression vector containing rotavirus VP2 gene

나. 형질전환 시스템의 개선과 관련하여 fruit-specific promoter를 이용한 조직 특이 (tissue-specific) 발현 벡터의 구축

본 과제에서는 형질전환 시스템의 개선과 관련하여 fruit-specific promoter를 이용하여 로타바이러스 외피 단백질을 발현하는 방법도 함께 검토하였다. 토마토 과실의 fruit-specific promoter는 과실의 숙성시 과육세포의 펙틴성분을 당류로 전환시키는 효소중의 하나인 polygalacturonase의 발현을 조절하는 promoter로써 이를 이용하여 토마토 작물의 과실에서 로타바이러스 항원을 효율적으로 발현하고자 식물발현 벡터

시스템을 제조하였다. 토마토 과실에서 PG(polygalacturonase) 프로모터는 0.8 kb의 크기를 가지며 (그림 6) 본 연구에서는 이 프로모터 발현 시스템을 이용하여 로타바이러스 항원단백질을 발현시키기 위한 식물 발현 벡터시스템을 개발하였다. PG 프로모터는 식물 발현 벡터의 pILTAB357 벡터에서 CsVMV 프로모터를 *HindIII*와 *XbaI* 제한효소 부위를 이용하여 제거하고 PG 프로모터에 PCR을 이용하여 *HindIII*와 *XbaI* 제한효소 부위를 만들어 제한효소 처리하였다. CsVMV 프로모터가 제거된 pILTAB357 벡터와 제한효소처리한 PG 프로모터를 T4 DNA ligase를 이용하여 4℃에서 12 시간 ligation하여 pILTAB357/PG 조직 특이 식물 발현 벡터를 제작하였다 (그림 7).

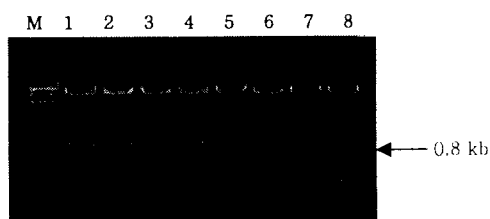


그림 6. 조직 특이 식물 발현 벡터 pILTAB357/PG 제조 관련 그림

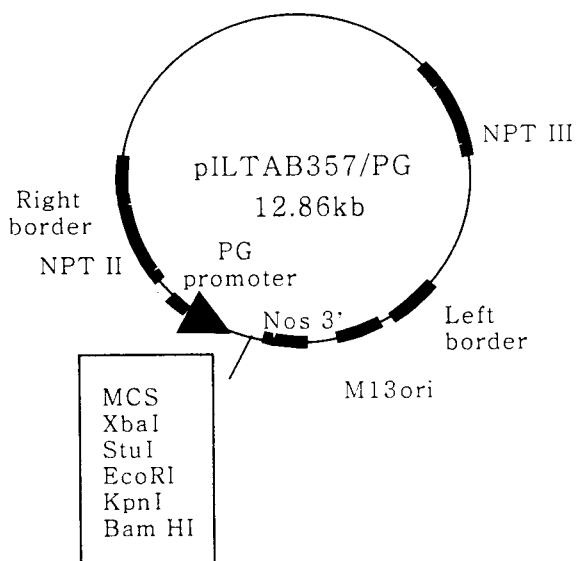


그림 7. pILTAB357/PG 조직 특이 식물 발현 벡터의 제작

## 1) pILTAB357/PG-VP6의 제조

VP6 유전자를 pILTAB357/PG에 클로닝하기 위해 유전자의 클로닝에 사용된 PCR primer는 *Xba* I과 *EcoR* I 제한효소 부위를 가지며 염기배열은 아래와 같다.

5' Primer ( Tm : 55.7 °C )

5' TCTAGAATGGATGTCCTGTAC 3'

3' Primer ( Tm : 55.2 °C )

5' GAATTCTTTGACAACCATGCTTC 3'

PCR 조건은 predenaturation 94°C에서 5 분, denaturation 94°C 1 분, annealing 55°C 1 분, extension 72°C 1 분, elongation 72°C에서 7 분, 그리고 총 30 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 pGEM-T 벡터 (Promega)에 ligation 하였고, *E. coli* JM109에 형질전환 시킨 후 클로닝 여부를 확인하였다. 확인된 형질전환체로부터 PG-VP6 유전자가 클로닝되어진 pGEM-T DNA를 이용하여 제한효소 부위를 만들었다. 식물 발현 벡터인 pILTAB357 역시 *Xba* I과 *EcoR* I를 이용하여 제한효소 부위를 만들고 gene cleaning을 수행하여 4°C에서 12 시간 ligation 시켰으며, *E. coli* DH5α에 형질 전환시켰다.

pILTAB357 벡터의 선별은 *E. coli* strain이나 식물체의 경우 모두 kanamycin (GIBCO BRL)을 사용하였다.

## 2) pILTAB357/PG-VP7의 제조

pMosBlue 벡터에 클로닝되어진 VP7 cDNA는 식물 발현 벡터인 pILTAB357/PG에 클로닝 하기 위해 먼저 PCR을 수행하였다. VP7 유전자의 클로닝에 사용된 PCR primer는 *Xba* I과 *EcoR* I 제한효소 부위를 가지며, 염기배열은 다음과 같다.

5' Primer ( Tm : 62 °C )

5' GCTCTAGCGGCTTTAAAAG 3'

3' Primer ( Tm : 62 °C )

5' GTGAATTCGAGCTCGGTACC 3'

PCR 조건은 predenaturation 94℃에서 5 분, denaturation 94℃ 1 분, annealing 60℃ 1 분, extension 72℃ 1 분, elongation 72℃에서 7 분, 그리고 총 30 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 pGEM-T 벡터 (Promega)에 ligation하였고, *E. coli* JM109에 형질전환 시킨 후 plasmid preparation과 제한효소 반응으로 클로닝 여부를 확인하였다. 이렇게 확인된 형질전환체로부터 VP7 유전자를 *Xba* I과 *EcoR* I을 이용하여 제한효소 부위를 만든후 EASYTRAP Ver.2 (Takara)을 사용하여 gene cleaning을 수행하였다. 0.7% agarose gel 전기영동을 통하여 DNA 단편들을 확인한 후 insert와 vector의 molar ratio가 3:1이 되도록 계산한 후 T4 DNA ligase (Takara) 이용하여 4℃에서 overnight ligation 시켰고, *E. coli* strain DH5α에 형질전환 시켰다. pILTAB357 벡터의 선별은 *E. coli* strain이나 식물체의 경우 모두 kanamycin (Duchefa)이 사용되었다.

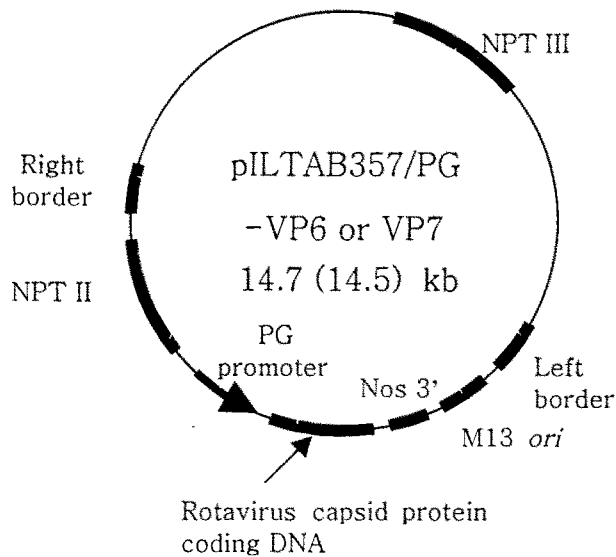


그림 8. 조직 특이 로타바이러스 외피단백질 식물 발현 벡터 pILTAB/PG-VP6 와 pILTAB/PG-VP7

한편, 로타바이러스 항원 단백질 VP2의 경우 국내외적으로 식물이 아닌 다른 발현 시스템에서도 발현 조사가 비교적 덜 되어 있기 때문에 본 과제에서는 조직 특이 발현 보다는 항시 발현에 초점을 맞추어서 연구를 수행하였다. 그래서 주로 CsVMV 프로모터 함유 시스템을 이용하여 유전자 발현을 검토하였으며, 이 시스템에서 발현이 확인되면 조직 특이 발현 시스템을 이용한 발현 연구도 시도될 수 있다.

## 2. 식물체 형질전환, 형질전환 작물의 재분화 및 재분화 효율 증진 연구

가. 식물체 형질전환을 위한 recombinant *Agrobacterium* 제조 및 식물체 형질전환

토마토 작물의 형질전환은 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 형질전환 방법을 사용하였다. 그리고 로타바이러스 항원 유전자가 포함된 식물 발현 벡터를 제조한 후 triparental mating 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens*에 전이하였다. 즉 제조된 pILTAB357-VP6, pILTAB357-VP7, pILTAB357-VP2는 *E. coli* DH5a에 transformation 시키고 kanamycin 50 mg/L의 농도를 가지는 LB 배지에서 선별하였다. 선별된 재조합 벡터를 가지는 *E. coli* 균주는 *A. tumefaciens* LBA4404와 helper plasmid를 가지는 MM294 *E. coli* 균주를 30℃에서 24 시간 공동배양하여 tri-parental mating을 수행하였다. 공동배양 후 얻어진 *A. tumefaciens*는 kanamycin 50 mg/L와 rifampicin 50 mg/L가 첨가된 LB배지에서 선별하여 pILTAB357-VP6, pILTAB357-VP7, pILTAB357-VP2가 전이된 *A. tumefaciens* LBA4404를 제조하여 토마토 형질전환에 사용하였다.

조직 특이 발현 프로모터인 PG 시스템을 이용하여 클로닝된 재조합 식물 발현 벡터 pILTAB357/PG-VP6, pILTAB357/PG-VP7는 CsVMV 35S 프로모터를 이용한 재조합 식물발현 벡터를 *A. tumefaciens*로 전이할 때 사용하였던 방법과 동일한 방법을 사용하여 형질전환 *A. tumefaciens* LBA4404를 제조하여 식물 형질전환에 사용하였다

식물체의 형질전환을 위해서 재조합 *A. tumefaciens*를 kanamycin 50 mg/L와 rifampicin 25 mg/L가 함유된 LB agar 배지에 streaking한 후 36 시간 동안 온도가 3

0℃로 조절된 인큐베이터에서 배양하였다. 증식된 colony는 형질전환 시키기 2 일 전에 멸균된 LB 액체배지에 넣고 kanamycin 50 mg/L와 rifampicin 25 mg/L의 항생제를 첨가한 후 36 시간 동안 30℃, 150 rpm의 속도로 조절된 진탕배양기에서 배양하였으며, 배양 후 그대로 원심분리기에 넣고 2500 rpm으로 10 분간 원심분리시켰다. 원심 분리된 균은 액체 MS 배지로 현탁시킨 후 멸균된 petri dish에 부어서 접종에 사용하였다. Preculture된 토마토 절편을 *Agrobacterium*용액에 30 분간 담그고 현탁한 후 멸균된 여과지에서 토마토 절편 위에 묻은 *Agrobacterium*을 닦아 낸 후 항생제가 첨가되지 않은 재분화 배지 또는 callus 유도 배지에 치상하여 5 일 동안 암배양 하였다. 5 일 후 항생제가 첨가된 재분화 배지 및 callus 유도 배지에서 형질전환 된 식물체를 선별하였다. Selection배지는 pILTAB357 계통의 벡터를 사용한 경우 (CsVMV 35S promoter, PG promoter) 150 mg/L timentin, 150 mg/L kanamycin을 사용하였다 (그림 9, 그림 10).



그림 9. 선택배지에서 형질전환 토마토의 선별과정



그림 10. 형질전환 토마토 shoot 선별 및 shoot elongation

#### 나. 형질전환 토마토 작물의 재분화 및 재분화 효율 증진 연구

본 연구에 사용된 토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)는 노바티스 종묘(주)의 '일광'으로써 토마토 종자를 멸균된 플라스크에 담아 70% 에탄올에 1 분간 담근 후 다시 4% NaOCl 용액에 15 분간 흔들어 종자에 골고루 소독되도록 한 후 멸균수로 여러 번 세척하였다. 세척이 끝난 종자는 4.442 g/L MS salt, 30 g/L sucrose, 0.3% phytigel, pH 5.7의 MS (Murashige and Skoog) 기본배지 가 있는 magenta box에 파종하여 약 5 일간 암배양한 후 뿌리가 나오면  $25 \pm 2$  °C, 16 시간 일장조건의 인위적인 배양실에서 약 10 일간 키운 후 그 cotylendons와 hypocotyles를 적당한 크기로 절단 한 후 멸균된 petri dish (100×20 mm)에 치상하였다. *A. tumefaciens*로 형질전환 하기 전에 explant를 배지에 적응시키기 위해 preculture를 실시하였는데, petri dish당 30 개씩 치상하여  $25 \pm 2$  °C, 16 시간 명상태로 배양하였다. 재분화에는 줄기와 뿌리 유도를 위한 배지가 사용되었다. 먼저 줄기 발생을 위한 배지로는 MS 기본배지에 0.02 mg/L 3-indoleacetic acid (IAA)와 1.0, 2.0, 3.0 mg/L zeatin이 첨가된 배지를 사용하였으며, 뿌리 유도를 위한 배지는 ½ MS 기본 배지와 MS 기본 배지를 사용하였다. 모든 배지는 멸균 전 pH를 5.7로 적정하였다.

로타바이러스 항원 유전자 VP6, VP7 유전자를 가진 *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환시키고 각각의 조건에서 형질전환 토마토의 재분화 조건 최적화 및 효율 증진 연구를 수행하였다. 그리고 발근율의 최적 조건 확립을 위하여 식물호르몬을 제거한 배지와 항생제를 제거한 조건을 통해 발근율 향상을 유도하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1) Development of transgenic plants expressing recombinant rotavirus VP6

a) Shooting medium

	Shooting(%)	Rooting(%)	토양순화(%)
IAA 0.02 mg/L Zeatin 3 mg/L	474/1281 (37 %)	25/130 (19 %)	4/18 (20 %)
IAA 0.02 mg/L Zeatin 2 mg/L	336/621 (54 %)	10/75 (13 %)	1/10 (10 %)
IAA 0.02 mg/L Zeatin 1 mg/L	935/1170 (80 %)	68/275 (25 %)	28/45 (62 %)

b) Rooting medium

Medium composition		Number of roots (%)
1/2 MSO (agar)	Timentin(150 mg/L)	0/3 (0 %)
	-	0/1 (0 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	0/6 (0 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	0/1 (0 %)
1/2 MSO (phytagel SIGMA)	Timentin(150 mg/L)	0/3 (0 %)
	-	0/2 (0 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	2/10 (20 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	0/1 (0 %)
MSO (agar)	Timentin(150 mg/L)	1/5 (20 %)
	-	5/23 (22 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	10/24 (42 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	0/7 (0 %)
MSO (phytagel SIGMA)	Timentin(150 mg/L)	0/2 (0 %)
	-	1/5 (20 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	1/5 (20 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	1/5 (20 %)

c) Hormone responses of different tissues of tomato plants

	IAA 0.02 mg/L Zeatin 3 mg/L			IAA 0.02 mg/L Zeatin 2 mg/L			IAA 0.02 mg/L Zeatin 1 mg/L		
	Shoot	Root	토양 순화	Shoot	Root	토양 순화	Shoot	Root	토양 순화
Cotyledon	414/1025 (40 %)	22/112 (20 %)	4/16 (20 %)	289/497 (58 %)	9/65 (14 %)	1/9 (11 %)	804/936 (86 %)	62/236 (26 %)	26/40 (65 %)
Stem	60/256 (23 %)	3/18 (16 %)	0/2 (0 %)	47/124 (5.2 %)	1/10 (10 %)	0/1 (0 %)	131/234 (56 %)	6/39 (15 %)	2/5 (40 %)

2) Development of transgenic tomato plants expressing recombinant rotavirus VP7

a) Shooting medium

	Shooting(%)	Rooting(%)	토양순화(%)
IAA 0.02 mg/L Zeatin 3 mg/L	225/565 (40 %)	13/55 (24 %)	3/7 (42 %)
IAA 0.02 mg/L Zeatin 2 mg/L	120/362 (33 %)	7/38 (18 %)	2/5 (40 %)
IAA 0.02 mg/L Zeatin 1 mg/L	483/625 (77 %)	30/87 (34 %)	15/26 (58 %)

b) Rooting medium

Medium composition		Number of roots (%)
1/2 MSO (agar)	Timentin(150 mg/L)	2/5 (40 %)
	-	1/5 (20 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	0/10 (0 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	2/5 (40 %)
1/2 MSO (phytagel SIGMA)	Timentin(150 mg/L)	1/5 (20 %)
	-	1/5 (20 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	3/18 (17 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	1/5 (20 %)
MSO (agar)	Timentin(150 mg/L)	0/5 (0 %)
	-	1/5 (20 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	28/74 (38 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	2/5 (40 %)
MSO (phytagel SIGMA)	Timentin(150 mg/L)	1/5 (20 %)
	-	2/5 (40 %)
	Timentin(150 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L)	3/18 (17 %)
	Kanamycin(100 mg/L)	1/5 (20 %)

c) Hormone responses of different tissues of tomato plants

	IAA 0.02 mg/L Zeatin 3 mg/L			IAA 0.02 mg/L Zeatin 2 mg/L			IAA 0.02 mg/L Zeatin 1 mg/L		
	Shoot	Root	토양 순화	Shoot	Root	토양 순화	Shoot	Root	토양 순화
Cotyledon	187/452 (41 %)	12/145 (8 %)	9/11 (81 %)	100/292 (34 %)	6/20 (30 %)	2/5 (40 %)	418/505 (83 %)	27/75 (36 %)	14/24 (58 %)
Stem	38/113 (34 %)	1/30 (3 %)	0/1 (6 %)	20/70 (28 %)	1/18 (5 %)	0/1 (0 %)	65/120 (54 %)	3/12 (25 %)	1/2 (50 %)

위의 결과와 같이 VP6와 VP7 발현 형질전환 토마토 식물체의 재분화 조건으로는 shooting medium은 IAA 0.02 mg/L와 zeatin 1 mg/L의 조건에서 80 %와 77 %로 가장 좋은 결과를 보였고 rooting medium에서는 MS salt의 함량, 항생제 유무, 그리고 agar의 종류의 차이에 크게 상관없이 뿌리를 형성하는 것을 알 수 있었다. 이는 형질전환 토마토의 재분화시 뿌리 형성에는 배지 첨가물에 크게 영향을 받지 않는 것을 알 수 있다.



그림 11. VP6 형질전환 토마토의 뿌리 형성과정 (2, 4, 6, 7, 8주)

또한, rooting 배지에서 시간에 따른 형질전환 토마토의 성장과정으로 각각 2 주, 4 주, 6 주, 7 주, 8 주 후의 뿌리의 성장과정에서 뿌리의 발근 및 길이 성장이 정상적으로 형성되는 것을 확인할 수 있다 (그림 11). 이렇게 뿌리가 형성된 형질전환 토마토를 1 주일간 순화과정을 거친 후 토양에 식재하였다.



그림 12. VP6 형질전환 토마토의 pot 식재 후 재배

화분에 식재한 후 30 일 후의 사진으로 VP6 형질전환된 토마토 작물의 정상적인 성장을 확인할 수 있었다 (그림 12).

#### 다. 재분화와 관련한 기타 연구

형질전환된 토마토 작물의 재분화 효율을 증진하고자 식물 호르몬인 IAA(indole-3-aceticacid), Zeatin(6-[4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylamino] purine), NAA( $\alpha$ -naphtalene aceticacid), BA(6-benzyl aminopurine) 등의 여러 가지 다양한 조건을 설정하여 로타바이러스 항원단백질 유전자를 *Agrobacterium*을 이용하여 형질 전환시킨 후 각각의 조건에서 형질전환 토마토의 재분화에 미치는 영향을 검토하였다. 형질전환 토마토의 재분화에 사용한 호르몬과 항생제는 아래 표와 같이 사용하였다.

Chemicals	Solvent	Sterilization method	Conc.(mg/L)
Indole-3-acetic acid (IAA)	1 N NaOH	Coautoclave	0.02
Zeatin	1 N NaOH	0.2 $\mu$ m Filtration	1 - 3
Naphthalene acetic acid (NAA)	1 N NaOH	Coautoclave	1 - 3
6-benzylaminopurine (BA)	1 N NaOH	Coautoclave	0.1
2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	EtOH	Coautoclave	1 - 5
Kinetin	1 N NaOH	Coautoclave	0.1 - 0.5
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	0.2 $\mu$ m Filtration	100
Timentin	H <sub>2</sub> O	0.2 $\mu$ m Filtration	100 - 300
Rifampicin	MtOH	0.2 $\mu$ m Filtration	25 -50

CsVMV(cassava vein mosaic virus) 프로모터 함유 발현시스템을 이용한 VP6및 VP7의 형질 전환 토마토 재분화 조건과 PG 프로모터 함유 발현시스템을 이용한 PG-VP6의 형질전환 토마토의 재분화 조건으로 shooting medium은 IAA 0.02 mg/L와 zeatin 1 mg/L의 조건으로 사용시 각각 79.9%와 80%로 가장 좋은 결과를 보였고 rooting medium에서는 앞서 조사한 바와 같이 MS salt의 함량, 항생제 유무, 그리고 agar 종류에 상관없이 뿌리를 형성하는 것을 알 수 있었다. 싹(shoot) 유도 배지에서는 형질전환체의 계속적인 selection을 위해서 150 mg/L kanamycin의 항생제를 첨가 하였으며, *Agrobacterium*의 오염을 막기 위해 150 mg/L timentin을 사용하였다. 줄기 유도 배지에서 4 주간 배양시 줄기 유도가 정상적으로 이루어짐을 확인(그림 13)하였으며, 뿌리 유도를 위한 배지에서도 6 주간 배양시 정상적으로 뿌리가 유도되어지는 것을 확인하였다.



그림 13. 토마토 작물의 재분화에 관련한 selection 실험

### 3. 형질전환 작물의 유전 육종을 위한 토마토 식물체의 선발 및 분석

로타바이러스의 외피단백질인 VP6, VP7을 발현하는 형질전환 토마토 식물체를 항생제로 1차 선발하고 도입된 유전자의 삽입 및 발현을 genomic DNA PCR, Southern blot, Northern blot 및 Western blot을 이용하여 형질전환 토마토 식물체에서 분석하였다. 형질전환 토마토 식물체의 genomic DNA는 DNeasy Mini Plant Kit (Qiagen)를 사용하여 준비하였다.

즉, 싹(shoot) 유도를 위한 배지에서 일정기간 동안 선별과정을 거친 형질전환 토마토에서 원하는 유전자가 염색체로 안전하게 들어갔는지를 확인하기 위해서 Qiagen사의 DNeasy Mini Plant Kit를 이용하여 genomic DNA를 얻었다. 이 DNA를 template로 사용하여 PCR을 수행하여 1.2 % agarose gel 전기영동하여 로타바이러스 외피 단백질 유전자의 유무를 확인하였다. PCR로써 원하는 유전자가 삽입된 것이 확인된 형질전환 토마토 개체의 경우 genomic DNA를 전기영동하여 Southern blot 분석을 수행하였다. Probe는  $[P^{32}]$ -dATP(Amersham)로 표지하여 만들었다. Southern 분석을 통해서 예상되는 위치에서 각각의 유전자 signal을 확인하였다.

토마토 식물체에서 로타바이러스 외피 단백질 유전자의 발현은 RT-PCR과 Western blot 분석 기법을 이용하여 조사하였다. RT-PCR은 식물체에서 total RNA를 추출하고 이것을 로타바이러스 외피 단백질 유전자의 specific primer로 RT 및 PCR을 수행하여 유전자의 발현 여부를 확인하였다. Western blot 분석은 식물체의 단백

질을 추출하고 전기 영동하여 membrane으로 전이하였다. 단백질이 전이된 membrane은 항 로타바이러스 항체를 이용하여 로타바이러스 유전자의 발현을 확인하였다.

#### 가. 로타바이러스 VP6 형질전환 토마토 식물체의 분석 및 선발

로타바이러스 항원단백질 VP6 유전자가 식물체내에 안전하게 삽입되었는지 확인하기 위해 형질전환 토마토 식물체로부터 genomic DNA를 추출하고 이것으로부터 다음과 같은 PCR 조건을 이용하여 식물체내로 VP6 유전자가 도입되었는지의 여부를 확인하였다.

$T_m$  : 60℃

primer : 5'-GCTCTAGAGCGGCTTTAAAAG-3'

primer : 3'-CCATGGCTCGAGCTTAAGTG-5'

PCR 수행 결과 로타바이러스 V6의 밴드를 확인하였고 이것으로 보아 식물체에 로타바이러스 VP6의 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다 (그림 14).

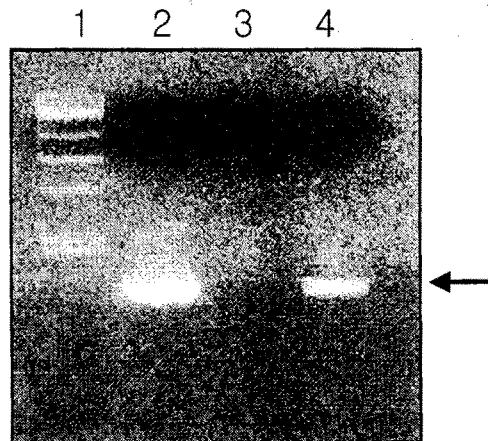


그림 14-A. pILATB-VP6 형질전환 토마토 식물체에서 plant genomic DNA PCR 기법을 이용한 로타바이러스 VP6 유전자의 삽입 확인  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : VP6 positive control DNA, lane 3 : negative control (normal plant), lane 4 : transformant)

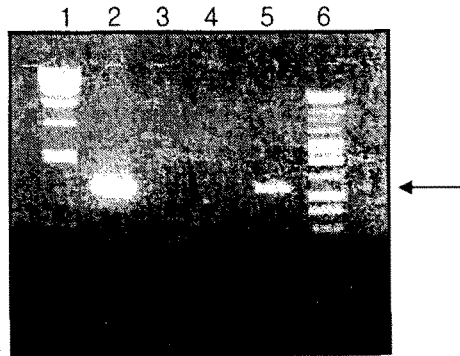


그림 14-B. pILTAB/PG-VP6 형질전환 토마토 식물체에서 plant genomic DNA PCR 기법을 이용한 로타바이러스 VP6 유전자의 삽입 확인  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : VP6 positive control DNA, lane 3 : negative control (normal plant), lanes 4, 5 : transformants, lane 6 : 100 bp ladder)

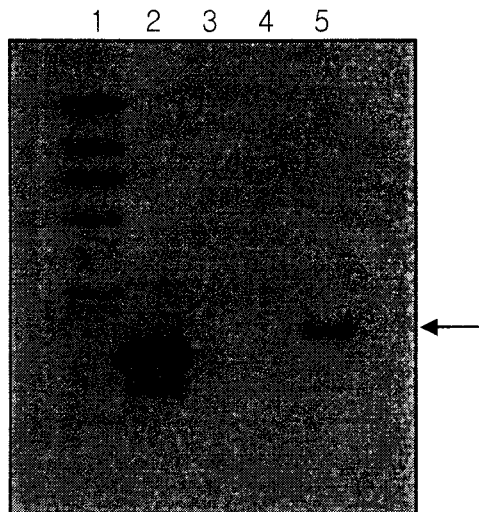


그림. 15 pILTAB/PG-VP6 형질전환 토마토 식물체에서 Southern blot 분석 기법을 이용한 로타바이러스 VP6 유전자의 삽입 확인  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : VP6 positive control DNA, lane 3 : negative control (normal plant), lanes 4, 5 : transformants)

형질전환식물체에서 VP6 유전자의 삽입을 재확인하기 위해 Southern blot 분석을 수행하여 형질전환체를 확인하였다. Southern blot 분석에서도 genomic DNA PCR에서의 결과처럼 형질전환 토마토 식물체임을 확인할 수 있었다 (그림 15).

Southern blot 분석을 통해 형질전환체로 확인한 개체들을 대상으로 RT-PCR을 아래와 같은 조건으로 수행하여 VP6 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다 (그림 16).

1' RT-reaction

Tm : 55℃

primer : 5'-GCTCTAGAGCGGCTTTAAAAG-3'

2' PCR-reaction

Tm : 55℃

primer : 5'-GCTCTAGAGCGGCTTTAAAAG-3'

primer : 3'-CCATGGCTCGAGCTTAAGTG-5'

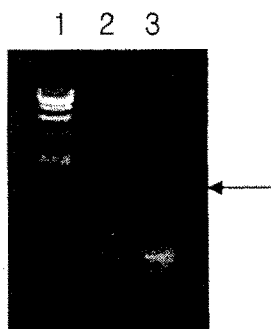


그림 16. pLATB-VP6 형질전환 식물체의 RT-PCR 분석

(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : negative control (normal plant), lane 3 : transformant)

VP6 형질전환 토마토 개체들 중 genomic DNA PCR과 Southern blot 분석 기법을 이용하여 로타바이러스 VP6 유전자가 안정적으로 삽입된 개체들을 대상으로 단백질 발현연구를 수행하였다. 먼저 시료를 단백질 추출 buffer를 이용해 파쇄한 후 원심

분리를 통해 단백질을 제외한 찌꺼기를 제거하였다. 이렇게 준비한 단백질 시료를 SDS-PAGE 후 membrane에 전이하고, anti-VP6 antibody를 이용해 VP6 단백질의 발현 여부를 확인하였다 (그림 17).

Western blot 분석을 통해 발현이 확인된 개체를 중심으로 온실에서 배양하면서 형질전환체를 선발하였다.

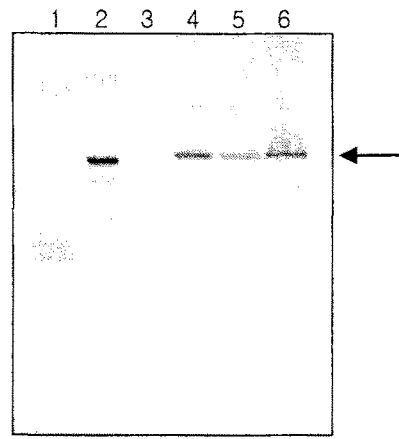


그림 17. pILATB-VP6 형질전환 토마토 식물체의 Western blot 분석

lane 1 : size marker

lane 2 : positive control

lane 3 : negative control

lanes 4-6 : transformants

#### 나. 로타바이러스 VP7 형질전환 토마토 식물체의 분석 및 선발

로타바이러스의 외피단백질인 VP7을 발현하는 형질전환 토마토 식물체를 선별하고 도입된 유전자의 삽입 및 발현을 genomic DNA PCR 과 Western blot 분석을 이용하여 확인한 결과는 다음과 같다.

우선 VP7 형질전환 토마토 식물체에 대해 genomic DNA PCR을 수행하여 로타바이러스 외피 단백질인 VP7 유전자의 삽입을 확인하였다 (그림 18).

Tm : 55℃

primer : 5'-GGACATTACCTGTACAATCTGA-3'

primer : 3'-TTAACACCATATAAGTTATGGTATGTA-5'

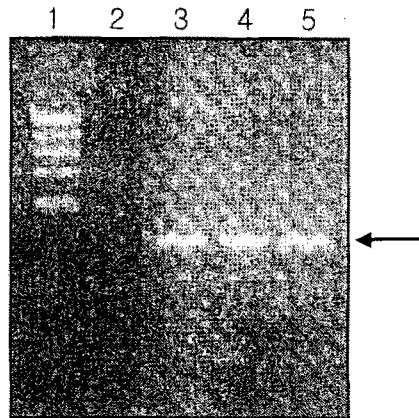


그림 18-A. pILATB-VP7 형질전환 토마토 식물체에서 plant genomic DNA PCR 기법을 이용한 로타바이러스 VP7 유전자의 삽입 확인  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : negative control (normal plant), lanes 3-5 : transformants)

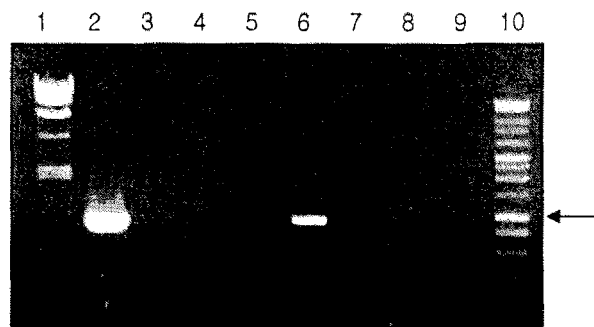


그림 18-B. pILATB/PG-VP7 형질전환 토마토 식물체에서 plant genomic DNA PCR 기법을 이용한 로타바이러스 VP7 유전자의 삽입 확인  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : VP7 positive control DNA, lane 3 : negative control (normal plant), lanes 4-9 : transformants, lane 10 : 100 bp ladder)

Genomic DNA PCR 기법을 이용하여 1 차 선별한 VP7 형질전환체는 Southern blot 분석 기법을 이용하여 VP7 유전자가 토마토 식물체 내부로 전이되었음을 재확인 하였다 (그림 19).

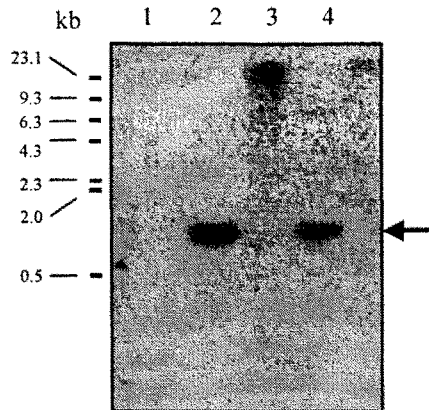


그림. 19-A pILTAB-VP7 형질전환 토마토 식물체에서 Southern blot 분석 기법을 이용한 로타바이러스 VP7 유전자의 삽입 확인  
(lanes 1-4 : transformants)

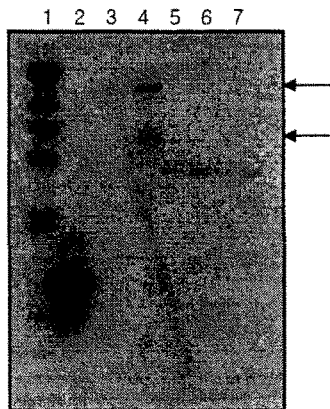


그림. 19-B pILTAB/PG-VP7 형질전환 토마토 식물체에서 Southern blot 분석 기법을 이용한 로타바이러스 VP7 유전자의 삽입 확인  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : VP7 positive control DNA, lane 3 : negative control (normal plant), lanes 4-7 : transformants)

다음과 같이 조건에서 수행한 RT-PCR 반응에서 VP7 유전자가 발현하여 mRNA를 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 20).

1' RT-reaction

Tm : 55℃

primer : 5'-GGACATTACCTGTACAATCTGA-3'

2' PCR-reaction

Tm : 55℃

primer : 5'-GGACATTACCTGTACAATCTGA-3'

primer : 3'-TTAACACCATATAAGTTATGGTATGTA-5'

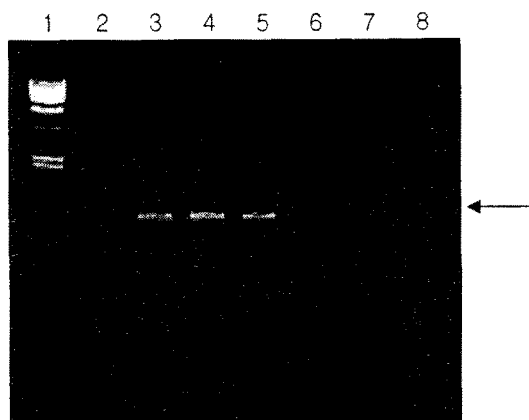


그림 20. 형질전환 토마토 식물체의 VP7 RT-PCR 분석

(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : negative control (normal RNA)

RT-PCR. lanes 3-5 : RT-PCR of transformant's RNA, lanes 6-8 : PCR of transformant's RNA)

또한 VP7 형질전환 토마토의 Western blot 분석을 통하여 로타바이러스 항원단백질 VP7의 발현을 확인하였다 (그림 21). 로타바이러스 외피단백질 VP7은 중화항원 이면서 면역성 획득에 효과적인 단백질의 하나이다.

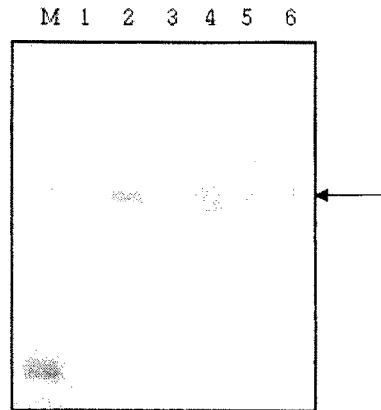


그림 21. 로타바이러스 VP7 형질전환 토마토 식물체의 Western blot 분석 (pILTAB357-VP7)

M : size marker, 1 : negative control (normal tomato), 2 : positive control (expressed in BES), 3 - 7 : transformants

Primary antibody는 anti-Rota VP7 monoclonal antibody (1/20 diluted)를 사용하였고, secondary antibody는 alkaline phosphatase로 conjugate 된 anti-mouse IgG antibody (1/1000 희석)를 사용하여 분석한 결과 약 34 kDa의 로타바이러스 외피 단백질이 발현된 것을 확인할 수 있었다.

#### 다. 로타바이러스 VP2 형질전환 토마토 식물체의 분석 및 선발

먼저 토마토 식물체에 로타바이러스 VP2 유전자의 삽입이 이루어졌는지 확인하기 위해 VP2 형질전환 토마토 식물체로부터 genomic DNA를 추출하였고 이것으로부터 로타바이러스 VP2 유전자의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다 (그림 22).

$T_m$  : 54°C

primer : 5'-GAATTCATGGCGTACAGGAAG-3'

primer : 3'-GGTTTACATGTCCAATTCCTAGG-5'

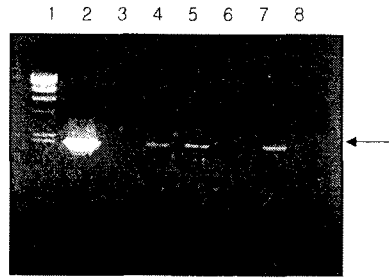


그림 22. pILTAB357-VP2 형질전환 토마토 식물체의 genomic DNA PCR

(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : positive control (rotavirus VP2 DNA).  
lane 3 : negative control (normal tomato), lanes 4-8 : genomic DNA PCR  
of transformant's DNA)

VP2 형질전환 식물체의 genomic DNA PCR 산물의 Southern blot 분석을 수행하였다 (그림 23). 이것은 genomic DNA PCR을 수행해서 얻은 PCR 산물이 VP2임을 간접적으로 보여주었다.

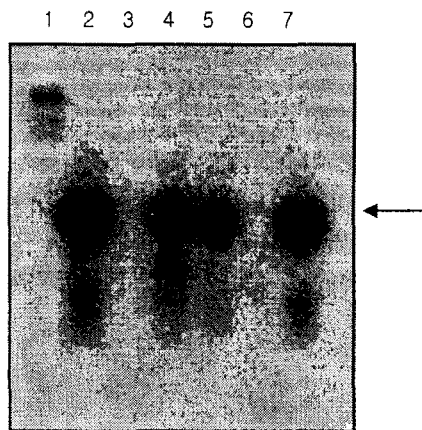


그림 23. pILTAB357-VP2 형질전환 토마토 식물체의 genomic DNA PCR-Southern blot 분석

(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : positive control (rotavirus VP2 DNA).  
lane 3 : negative control (normal tomato), lanes 4-7 : genomic DNA PCR  
of transformant's DNA)

로타바이러스 VP2 유전자로 형질전환 된 형질전환 토마토 작물에서 VP2의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 형질전환 식물체에서 mRNA 수준에서 VP2 유전자의 발현을 확인할 수 있었다 (그림 24).

1' RT-reaction

T<sub>m</sub> : 54℃

primer : 5'-GAATTCATGGCGTACAGGAAG-3'

2' PCR-reaction

T<sub>m</sub> : 54℃

primer : 5'-GAATTCATGGCGTACAGGAAG-3'

primer : 3'-GGTTTACATGTCCAATTCCTAGG-5'

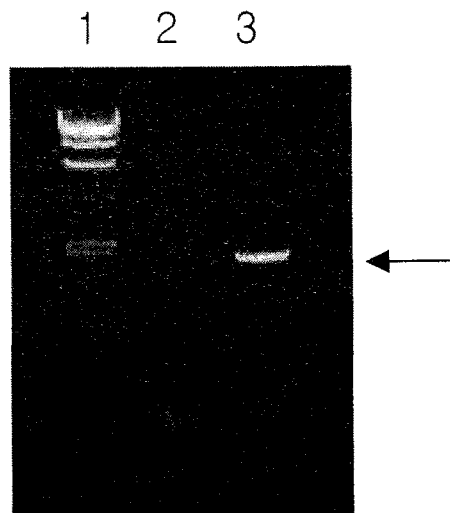


그림 24. pILTAB 357-VP2 형질전환 식물체의 RT-PCR 분석

(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : negative control, lane 4 transformant)

#### 4. 형질전환 식물체의 유전 육종과 관련한 형질전환 식물체의 양성, 후대 검증 및 후대 분석

##### 가 형질전환 식물체의 양성

로타바이러스 항원 단백질을 코딩하는 유전자들이 각기 형질전환 토마토 식물체의 염색체 안으로 안전하게 들어간 개체를 온실에서 배양하였다. 재분화된 형질전환체 가운데 PG-VP6 와 PG-VP7의 유전자가 형질전환된 토마토의 경우 재분화 후 18 주가 경과한 후부터 꽃이 생성되었고 그로부터 2 주후 과실의 생성을 확인하였다. 생성된 과실은 약 2-4 주가 경과하면서 숙성되기 시작하였다. 숙성이 끝난 토마토 과실은 수확하여 종자를 확보하였고 과육은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

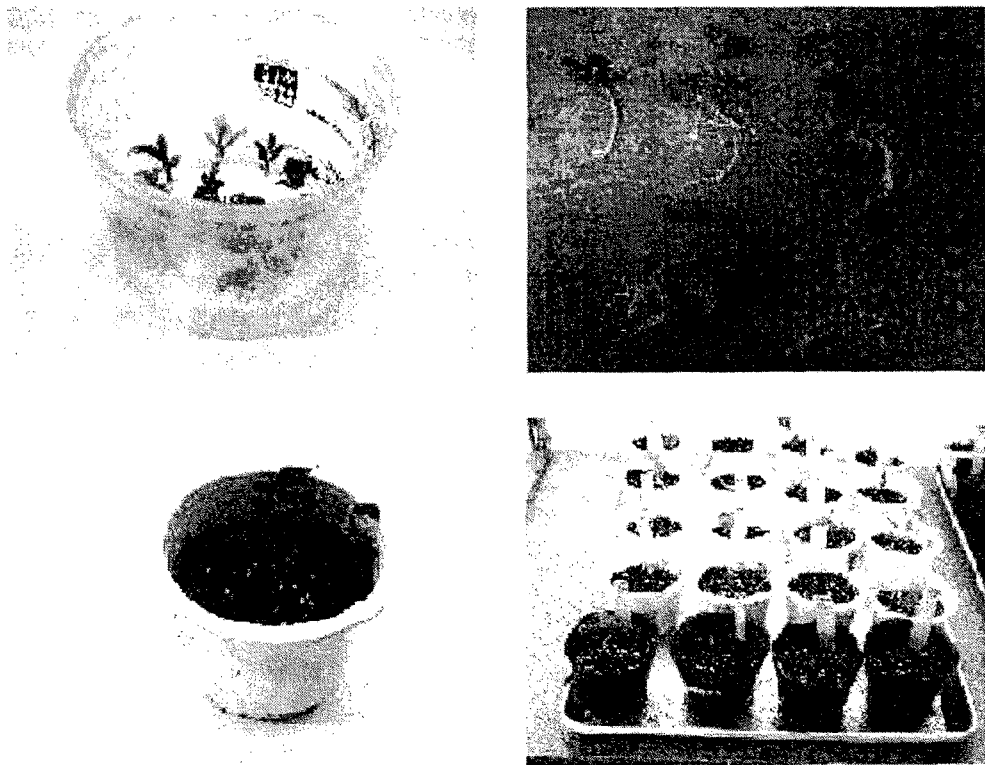


그림 25. 형질전환 토마토의 양성과 토양순화



그림 26-A. 형질전환 토마토 작물의 양성(실내 배양실)

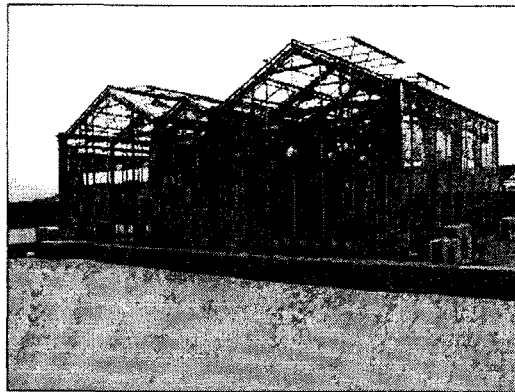


그림 26-B. 형질전환 토마토 작물의 양성 (옥외 온실)

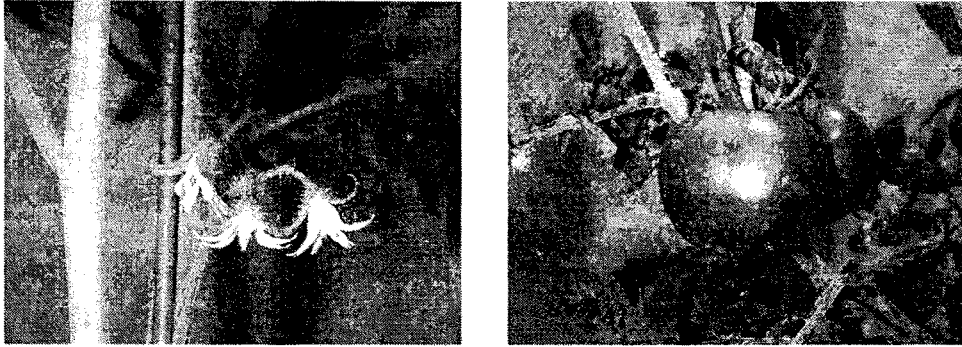


그림 27. 형질전환 토마토의 개화(좌)와 과실의 숙성(우)

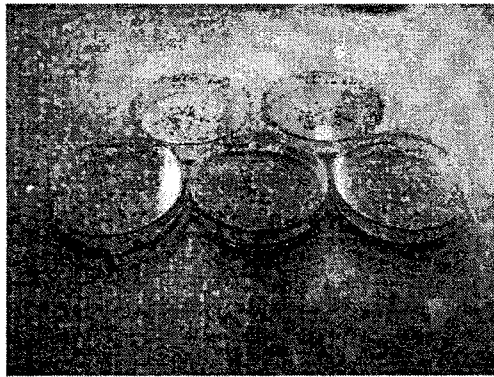


그림 28. 과육으로부터 분리한 종자의 사진 그림

#### 나. 형질전환 식물체의 후대 검증

확보된 종자는 과실로부터 분리한 후 과육을 깨끗이 제거하고 25℃ 상온에서 건조시켜 형질전환 식물체 유전자 후대발현 유전 분석 및 후대 안정성 검증에 사용하였다. 건조된 종자는 70% ethanol로 1 분간 처리 후 4% NaOCl로 20 분간 처리하여 소독하였다. 소독이 끝난 종자는 후대 선별 항생제 kanamycin 600 mg/L가 첨가된 MSO 배지에서 발아를 유도하여 1 차 항생제 선별 후 아래와 같은 결과를 얻었다. 아래 표는 VP6 유전자에 의해 형질전환 된 5 개의 개체로부터 2 세대의 종자를 얻어 이것을 고농도의 항생제 배지에 파종하여 항생제 저항성 개체와 비 저항성 개체 사이의 비율을 나타낸 것이다. 표에 의하면 항생제 저항성 개체를 가지는 2 세대 개체들

은 비 저항성 개체와의 비율이 약 3 : 1의 분리의 비를 따르고 있음을 알 수 있다.

	발아된 종자		미발아 종자	분리비 (저항성 개체 : 비 저항성 개체)	합 계
	항생제 저항성 개체	항생제 비 저항성 개체			
VP6 T2-1	0	0	0		0
VP6 T2-2	117	46	92	2.54 : 1	155
VP6 T2-3	32	10	25	3.2 : 1	67
VP6 T2-4	0	165	89		254
VP6 T2-5	49	17	77	2.88 : 1	143

VP7의 경우, 고농도의 항생제 조건하에서 6 개체의 종자가 고사였고 7 개체가 발아되지 않았으며 나머지 39 개체는 일반적인 배지에서 발아시키는 경우와 크게 다르지 않게 잘 자랐다. 그러나 토양순화 과정에서 대부분 고사하였고 6 개체가 토양으로 옮겨졌다.

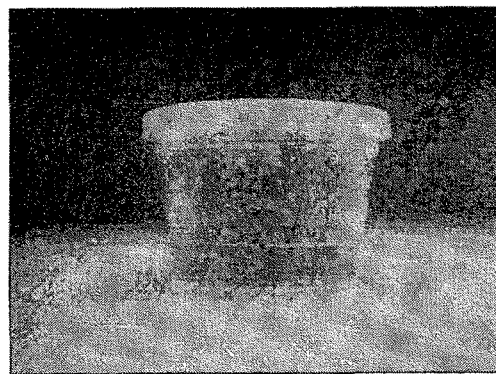
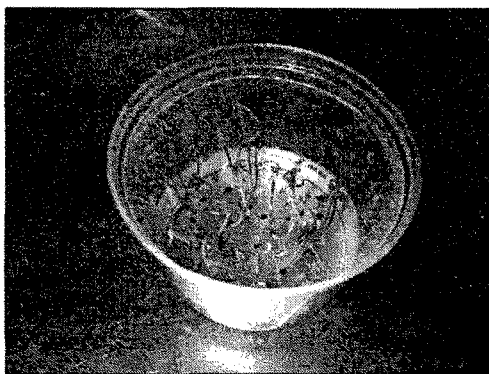


그림 29. 종자를 소독한 후 고농도(600 mg/L)의 kanamycin에서 실시한 종자 발아의 유도 사진 그림

고농도의 항생제 배지에서 1 차 선발된 후대 시료들은 토양으로 옮겨 심었고 이로 부터 genomic DNA를 추출하였다. PG-VP6와 PG-VP7 형질전환체를 확인하기 위해 식물발현 벡터 pILTAB 357을 이용하여 VP6 및 VP7 유전자와 함께 발현시킨 저항성 유전자인 NPT II 유전자의 존재를 PCR로 확인하였다. 이를 위해 NPT II 유전자를 증폭시키기 위한 primer는 아래와 같이 제작하였다.

5' - ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA - 3'

5' - GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG - 3'

PCR 반응은 94℃에서 5 분간 반응시킨 후 94℃에서 1 분, 55℃에서 1 분, 72℃에서 1 분 동안의 반응을 30 회 반복 수행하였다.

PG-VP6와 PG-VP7 형질전환체의 genomic DNA PCR 수행 결과 NPT II 유전자 내부의 700 bp 정도의 절편이 증폭되어 형질전환 토마토 개체로부터 얻어진 후대(T1)에서도 외래 유전자와 함께 발현시킨 저항성 유전자의 삽입을 확인하였다 (그림 30).

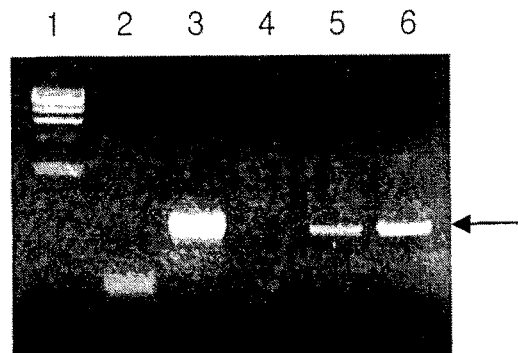


그림 30-A. PG-VP6 형질전환 후대 1 세대 종자에서 발아한 식물개체에서 추출한 genomic DNA로부터 NPT II 유전자의 증폭 확인 그림

lane 1 : Lamda Hind III size marker

lane 2 : Negative control (Normal tomato)

lane 3 : Positive control (pILTAB/PG-VP6)

lanes 4-6 : Transformants 1-3

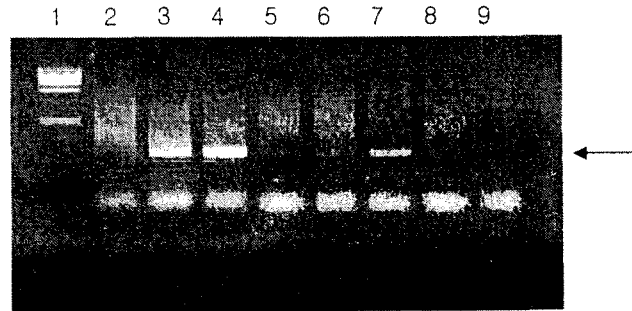


그림 30-B. PG-VP7 형질전환 후대 1 세대 종자에서 발아한 식물개체에서 추출한 genomic DNA로부터 NPT II 유전자의 증폭 확인 그림

lane 1 : Lamda Hind III size marker

lane 2 : Negative control (Normal tomato)

lane 3 : Positive control (pILTAB/PG-VP7)

lanes 4-9 : Transformants 1-6

#### 다. 후대 유전 분석 및 선발

로타바이러스 항원 단백질을 발현하는 식물체를 선발한 후 양성하였다. 먼저 로타바이러스 항원 단백질이 발현되는 형질전환 토마토 작물을 선발하기 위해 식물체 내부에 로타바이러스 유전자가 삽입되었는지를 확인하였다. 유전자의 삽입은 식물체의 genomic DNA를 추출한 후 로타바이러스 유전자에 대한 primer로 PCR을 수행하여 확인하였다.

식물체의 genomic DNA는 먼저 식물체를  $LN_2$ 로 파쇄한 후 DNA 추출 buffer (0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, 1% SDS, pH 8.0)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA는 phenol과 RNaseA를 이용하여 단백질과 RNA를 제거하여 사용하였다.

VP6 형질전환 토마토에서 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 VP6 primer를 이용하여  $T_m$  60℃에서 PCR을 수행하였다 (그림 31).

VP6 primer

5'-GCTCTAGAGCGGCTTTAAAAG-3'

3'-CCATGGCTCGAGCTTAAGTG-5'

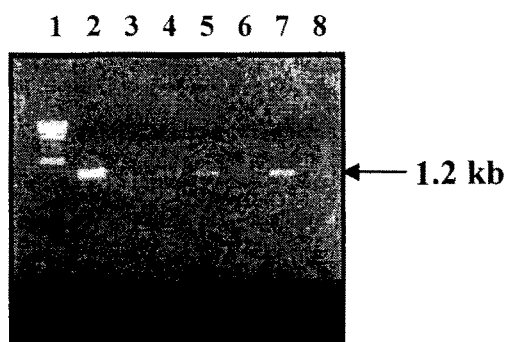


그림 31. PG-VP6 형질전환체의 선별을 위해 형질전환 토마토로부터 추출한 genomic DNA를 VP6 primer를 이용하여 PCR 증폭을 수행한 그림

lane 1 : DNA size marker

lane 2 : Positive control

lane 3 : Negative control

lanes 4-8 : Transformants

VP7의 형질전환 토마토에서 동일한 방법으로 genomic DNA를 추출하여 동일한 방법으로 VP7 primer를 이용하여 genomic DNA PCR을 55℃에서 수행하였다 (그림 32).

VP7 primer

5'-GGA CAT TAC CTG TAC AAT CTG A-3'

5'-A TG TAT GGT ATT GAA TAT ACC ACA ATT-3'

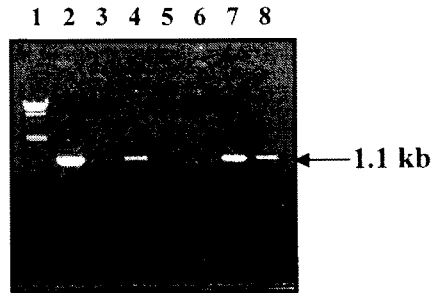


그림 32. PG-VP7 형질전환체의 선별을 위해 형질전환 토마토로부터 추출한 genomic DNA를 VP7 primer를 이용하여 PCR 증폭을 수행한 그림  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : Positive control, lane 3 : Negative control, lanes 4-8 : Transformants)

Genomic DNA PCR을 수행하여 얻은 산물(그림 31, 그림 32)을 로타바이러스 유전자를 probe으로 하여 Southern blot 분석을 수행하였다. Southern blot 분석을 수행하여 PCR 산물이 로타바이러스 유전자임을 확인하였다. (그림 33, 그림 34)

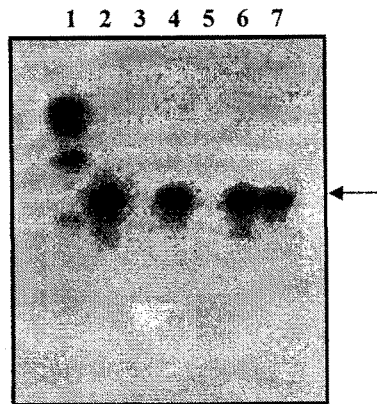


그림 33. PG-VP6 형질전환체의 선별을 위해 형질전환 토마토로부터 추출한 genomic DNA를 VP6 primer를 이용하여 PCR 증폭한 후 Southern blot 분석을 수행한 그림  
(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : Positive control, lane 3 : Negative control, lanes 4-7 : Transformants)

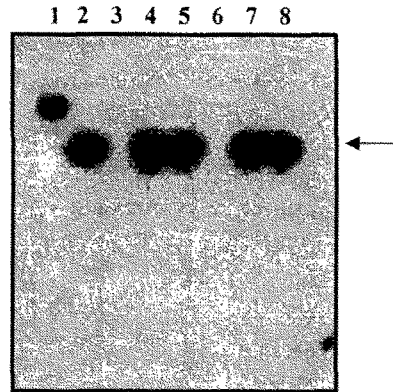


그림 34. PG-VP7 형질전환체의 선별을 위해 형질전환 토마토로부터 추출한 genomic DNA를 VP7 primer를 이용하여 PCR 증폭한 후 Southern blot 분석을 수행한 그림

(lane 1 : DNA size marker, lane 2 : Positive control, lane 3 : Negative control, lanes 4-8 : Transformants)

## 5. 형질 전환 토마토 작물의 신 기능 효능 검증 및 실용화 연구

### 가. 형질전환 토마토 작물의 신 기능 효능 검증

형질전환 토마토 식물체에서 발현된 단백질이 쥐에서 면역활성을 가지는지 확인하기 위해서 VP6가 발현되는 형질전환 토마토 식물체 유래 extracts를 CD1 line의 쥐에 1 주마다 한번씩 총 5 번 경구 투여하였다. Extract를 투여하기 전에 adjuvant 효과를 주기 위해 10  $\mu$ g colera toxin (CT)을 섞어서 주입하였으며, 한 그룹 당 4-5 마리의 쥐를 이용하여 6 개의 그룹으로 나누었다.

혈액내 생성된 항체를 측정하기 위해 첫 번째 투입한 후 7, 21, 35, 49, 70일에 다섯 번 혈액을 채취하였고, 채취한 혈액은 4°C에서 overnight 한 후 8000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 분리된 혈청은 비경합 간접 ELISA(enzyme linked immuno-sorbent assay) 방식으로 분석하였다. 먼저 antigen이 2  $\mu$ g/ml이 되게

coating buffer (0.05 M Tris-HCl, PH 9.0)에 녹인 후 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 loading 하고 4°C overnight 하였다. Plate에 binding이 되지 않고 용액 상태로 남아있는 antigen을 제거하기 위해 washing buffer (PBST, pH 7.4 ; phosphate buffered saline Tween 20)를 이용해 3 번 washing을 수행하였다. 채취한 혈청은 primary antibody로써 사용하였으며, washing buffer에 희석하여 섞은 후 100  $\mu$ l씩 loading 하여 상온에서 1 시간 반응하였다. 5 번 washing 한 후 peroxidase label된 anti-mouse IgG를 희석하여 secondary antibody로써 1 시간 반응시켰다. 반응 후 5 번 washing 한 후 발색 용액(0.05 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0, 1% tetra methyl benzidine, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 이용하여 30 분간 반응 시킨 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 중지시켰다. 반응이 멈춘 후 450 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도 값을 측정하였다.

Group	Extracts 투입량 ( $\mu$ g)	CT 첨가 여부
A	0	with CT
B	25	with CT
C	50	with CT
D	50	without CT
E	100	with CT
F	100	without CT

혈청 내에 어느 정도의 IgG 농도가 증가되었는지 관찰하기 위해 total IgG 농도를 측정하였더니 그림에서 보는 바와 같이 각 그룹별로 증가함을 확인하였다 (그림 35). 이러한 결과는 형질전환 토마토에서 발현되는 외래 단백질의 면역활성을 보여주는 중요한 기초 자료가 될 수 있다.

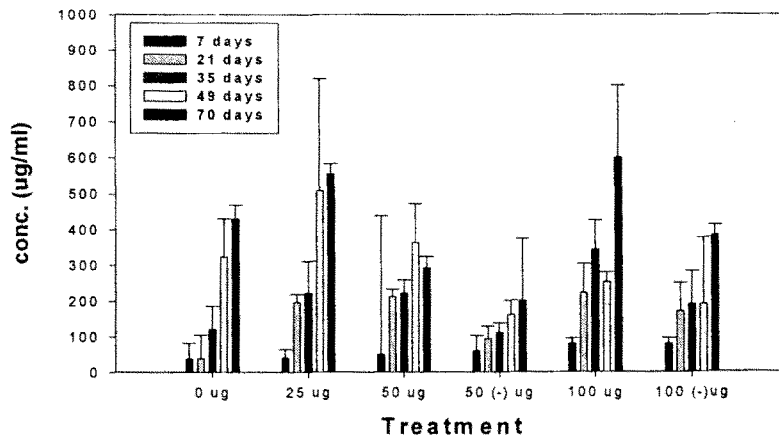


그림 35. CD1 mouse를 각각 6 개의 group으로 나누고, 형질전환 토마토 식물체 유래 extracts를 5 차례에 걸쳐 경구투여한 후 혈액을 채취하여 total IgG의 농도를 ELISA를 통해 조사

CD1 mouse에 각각 0  $\mu\text{g}$ (with CT), 25  $\mu\text{g}$ (with CT), 50  $\mu\text{g}$ (with CT), 50  $\mu\text{g}$ (only), 100  $\mu\text{g}$ (with CT) and 100  $\mu\text{g}$  (only)으로 extracts를 경구투여 함 Extracts를 처음 경구투여 후 7, 21, 35, 49, 70 일 경과 후 마다 total IgG의 분석을 위한 혈액샘플의 채취

혈액내에서 VP6에 특이적으로 반응하는 IgG의 생성여부 및 농도를 조사하기 위해 VP6에 반응하는 IgG를 ELISA 분석을 통해 조사하였다. CD1 mouse내의 혈액채취시료에서 모두 VP6에 특이적으로 반응하는 IgG가 생성되었으며, VP6의 경구 투여량이 증가할수록, 그 양은 증가하는 양상을 보여주었다. 또한, 투여한 후 시간이 지남에 따라 VP6에 특이적으로 반응하는 IgG의 양이 증가함을 보여주었다 (그림 36).

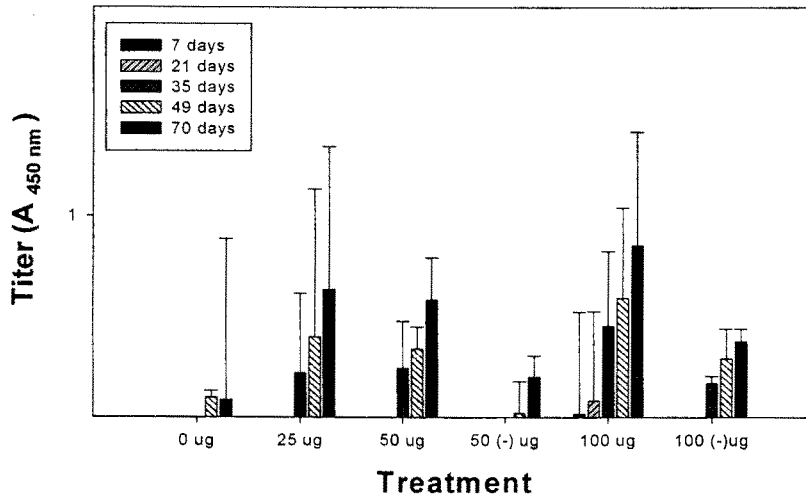


그림 36. CD1 mouse를 각각 6 개의 group으로 나누고, 형질전환 토마토 식물체 유래 extracts를 5 차례에 걸쳐 경구투여한 후 혈액을 채취하여 specific-VP6 IgG의 농도를 ELISA를 통해 조사

CD1 mouse에 각각 0  $\mu$ g(with CT), 25  $\mu$ g(with CT), 50  $\mu$ g(with CT), 50  $\mu$ g(only), 100  $\mu$ g(with CT) and 100  $\mu$ g (only)으로 extracts를 경구투여 함  
Extracts를 처음 경구투여 후 7, 21, 35, 49, 70 일 경과 후 마다 total IgG의 분석을 위한 혈액샘플의 채취

#### 나. 형질전환 식물체의 실용화 연구

##### 1) 형질전환 식물체 환경방출시 안전성 검토

본 과제를 통하여 생산된 형질전환 토마토 작물은 주변 환경으로부터 격리된 온실에서 재배되었다. 그러나 본 작물이 농가에 보급되어 실제 재배되고 있는 과정에서는 주변환경과 수많은 영향을 주고 받을 수 있는 노지에서 재배되는 것이 보통이다.

따라서 본 과제에서는 추가적으로 형질전환 식물체의 환경 방출시 안전성에 대하여 비교 검토하였다.

먼저 일반 토마토 작물과 형질전환 토마토 작물을 일반노지에서 재배하여 병해충에 의한 영향을 비교 조사하였다. 그러나 정상적인 토마토 작물이나 형질전환 작물이나 병해충의 영향은 별로 다르지 않았다.

다음으로 실제 토마토를 섭취하는 실험동물에 형질전환 토마토 작물을 섭취하게 하여 그 효과를 조사하였다.

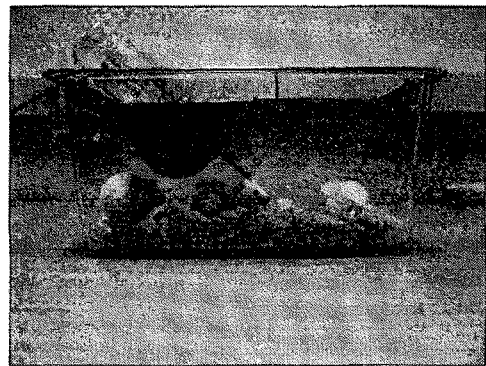
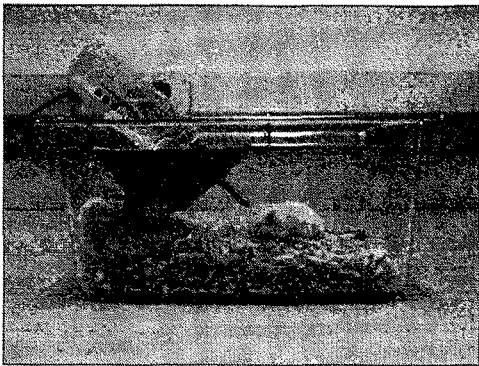


그림 37. 형질전환 식물체의 안정성 검증

병해충에 의한 영향에서와 마찬가지로 형질전환 토마토 작물을 지속적으로 경구투여한 쥐와 정상적인 토마토 작물을 지속적으로 경구투여한 쥐사이에 별다른 차이는 보이지 않았다.

## 2) 로타바이러스 감염예방 토마토 작물의 실용화 연구

로타바이러스 감염 예방 토마토 작물을 실용화하기 위해서는 토마토 작물의 상품성이 매우 중요하다. 그리고 이를 위해서는 우수한 품종의 토마토 순수계통 (pure line)을 확보하여야만 한다. 본 연구에서는 세계적인 종묘회사인 신젠타 종묘(주)의 육종연구소로부터 토마토와 방울토마토 각각 1 개 라인을 제공받아 현재 로타바이러스 감염예방 토마토 작물의 품종화의 문제점을 검토하고 있다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

연구내용	연도	2000 (1차 년도)	2001 (2차 년도)	2002 (3차 년도)	달성도
농가 소득 증대를 위한 로타바이러스 감염 예방성 토마토 작물 개발					
· 로타바이러스 감염 예방 기능성 관련 유전자인 VP2, VP6, VP7의 확보					100
· 항시 발현 및 조직 특이 발현을 위한 식물 발현벡터의 구축					100
· 식물체의 형질전환 및 형질전환 토마토 작물의 재분화 연구					100
· 형질전환 식물체의 분석					100
· 신 기능성 토마토 작물의 재분화 효율 증진 연구					100
· 형질전환 식물체의 선발 및 분석					100
· 형질전환 식물체의 양성 및 후대 검증					100
· 형질전환 식물체의 후대 분석					100
· 형질전환 토마토 작물의 선발					100
· 형질전환 토마토 작물의 신기능 효능 검증 연구					100
· 형질전환 식물체의 실용화 연구					100

- - - - 계획      ————— 수행

## 제 2 절    관련분야 기여도

급성 소아 장염의 중요한 원인체로 알려진 로타바이러스의 감염 예방을 위한 가용한 백신은 전 세계적으로 개발되고 있지 않다. 그래서 로타바이러스 감염 예방을 위한 식이성 식물 백신 개발 분야의 경우 매우 초보적인 단계에 있다고 할 수 있다. 본 연구결과를 통해 로타바이러스 감염 예방성 토마토 작물을 개발하였으며 실험 동물에서의 실험을 통해 식물에서 발현된 항원 단백질의 면역 유도성을 확인하여 형질전환 토마토 작물의 효능성을 검증하였다.

그리고 이 기술은 미국에 PCT 출원을 하였으며 이 과제와 관련해서 학술지에 1편을 보고하였으며 1 편은 투고준비 중에 있다. 또한 국내외 학술회의에서는 13건이나 발표한 바 있다. 특히 핀란드에서 개최된 Vaccine for Enteric Diseases VED 2001에서는 과제의 연구 결과 일부를 구두로 발표한 바 있는데 많은 연구자로부터 연구 내용에 대해 호평을 받기도 하였다.

본 연구 과제에서 수행된 로타바이러스 감염 예방성 토마토 작물의 개발 기술은 재조합 단백질의 순수 정제나 냉장 보관이 필요없게 되므로 개발도상국 또는 후진국에서 경제성 있게 이용할 수 있는 실용화 기술로써 산업화가 가능하리라 생각된다.

그리고 본 연구에서 확보된 연구 자료를 바탕으로 식물을 이용한 로타바이러스 감염 예방 백신이 개발된다면 생산 단가가 다른 시스템에 비해 매우 낮아 경제적 우위를 확보할 수 있으며 농가 소득의 향상은 물론 수출 경쟁력도 상승할 것으로 사료된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제에서는 급성 소아 장염의 중요한 원인체로 알려진 로타바이러스의 감염 예방성 토마토 작물을 개발하였다. 구체적으로 연구 개발 결과의 활용계획은 다음과 같다.

- 로타바이러스 감염예방 기능성 토마토 작물의 개발 기술은 농업 생산성 향상에 기여하는 식물 생명공학 관련 기초기반 기술로 활용할 수 있다.
- 본 연구 결과에서 얻어지는 신 기능성 토마토 작물은 품종화의 문제점을 검토한 후에 실용화 방안을 강구할 수 있을 것이다.
- 신 기능성 물질 함유 식이성 백신 생산 기술을 산업체에 기술이전을 할 수 있도록 특허 및 지적 소유권을 확보할 수 있다.
- 유전공학 기법을 이용하여 신 기능성 토마토 작물을 개발하여 농가 소득 증대 및 국민 보건 향상에 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구 계획서 제출 당시에 본 연구팀에서는 로타바이러스의 외피 단백질 VP2, VP6, VP7을 각각 발현하는 토마토 작물을 개발 하고자 하였다. 그리고 3 년간의 연구를 통해 로타바이러스의 외피 단백질인 VP2, VP6, VP7이 각각 발현되는 것을 확인하게 되면 다음 단계의 연구로 유사 바이러스입자(VLPs)를 생산하는 식물체의 개발이 가능해지기 때문이었다. 이것은 일부 연구자에 의해 유사 바이러스 입자를 만드는 경우에 효과적인 면역원성을 가진다는 것이 보고되었기 때문이었다 (Conner et al. 1996).

그러나 최근 연구 개발 과정에서 수집된 해외 기술정보에 따르면 로타바이러스 외피 단백질인 VP6는 보통 세 개의 입자가 모여 trimer 형태로 존재 할 수도 있는데, 이렇게 만들어진 VP6 trimer는 유사 바이러스 입자와 비슷한 성질을 가지며, VP2 또는 VP7 등의 다른 외피 단백질이 없는 상태에서 효과적으로 면역원성을 가질 뿐 아니라, 로타바이러스의 여러 외피 단백질 입자에 의해 만들어진 유사 바이러스 입자에 비교하여 결코 떨어지지 않는 면역원성을 가진다고 하였다 (Burns et al. 1996, Estes MK 2002).

따라서, 본 연구과제에서는 로타바이러스 외피 단백질 VP2, VP6, VP7을 각각 발현시키는 토마토 작물의 개발 연구에서 당초 연구 계획대로 연구를 진행하되, VP6의 중요성에 좀 더 초점을 맞추어 연구를 진행하였다.

## 제 7 장      참고문헌

### ● 전문 학술지

Birch CJ, Lewis FA, Kennett ML, Homola M, Pritchard H and Gust ID (1977) A study of prevalence of rotavirus infection in children with gastroenteritis admitted to an infectious diseases hospital. *J Med Virol* 1:69-77

Bishop RF (1993) Development of candidate rotavirus vaccines, *Vaccine*, 11: 247-254

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffrie BC, Stallings EP, Lewis C, Miles AJ, Chanock RM, Kapikian AZ and Parrott RH (1983) Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. *J Clin Microbiol* 18:71-78

Burns JM, Pajouh MS, Kaishnaney AA and Greenberg HB (1996) Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal anti-bodies that lack neutralizing activity. *Science* 272: 104-107

Conner ME, Zarley CD, Parsons BHU, Drabinski D, Greiner S and Smith R (1996) Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 174:88-92

Cunliffe NA, Bresee JS, and Hart CA (2002) Rotavirus vaccines : development, current issues and future prospects. *Journal of Infection* 45:1-9

Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes H and Ruck BJ (1975) Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* i:242-245

Estes MK and Cohen J (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbial Rev* 53:410-449

Estes MK (2002) Personal communication

Goddijn OJM and Pen J (1995) Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol* 13:379-387

Halsey NA, Anderson EL, Sears SD, Steinhoff M, Wilson M, Belshe RB, Midthun K, Kapikian AZ, Chanock RM, Samorodin R, Burns B and Clements ML (1988) Human-rhesus reassortant rotavirus vaccines: safety and immunogenicity in adults, infants and children. *J Infect Dis* 158:1261-1267

Hamza S and Chupeau Y (1993) Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*) *J Exp Bot* 44(269): 1837-1845

Jie Y (2003) Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Research* 12 (2): 163-169

Kalijot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB (1988) Infectious rotavirus enter cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis, *J Virol* 62: 1136-1144

Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL, Arrobio JO, Brandt CD, Rodriguez WJ, Sack DA, Chanock RM and Parrott RH (1976) Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med* 294:965-972

Kim KH, Suh IS, Kim JM, Kim CW, and Yang JM. (1989) Importance of rotavirus

- and adenovirus types 40 and 41 in acute gastroenteritis in Korean children. *J Clin Microbiol* 27:1192-1196
- Kurtz SM and Lineberger RD (1983) Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato. *J Am Hort Sci* 108(5): 710-714.
- Mason HS and Amtzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production systems *Trends Biotechnol* 13:388-392
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK and Amtzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci* 93:5335-5340
- O'Brien GJ, Bryant CJ, Voogd C, Greenberg HB, Garner RC and Bellamy AR (2000) Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus like particles. *Virology* 270(20):444-453
- Qingxian K, Liz R, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS and Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci*. 98:11539-11544
- Ruiz MC, Alonso SR, Charpilienne A, Vasseur M, Michelangeli F and Cohen J (1994) Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles, *Journal of Virology*, 4009-4014
- Zahra A, Greer AF and Tabaeizadeh Z (1995) Transformation of the wild tomato *Lycopersicon chilense* Dun. by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 15:102-105

## ● 단행본

Brown TA (1995) Gene cloning: an introduction. (3rd ed.) Chapman & Hall, Oxford, England

Croy RRD (1993) Plant molecular biology labfax. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England

Draper J, Scott R, Armitage P and Walden R (1988) Plant genetic transformation and gene expression. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England

Jones PG and Sutton JM (1997) Plant molecular biology. John Wiley & Sons, England

Negrutiu I and Charti-Chhetri G (1991) A Laboratory guide for cellular and molecular plant biology. Birkhauser Basel, Berlin, Germany

Pal Maliga, Daniel FK, Anthony RC, Gruissem W and Joseph EV (1995) Methods in plant molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A

Potrykus I and Spangenberg G (1995) Gene transfer to plants. Springer-Verlag, Berlin, Germany

Stanton BG and Robert AS (1994) Plant molecular biology manual. (2nd ed.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands

Walden R (1989) Genetic transformation in plants. Prentice Hall, New Jersey, U.S.A