

과제번호: 00-J-BP-01-B-68

T0005528

생 명 공 학 실 용 화 사 업
Bioproducts and Biotechnology Research

형질전환 이끼를 이용한 의약·축산용
기능성 단백질 생산
Production of pharmaceutical and livestock industrial proteins
by transgenic mosses

고 려 대 학 교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환 이끼를 이용한 의약·축산용 기능성 단백질 생산”과제의 보고서로 제출합니다.

2003 . 07 . 25

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 신 정 섭

연 구 원 : 조 성 현

” : 반 성 철

” : 유 민 경

” : Quoc Truong Hoang

협동연구기관명 : 대구대학교

협동연구책임자 : 최 장 원

보고서 초록

과제관리번호	00-J-BP-01-B-68	해당단계 연구기간	2000.8.10-2003.5.31	단계 구분	3단계/3단계
연구사업명	중 사업명	중 심 국 가 연 구 개 발 사 업			
	세부사업명	생 명 공 학 실 용 화 사 업			
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	형질전환 이끼를 이용한 의약·축산용 기능성 단백질 생산			
연구책임자	신 정 섭	해당단계 참여연구원수	총 : 24 명 내부 : 8 명 외부 : 16 명	해당단계 연구비	정부: 174,000 천원 민간: 15,000 천원 계: 189,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교 생명과학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약				보고서 면수	52
<p>식물체 내에서의 의약용 단백질 생산을 위해, 소의 성장호르몬인 bovine growth hormone (bGH)과 빈혈치료제인 erythropoietin (EPO) 유전자를 이끼에 도입하여 유전자 발현 양상과 활성도에 관하여 연구하였다. EPO와 bGH 유전자를 particle gun을 이용하여 이끼 내로 형질전환 하였고 PCR과 Southern 분석을 통하여 유전자 도입을 확인하였다. 이들 유전자가 대량 발현되는 형질전환체만을 Northern과 Western을 이용하여 선별하였다. 자체 개발한 20L 액체배양 기술로 대용량으로 증식시킬 수 있었다. 형질전환 이끼로부터 저순도로 분리 정제된 EPO는 약간의 활성도가 있는 것으로 확인되었으며, bGH 형질전환 식물은 활성도를 검증하지 못했지만, 형질전환된 효모에서 추출한 bGH를 사료에 첨가하여 어류를 이용하여 시험한 결과 활성도가 높은 것으로 판명되었다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	이끼, 형질전환, 재조합단백질, 액체배양, 대량발현			
	영 어	Physcomitrella, transformation, recombinant protein, liquid culture, mass production			

요 약 문

I. 제 목

형질전환 이끼를 이용한 의약·축산용 기능성 단백질 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 분자생물학의 발달로 유용 유전자의 도입을 통한 농작물의 개량에 성공한 국내외 사례들이 많은 보고 되고 있다. 그러나 지금까지의 식물형질전환 실험에는 바이러스 저항성, 해충 저항성, 제초제 저항성 같은 농업형질에 관련된 몇 가지 유용 유전자가 주를 이루어 왔으나, 1990년대에 들어서면서부터 선진국에서는 유용한 재조합 단백질의 대량생산에 목표를 둔 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한 식물조직배양 기술이 접목된 형질전환식물을 이용한 고부가가치 재조합 단백질의 대량생산은 동물세포나 미생물 생산 시스템에 비하여 상대적으로 낮은 생산가격, 대량생산의 용이, 우수한 단백질 저장성 등의 장점이 있을 뿐만 아니라 인체단백질의 경우 생산과정 중 동물바이러스와 같은 병원체들의 감염 우려가 없다는 것이 특히 중요한 장점이다 (Giddings et al., 2000) 이러한 세계적인 기술동향에 비추어, 이끼는 다른 식물에 비하여 많은 장점을 갖고 있기 때문에 핵 및 엽록체 형질전환 이끼를 이용한 유용 단백질의 대량 생산 연구는 산업적 가치와 필요성이 높다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

기내배양기술과 형질전환기술이 체계화되어 있고 배양과 재분화가 여러 다른 식물보다도 월등하게 용이하고 빠른 이끼 *Physcomitrella patens*를 이용하여 의료용 및 축산용 고시장성 단백질의 대량생산을 위하여 이끼 핵내 형질전환기술과 엽록

체 형질전환기술을 동시에 사용하였다. glycosylation이 필요가 없는 bovine growth hormone (bGH) (Choi et al., 1999)과 glycosylation이 기능에 중요한 역할을 한다고 알려진 erythropoietin (EPO) (Fried, 1995) 유전자를 도입하였다. 이끼 형질전환체 뿐만 아니라 담배의 형질전환체를 확보하여 유전자 발현을 규명하고 대량생산체계를 갖춘 시스템에서 발현된 단백질의 활성변화에 관한 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발결과

EPO와 bGH 유전자를 각각 핵 및 엽록체 형질전환용 벡터에 도입하였고, 이를 particle gun을 이용하여 이끼의 형질전환체들을 확보하였으며 PCR과 Southern 분석을 통하여 유전자 도입을 확인하였다. Northern과 Western을 이용하여 특별하게 over-expression되는 형질전환체만을 선발하였고 자체 개발한 20L 대량배양 기술로 단백질 발현 연구를 수행하였다. 일본의 나고야 대학과 공동으로 개발한 이끼 엽록체 형질전환용 발현벡터의 경우는 특허를 출원하였으며 본 실험에 직접 이용하였다. 형질전환 이끼로부터 저순도로 분리 정제된 EPO의 MTT assay 결과 상용화된 EPO 대조군에 비해 활성도가 낮으나 약간의 활성도가 있는 것으로 확인되었다. His-tag column을 이용한 고순도 정제 후 추가 MTT assay를 수행 중에 있으며, bGH가 도입된 이끼의 형질전환체들의 경우 생장 속도 및 상태에 문제가 있어 추가로 다수의 형질전환체들을 선발하여 분석 중에 있다. 그러나 형질전환된 효모에서 추출한 bGH를 사료에 첨가하여 잉어류인 치어에서 시험한 결과 활성도가 높은 것으로 판명되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

기존의 미생물과 동물세포를 이용한 재조합 단백질의 생산체제를 식물에서 대량생산하는 체제로 변화되는 세계적인 추세에 따라 본 연구는 형질전환된 이끼를 직접 이용하는 방법과 단백질을 순수 분리하여 이용하는 방법을 모두 고려하여

활용한다. 기내 액체대량생산 체계를 이용하여 산업화가 가능하도록 하며, 본 실험에서 사용된 것 이외 더 다양한 유전자들을 이용하도록 적극 활용할 방침이다. 본 실험에서 체계적으로 증식된 이끼들은 타 연구소들에 분양하여 응용 및 기초 연구분야에서 활용하도록 하며, 이끼를 모델 식물 시스템으로 활용될 수 있도록 제공하며 산업화 가능한 여러 물질 생산에도 이용할 수 있도록 활용할 계획이다.

S U M M A R Y

Recently, plant biotechnology combined with plant tissue culture techniques has been rapidly developed to engineer crop plants. Furthermore, plants are very attractive biological systems for the production of pharmaceutical recombinant proteins owing to many advantages, such as mass production with relatively low costs, extremely stable storage of proteins in tissues, similarity of translational modification machinery with animal, and safety from animal virus contamination. The moss *Physcomitrella patens* is well known for easy transformation, simple life cycle and the possibility of mass production. Therefore, it is worthy of trying to produce pharmaceutical proteins through nuclear and plastid transformation in mass scale with a view of industrialization.

In this project, we used bovine growth hormone (bGH) and erythropoietin (EPO) genes for producing their recombinant proteins in *Physcomitrella*. First of all, genes for bGH and EPO were introduced into vectors for the nuclear and plastid transformation. These vectors were transformed into *Physcomitrella* via particle bombardment. The presence of introduced genes were identified by genomic PCR and Southern blot analyses. Foreign gene expression within transgenic plants were examined by northern blot analyses. Over-expressed lines were selected and subjected to immunoblot analyses.

These transgenic plants were propagated in 20 L liquid culture system which were newly developed in this lab. Plastid transformation vector for *Physcomitrella* were developed in corporation with Nagoya university in Japan, and applied for a patent. Crude EPO proteins from transgenic plants showed a little activity, though it's activity was relatively lower than that of positive control. Unfortunately, bGH activity was not able to be confirmed with proteins from transgenic plants. However, bGH produced in yeast showed high *in vivo* activity when it was tested for the growth of young carps. Transgenic plants from this project will be distributed to other institutes for further application. In addition, *Physcomitrella* is going to be supplied as a model plant system and a bioreactor for the production of pharmaceuticals.

C O N T E N T S

Chapter 1. Outline of the Research	9
1. Background and Necessity of Research	9
Chapter 2. Current view of Research	16
1. Accomplishment of Other Research Groups	16
2. Weak points of Present Technologies	17
Chapter 3. Contents and Results of the Research	18
1. Materials and Methods	18
2. Results	20
3. Major Achievements	38
Chapter 4. Achievement of Goals and Contribution to the Related Field	39
1. Achievement of Research Goals	39
2. Contribution to the Related Field	40
Chapter 5. Plan for Application of Achievements	42
1. Necessity of Additional Study	42
2. Orientation for Industrialization	42
Chapter 6. Overseas Trends of Related Fields	43
1. Big Increment of Genomic Study on <i>Physcomitrella</i>	43
Chapter 7. References	44

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	9
1 절 연구개발의 배경 및 필요성	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	16
1 절 국내외 타 연구기관의 연구개발 실적	16
2 절 현 기술상태의 취약성	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	18
1 절 연구의 재료 및 연구 방법	18
2 절 연구 내용 및 결과	20
3 절 대표적 성공사례	38
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	39
1 절 연구 개발목표의 달성도	39
2 절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도	40
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	42
1 절 추가연구의 필요성	42
2 절 기업화 추진 방향	42
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	43
1 절 이끼 <i>Physcomitrella patens</i> 에 관한 genomics 관련 연구의 증가	43
제 7 장 참고문헌	44

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 배경 및 필요성

1. 기술적 측면

가. 식물조직배양 및 형질전환기술의 일반 현황 및 전망

- ▷ 식물조직배양 기술은 기내 대량증식 (mass propagation), 무병주 생산 (virus-free stock production), 원연간 잡종생산, 기내 육종, 2차 대사산물 생산, 초저온 저장, 형질전환체 개발 등 다양한 분야에 이용되어 왔다. 외래유전자 도입의 식물형질전환 기술이 1983년에 개발된 이후 1995년까지 34개 국가에서 총 56개의 식물종이 형질전환되어 포장시험이 허가되었는데, 등록된 허가는 3,547건으로 매년 급격하게 신청이 증가되고 있다.
- ▷ 외부유전자를 일시적으로 도입하는 방법은 바이러스, 리포솜, 양이온성 물질 등 매개체를 이용하고, 안정적으로 도입하는 방법으로는 *Agrobacterium*, microinjection, electroporation, particle gun, polyethylene glycol (PEG), *in planta* transformation 등이 널리 사용되고 있다. 특히 이들 중에서 PEG, *Agrobacterium*과 particle bombardment가 가장 널리 이용되고 있는데, *Agrobacterium*를 폭넓게 사용하기 위하여 host 범위가 넓은 균주를 선발하는 연구가 다양하게 진행되고 있다.
- ▷ 최근 분자생물학의 발달로 전통적인 육종방법으로는 이룰 수 없었던 농작물의 특이적 형질을 개량한 성공사례가 국내외에서 많이 보고되고 있다. 미국 『Calgene사』는 지방산 대사에 중요한 효소 12:0-acyl-carrier protein thioesterase를 이용하여 laurate와 stearate 지방산 조성을 높은 유채를 개발하였고, 『버클리대학교』에서는 Monellin에 관련된 유전자를 토마토에 도입하여 단맛이 월등한 품종을 개발하였고, 『Monsanto사』는 전분생성과 관련된 유전자를 감자에 도입하여 전분의 함량이 30~60% 이상 높고 수분함량이 상대적으로 적어서 칩을 생산할 때 기름이 덜 함유되는 품종을 개발하였다. 이외에도 『Mycogen사』 등에서는 *Bacillus thuringiensis*에서 추출한 BT toxin 유전자를 형질전환하여 Coleopteran 및 Lepidopteran 곤충류에 살충효과를 갖는 식물체들을 개발하였다.
- ▷ 지금까지의 형질전환실험에는 바이러스 저항성, 해충 저항성, 제초제 저항성 같은 농업형질에 관련된 몇 가지의 유용 유전자가 주를 이루고 있으나, 향후 다양한 유전

자들이 이용될 것으로 보인다. 형질전환식물은 Genetically Modified (GM) Food 로 이용하기 위한 경우도 있지만, 1990년대에 들어서면서부터 선진국에서는 부가가치가 높은 『재조합 단백질』을 대량 생산을 위하여 연구가 많이 진행되었다. 형질전환 식물을 이용하여 재조합 단백질을 생산할 경우에는 상대적으로 낮은 생산가격, 대량생산의 용이함, 우수한 단백질 저장성 뿐만 아니라 인체단백질의 경우에는 동물 바이러스 등의 병원체 감염의 우려가 없다는 중요한 장점 등이 있다 (Fischer et al., 2000).

- ▷ 따라서 선진국에서는 여러 가지 재조합 단백질들을 식물에서 발현시켰으며, 미국에서는 형질전환 옥수수에서 생산되는 avidin과 beta-glucuronidase를 상업화에 성공하여 식물에서 대량 생산하고 있다. 한편 human serum albumin의 경우는 인체에서 얻는 것을 꺼리는 세계적인 추세 때문에 주목받을 것으로 보이며, 식물에서 항체를 대량생산하는 것은 가격경쟁력에 있어서도 동물보다 유리할 것으로 예상된다.
- ▷ 최근 인체, 식물, 미생물의 genome에 관한 연구가 활발하게 진행되어, 이미 많은 유용 유전자가 확보되었다. 또한 형질전환 기법의 발달로 전통적인 방법으로는 이를 수 없었던 농작물의 특이적 형질 개량과 미생물내의 동식물 유용 유전자의 발현에 관한 성공사례가 많이 보고 되고 있다. 이러한 기초 및 응용연구의 점진적인 발전에 따라 21세기에는 산업적으로 활용 가능한 유전자 및 인위 조작된 유전자를 식물체에 도입하여 고기능성 신물질을 대량 생산하고자 하는 연구가 전 세계적으로 진척 또는 계획되고 있다.
- ▷ 2차대사산물을 대량 생산하기 위한 모상근 (hairy root)을 이용한 연구도 많이 수행되었는데, *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 목적하는 식물체의 부위로부터 모상근을 유도, 배양함으로써 다량의 유용한 2차대사산물의 획득이 이루어지고 있다. 그 한 예로서 일본의 『Meiji와 Nitto Denko사』는 인삼의 모상근 배양과 세포배양으로 saponin의 대량생산의 상업화에 성공한 바 있으며, 국내에서도 『한국인삼연초연구소』와 『(주)환인제약』에서 saponin을 대량 생산하는 연구를 수행한 바 있다.
- ▷ 일본은 식물세포배양기술, 특히 2차대사산물의 생산에 있어서는 세계최고라고 할 정도로 기술력을 갖고 있으며, 세계에서 가장 먼저 식물세포배양의 상업화를 이룩하였다. 『Mitsui사』에서는 1982년에 이미 바이오리프스틱으로 불리는 shikonin을 식물세포 배양으로 대량생산 체계를 확립하였고, 『Japan Tobacco Industry사』는 20,000리터 규모의 담배세포 배양에 성공하였다. 『Kyowa Hakko사』에서는 plasmin inhibitory protein과 plant virus inhibitor를 식물세포에서 발견하는데 성공하였다. 이외에도 일본의 여러 회사들은 대학이나, 국립연구소들과 공동 또는 개별 연구를 통해 여러 가지 유용물질들의 대량생산에 성공하였다. 예를 들면 『Nippon

Oil사』는 항암제의 유도체인 podophyllotoxin을, 『Sumimoto Industry사』는 Scopolamine을, 『Mitsui사』는 berberine과 vinblastin을 식물세포 배양으로 대량생산할 수 있는 공정을 개발한 바 있다.

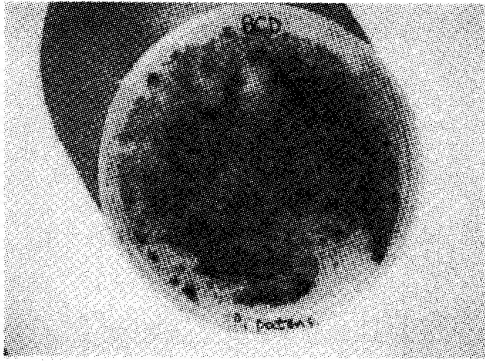
- ▷ 미국의 식물세포 대량배양 연구는 『NCI』에서 개발한 항암제 Taxol의 대량생산연구로 활발해졌고 Taxol의 대량생산연구에는 『Bristol-Meyers』, 『Phyton Catalytic』, 『Escagenetics』 등의 회사가 참여하였으며, 『Escagenetics』는 vanilla flavour 생산 연구에도 성공한 바 있다.
- ▷ 보다 최근에는 담배 엽록체에 human somatotropin 유전자를 도입하여 인체 단백질의 구조 및 기능과 거의 유사한 재조합 단백질을 생산하는데 성공하였다고 보고되었으며 (Staub et al. 2000), 이외에도 특정한 vaccine의 생산과 recombinant blood factor 및 antibody 생산에 식물세포를 이용하고자 하는 많은 시도와 성공이 있었다 (Hugh et al., 1992).
- ▷ 동물세포를 이용하면 생산비용이 매우 높고 인체바이러스의 감염의 우려가 높아서 이용을 꺼리고 있으며, 효모의 경우에는 1 g/L의 단백질 생산량으로 너무 효율이 낮을 뿐 아니라 박테리아는 10~20 g/L의 생산량을 내기는 하지만 codon usage의 문제점과 정제효율이 매우 낮다는 것이 일반적인 문제점이다. 최근의 국제적인 기술동향을 보면 가능하면 인체 단백질을 형질전환과 재분화가 용이한 식물체를 이용하고자 하는 추세이며, 국내에서도 몇몇 대학과 기관에서 많은 시도가 되고 있다.
- ▷ 하지만 본 계획에서처럼, 핵 및 엽록체 형질전환이 매우 용이하게 수행되며 대단히 짧은 기간에 발현 결과를 얻을 수 있는 이끼를 이용한 경우는 없다. 외국에서도 이끼를 이용한 유용단백질 생산에 연구를 하고 있는 기관은 독일 University of Freiburg의 Ralf Reski 교수 밖에 없다. Reski 교수는 현재 기업체와 연계하여서 대외비로 연구를 수행하고 있어서 어떠한 연구를 얼마나 진척하였는지는 미지수이나 아직 진입단계에 있는 것으로 파악된다. 하지만 본 과제책임자의 실험실에서만 가능한 이끼 엽록체 형질전환기술을 직접적으로 이용하지 못하고 핵내 형질전환기술만 이용하고 있어서 단백질 생산효율에 문제가 있을 것으로 생각된다.

나. 이끼 연구의 국내외 현황 및 본 연구개발의 필요성

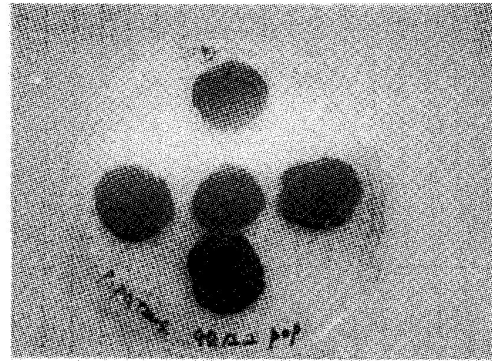
- ▷ 이끼류 (Mosses)는 분류학상으로 Bryophyta 部門 (Division)의 Musci 綱 (Class)에 속하며, 형태는 조류와 공통적인 면이 많지만 진화정도의 측정이 불가능할 정도로 기원이 불확실하다. 하등식물인 이끼류는 정상적인 화기구조를 갖는 고등식물의 선조 (progenitor)에 해당될 것으로 가정되지만, 진정근이 없으며, 성장체나 유관속계

가 발달되어 있지 않을 뿐 아니라 목질화된 부위를 갖지 않는다는 점 등에서 여러 가지 형태적으로 고등식물과 구분되는 특징이 많다 (Cove et al., 1997) 하지만 분자생물학적 연구의 모델 식물체로써 이끼는 많은 장점을 가지고 있다. 본 실험의 재료로 선택한 풍경이끼인 *Physcomitrella patens*의 주요 특징은 다음과 같다 (그림 1).

- ① *Physcomitrella patens*를 포함한 이끼류들은 실험실내에서 조작이 용이하고 간단한 기본배지에서 2~3개월 내에 하나의 포자나 원형질체로부터 완전한 생활사를 마칠 수 있다. 적합한 배지에서 광량, 광질, 온도 및 습도를 인위적으로 조절할 수 있기 때문에 발육 단계에 따른 유전자 발현연구에도 유용하게 이용될 수 있다 (Cove et al., 1993). 또한 대사과정이 고등식물 보다 상당히 간단하여 생체 대사조절 연구에도 적합하다 (Schumaker et al., 1998).
- ② 이끼 생장사의 대부분을 차지하는 gametophyte 시기는 haploid이므로 돌연변이체를 쉽게 분리할 수 있다. 이러한 반수체의 다른 장점 중의 하나는 외부에서 도입된 유전자들이 보다 쉽게 후대로 유전될 수 있으므로 형질전환된 유전자들의 test-tube로서, 이끼는 용이하고 신속한 model system이 될 수 있다 (Schaefer et al., 2001)
- ③ Haploid system을 사용하면 transposable element를 이용한 유전자 tagging 기법을 적용할 수 있는 가능성과 잠재성이 매우 높다. 즉, 변이체를 창성하는 효율성 뿐만 아니라 관련된 유전자를 분리하는 것이 *P. patens*를 이용하면 용이하다.
- ④ 이끼의 발육 중에 생성된 생화학적·형태학적인 돌연변이체들이 이미 많이 보고되어 있다 (Featherstone et al., 1990)
- ⑤ 세포벽의 조성이 단순하여 Driselase 효소로 간단하게 원형질체를 분리할 수 있다. 또한 원형질체 융합으로 만들어진 hybrid 중에서 선발된 돌연변이체에 대한 genetic complementation 분석이 실시되었으며, 특정 대사경로나 발달단계에 필요한 최소 숫자의 유전자들이 보고 되는 등 기초 연구가 이미 확립되어 있다.



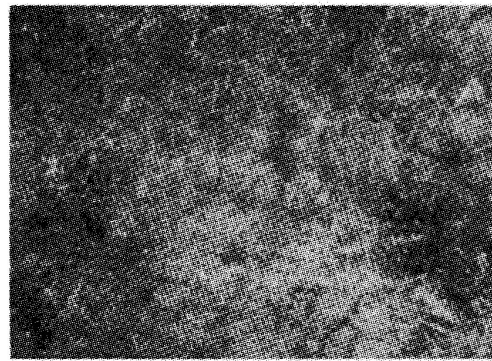
(Protonema)



(Gametophore)



(Protonema and Gametophore)



(Bud)

<그림 1> Life cycle of the moss *Physcomitrella patens*.

- ⑥ 고등식물 처럼 교배가 가능하다.
- ⑦ *P. patens*의 또 다른 장점은 상대적으로 작은 genome size를 가지고 있다는 것이다 (6×10^8 bp). *Arabidopsis thaliana*의 10^8 bp에 비하면 6배 크지만, 옥수수 6.6×10^9 bp, 담배 1.1×10^9 bp, 양과 1.5×10^{10} bp에 비하여 상당히 작은 게놈을 갖고 있다. 또한 *P. patens*의 DNA에는 enhancer같은 element를 포함한 intron 부위가 있고, 고등식물의 light-inducible sequence와 부분적으로 유사한 5'-sequence를 가지고 있는 등 고등식물과 유사성이 거의 일치한다.
- ⑧ 최근에는 homologous recombination을 이용한 유전자 targeting과 knock-out 이 식물에서는 최초로 보고 되었으며, mouse나 다른 어떤 종보다도 월등하게 높은 gene knock-out 효율이 보고 된 바 있다 (Schaefer et al., 1997).
- ⑨ 형질전환 효율이 매우 높고, 재분화가 극히 빠르다는 점은 본 연구과제에서

가장 필요로 하는 조건 중의 하나이다. Protonema를 갈아서 세포주로 나누어 배지에 투입하면 새로운 colony로써 재 발육되고, homogenate들은 냉장고 안에서 6개월 동안 보관된다고 하여도 생명력을 유지할 수 있다.

- ⑩ 엽록체 계놈도 고등식물과 상당히 유사한데, 엽록체 rRNA 유전자의 경우 일반적인 순서나 배열이 2가지의 예외를 제외하고는 동일하다는 것이 밝혀졌다. (Reski, 1999) 또한 본 과제 책임자의 연구실에서는 이끼에서는 처음으로 엽록체 형질전환이 가능하다는 것을 보고하였다 (Cho et al., 1999).

- ▷ 이러한 모든 조건들을 고루 갖춘 식물 재료를 찾기는 용이하지 않기 때문에 *Arabidopsis thaliana*나 담배 이상의 모델 식물체로 *P. patens*를 이용하고자 하는 추세이다. 고등식물들에 형질전환기법을 직접 이용하는 작업 자체가 쉽지 않고 도입된 유전형질의 발현을 관찰하기에는 오랜 기간이 소요되기 때문에 사실상 유전자 발현을 관찰하기에는 매우 부적합하다.
- ▷ 하지만 개발의 필요성이 높은 많은 인체 유용단백질의 경우에는 glycosylation과 같은 생체내 modification이 활성화에 필수적인 경우가 많다. 본 연구는 일단 glycosylation과 같은 세포내에서의 modification이 필요하지 않는 단백질을 CaMV 35S promoter를 갖는 vector에 재조합시켜서 이끼의 핵과 엽록체 형질전환을 이용하여 대량 생산하는 목적이다. 그러나 이끼의 세포내 단백질 modification 정도는 고등식물과는 많은 차이가 있는 것으로 알려져 있고 고등식물 보다는 월등하게 유전자 조작에 의한 발현이 간단하고 단기간에 가능하기 때문에 이 부분에 대한 기초연구도 동시에 수행할 계획이며, 이의 결과는 시장성이 매우 높으나 동물의 세포에서는 생산이 불가능하였던 단백질 생산의 한계를 극복하는데 필수적이므로 반드시 해결해야 할 선결과제라고 생각된다.

2. 경제 · 산업적 측면

- ▷ 세계 생명공학 산업은 1995~2005년 기간 중 22%의 고도성장이 예상되어 반도체 (9.4%), 메커트로닉스 (9.1%) 등 다른 첨단 산업분야의 성장률을 훨씬 상회할 것으로 전망하고 있고, 세계의 생물 시장은 1992년 100억 달러 이후 2000년 1,000억 달러가 예상되어 10배 이상 확대되고 있다. 그중 식물관련 생명공학산업은 약 30~40%에 달할 것으로 추정된다.
- ▷ 국내 생명공학시장은 1995년 약 2,500억원에서 1998년 6,500억원으로 급속 성장하였

으며, 2010년에는 약 9조원의 시장형성이 예상된다.

- ▷ 주로 대장균과 효모 혹은 곤충세포를 이용하고 있는 재조합 단백질 생산의 틀을 바꾸어서 식물에서 대량생산하고자 하는 것은 이미 세계적인 추세이다. 이끼의 장점은 이미 상기에서 설명하였지만, 특히 광량과 온도만 적절하게 조절하면 간단한 액체배지에서도 배양이 가능하다는 점이다. 단백질 생산의 공장화에 필수적인 기내 액체대량생산의 체계를 이미 갖추고 있기 때문에 적용이 용이하며 저비용의 투자로 충분히 생물공정에 의한 산업화가 가능할 것이다.
- ▷ 현재 국내에서도 유망한 벤처회사가 출현하고 벤처산업이 국가적인 차원에서 육성됨에 따라 개인투자거나 기업투자자들에 의한 활발한 투자로 해당 연구가 가속화되고 있다. 하지만 식물체에서 이러한 재조합 단백질을 생산하는 연구는 미진하기 때문에 정부차원의 연구투자가 필요하다.

3. 사회·문화적 측면

- ▷ 식용작물의 형질전환체에 대하여는 일반인들이 상당한 거부감을 갖지만, 직접 먹는 작물이 아닌 기내 배양된 하등식물에서 추출한 물질을 산업에 이용하기 때문에 생명공학에 대한 거부감을 줄이고 오히려 일반국민들의 거부감을 미래지향적으로 전환시킬 수 있다.
- ▷ 또한 의료용 단백질의 경우에는, 인체와는 전혀 다른 시스템을 사용하여 단백질을 생산하는 것이므로 인체 바이러스 등의 병원체의 감염으로부터 안심할 수 있으며, green life인 식물체에서 추출한 것에 대한 좋은 감정이 작용하여 시장성이 월등하게 높을 전망이다.
- ▷ 생명공학에 대한 일반인들의 우려점 중의 하나는 조작된 유전자를 생체에 도입함에 따라서 그 유전자가 다른 생명체로 이동된다는 이유 때문이다. 하지만 열록체는 모계유전이 되기 때문에 화분에 의한 형질전환체의 환경으로의 오염을 방지한다는 측면에서 시민들의 우려를 불식시킬 수 있다.
- ▷ 하등식물에서도 고등생물 혹은 미생물 유래 유전자의 발현을 효과적으로 달성할 수 있다는 개념이 확산되게 되면 생명에 대한 중요성이 사회적으로 확산하게 된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1 절. 국내 · 외 타연구기관의 연구개발 실적

- ▷ 풍경이끼인 *Physcomitrella patens*에 관한 초기 연구는 영국 University of Leeds의 David Cove 교수가 독보적으로 수행하였다. Model plant로서 *P. patens*는 *Chlamydomonas reinhardtii*와 같은 조류에 비하여는 형태학적으로나 유전학적으로 복잡하고, *Arabidopsis thaliana* 같은 고등식물보다는 훨씬 간단하여 여러 가지의 연구에서 매우 적합한 식물체인 것으로 판명되었다 (Reski, 1998).
- ▷ *P. patens*의 형질전환 기술은 전적으로 영국의 David Cove 교수와 Celia Knight 박사, 독일 University of Freiburg의 Ralf Reski 교수에 의하여 발전되었다. PEG를 이용한 기법 (Knight, 1994)과 유전자총을 이용하여 형질전환이 효율적으로 수행되고 있다. 이러한 국제적인 추세에도 불구하고 국내에서는 경제적 가치가 없다는 이유 등으로 연구가 확대를 받고 있다.
- ▷ 이끼 *P. patens*를 모델 식물체로 채택하여 최근에는 functional genomics가 활발하게 진행 중에 있다. Mouse에서만 거의 보고 되었던 homologous recombination에 의한 knock-out이 식물에서 최초로 *P. patens*에서 보고 되었고, 효율적인 면에서는 오히려 mouse의 경우를 훨씬 능가한다는 것이 알려지면서 (Schaefer, 2001), 연구가 더욱 활발하게 진행 중에 있다 (Girod et al., 1999; Girke et al., 1998; Koprivova et al., 2002).
- ▷ 식물체의 핵 내에 유전자를 도입하여 신품종을 육종한 경우나 기능성 물질의 발견을 보고한 것은 많으나, 엽록체 형질전환에 성공한 예는 손꼽을 수 있을 정도로 극히 적다. 이 분야의 세계적으로 가장 앞서가는 실험실은 Auburn University의 Henry Daniell 교수와 Rutgers의 Pal Maliga 교수의 실험실이다.
- ▷ 지금까지 전세계적으로 엽록체 형질전환을 성공하여 지속적으로 연구논문이 나오는 식물은 단세포 조류인 *Chlamydomonas reinhardtii* (Bateman et al., 2000)와 고등식물인 담배 (Svab et al., 1993)이며, 최근에 감자 (Sidorov et al., 1999)와 *Arabidopsis*에서 성공 가능성을 보고한 논문이 발간되었다.
- ▷ 보다 최근에는 담배 엽록체에 human somatotropin 유전자를 도입하여 human 단백질의 구조와 기능이 거의 유사한 재조합 단백질을 생산하는데 성공하였다는 보고가 있었으며, 이외에도 특정한 vaccine의 생산과 recombinant blood factor, antibody 생산에 식물세포를 이용하고자 하는 많은 시도와 성공이 지속적으로 있었

다 (McCormick, 1999).

- ▷ 이끼 형질전환이나 엽록체 형질전환에 대한 국내 연구는 본 과제책임자의 연구실을 제외하고는 전무하다. 하지만, 일반적인 식물 형질전환 실험은 국내에서도 농촌진흥청과 생명공학연구소 등의 국가기관 연구소와 종묘회사 등의 기업체를 비롯하여 많은 대학교에서 이미 벼, 고추 등의 여러 가지 작물에 시도하여 탁월한 연구결과가 나오고 있다.
- ▷ 식물 형질전환체를 이용한 유용 단백질 생산에 관한 국내 연구는 아직 특별히 가치적인 결과가 있지는 않지만, 전북대학교 양문식 교수 연구실을 비롯하여 몇몇 벤처 회사에서 관심을 갖고 연구 중에 있다.
- ▷ 하지만, *P. patens*의 산업적 이용에 반드시 필요하다고 생각되는 엽록체 형질전환 기술은 전적으로 본과제책임자에 의해서 수행되었고 2000년 6월 30일부터 7월 2일 까지 스위스에서 개최된 Moss 2000 학회에서 발표하여 특별한 관심을 모았다.

2 절. 현 기술상태의 취약성

- ▷ 식물 형질전환 실험은 국내에서도 농촌진흥청과 생명공학연구소 등의 국가기관 연구소와 종묘회사 등의 기업체를 비롯하여 많은 대학교에서 이미 벼, 고추 등의 여러 가지 작물에 시도하고 있으며, 탁월한 연구결과가 나오고 있다. 즉, 핵 내 형질전환은 연구수행이 충분한 수준에 있다. 하지만 엽록체 형질전환은 극히 국한적인 실험실에서만 수행되고 있다.
- ▷ 하지만 본 기술에 대한 국내 저변이 얇음에도 불구하고, 관련된 기술이 이미 축적이 되어있고, 형질전환의 경험이 많기 때문에, 선진국과 기술적으로 경쟁할 수 있는 수준에 있다. 다만 좋은 재료를 찾지 못하여 성공한 예가 없을 뿐이다. 특히 본 연구실에서는 이미 기술력이 확보되어 있어 선진국 대비 기술력의 격차가 없다고 사료된다.
- ▷ 유용 단백질을 형질전환 식물체에서 분리하는 기술은 국내 연구진에도 충분히 있다고 판단된다. 다만, 의료용 단백질의 식물체내 생산에 관한 연구가 극히 적은 연구실에 국한되어 있어서 국제적인 경쟁력이 뒤떨어지기 때문에, 무엇보다도 국내 연구의 저변 확대가 필요하다.
- ▷ 형질전환 식물체의 기내 대량생산과 공정기술의 경우에도 국내 연구진에 의해서 독자적인 연구가 충분한 정도의 생물공학기술이 갖추어져 있다. 향후 국내의 관련 연구진과의 공동연구를 통하여 이러한 문제를 충분히 극복할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1 절. 연구의 재료 및 연구방법

1. 이끼 *P. patens*의 재배

최적 환경조건인 온도 24-26 °C, 빛 5-20 W/m²의 배양기 및 배양실에서 연중 배양하였다. 배지는 고체배지로써 TES를 함유하는 calcium-free 배지인 BCD배지를 이용하였다 (Ashton et al., 1977). *P. patens*의 포자에 400 µl의 살균수를 넣고 50 µl씩 배지위에 분주하여 넓게 퍼지게 하여 발아시켰으며, Protonema와 chloronema 형태로 왕성하게 재배되도록 유지하였다. 계대배양은 protonemal 혹은 chloronemal tissue를 살균수에 넣고 blender를 이용하여 아주 잘게 갈아서 사용하였고, 성장효과를 증대시키기 위해 di-ammonium tartrate 5 mM을 nitrogen source로써 BCD 기본배지에 추가로 공급해 주었다. 계대배양에 사용되는 고체배지 위에는 셀로판지 (type 325p. Cannings, UK)를 놓고 그 위에 조직즙액을 부어서 배양하였다. 셀로판지는 여러 가지 효과가 있는데, 지속적인 계대배양 시에 효율적으로 조직을 옮길 수가 있다는 장점과 particle gun으로 형질전환 실험을 실시한 후 선발배지에 조직을 옮겨야 할 때도 셀로판지 전체를 쉽게 옮길 수 있다. 왕성하게 성장하는 재료들은 경우에 따라 15°C에서 단기저장 하거나 포자의 형태로 장기간 저장한다.

2. 유전자총 (gene gun)을 이용한 이끼 형질전환

이끼는 유전자총을 사용하기 위하여 고등식물에서 처럼 callus를 유도하여 모으는 등의 복잡한 준비가 필요가 없고, 배지위에서 치밀하게 자라는 조직에 직접 처리하는 장점이 있다. 6일 정도 배양된 protonema 조직을 준비하고, 형질전환용 DNA는 CsCl-purified supercoiled plasmid DNA를 이용하였다. Tungsten 혹은 Gold particle을 현탁시킨 용액에 5 µg의 DNA를 넣고, 25 µl의 2.5 M CaCl₂와 10 µl의 0.1 M spermidine을 첨가하여 vortex하여 10분간 실온에 두어서 DNA particle을 준비하였다. 유전자총은 Bio-Rad사 제품 (PDS-1000)을 사용하였으며, Plate를 gene gun의 stopping plate 밑 8 cm 지점에 위치시키고, 가속은 1100 psi의 He 압력으로 실행하였다.

3. 형질전환에 이용된 plasmid vector DNA

Hygromycin 저항성 유전자를 갖고 35S promoter, polylinker와 polyadenylation sequence를 동시에 갖는 pLug3와 pJit161을 핵 내 유전자 도입 실험에 사용하였으며, spectinomycin과 streptomycin 저항성 유전자인 *aadA*를 갖고 있으며 plastid rRNA operon promoter와 plastid *psbA* 유전자의 3' region을 갖는 이끼 엽록체 형질전환용 벡터를 새로이 개발하여 이용하였다. 형질전환에는 bGH 유전자와 EPO 유전자를 벡터에 도입한 후에 이를 사용하였다.

4. 형질전환체 선발과 분석

배지 위에는 셀로판지가 깔려 있으므로, 형질전환된 조직을 따로 떼어낼 필요가 없이 셀로판지위의 조직을 셀로판지와 함께 적절한 항생물질이 함유되어 있는 배지에 옮겼다. 형질전환된 식물체는 48시간 배양 후 항생물질이 함유된 배지에 옮겨서 10일 배양 후 다시 배지를 바꾸어 줌으로써 저항성인 개체를 선발하였다. 저항성으로 판명된 개체들은 reporter gene의 발현을 분석하고, plasmid의 도입과 발현의 정도를 Southern blot 및 Northern blot, Western blot 분석으로 확인하였다.

5. 형질전환체 액체 대량배양

재조합 단백질 생산을 위한 이끼의 가장 중요한 장점은 액체현탁배양으로 아주 대량으로 생산이 가능하다는 점이다. 500 ml의 flask에 약 200 ml의 BCD 배지를 첨가하고 형질전환체 조직을 blender로 갈아서 넣어주고 125 rpm으로 계속적으로 배양하면 된다. 약 일주일마다 한번씩 이들 이끼들을 blender로 갈고 계속적으로 배양하였다. 배양의 조건은 고체배양과 동일한 조건이었다. 20L 액체배양은 경희대의 양덕춘 교수의 도움을 받아서 확립하였다.

6. 재조합 단백질의 순수 분리와 활성 측정

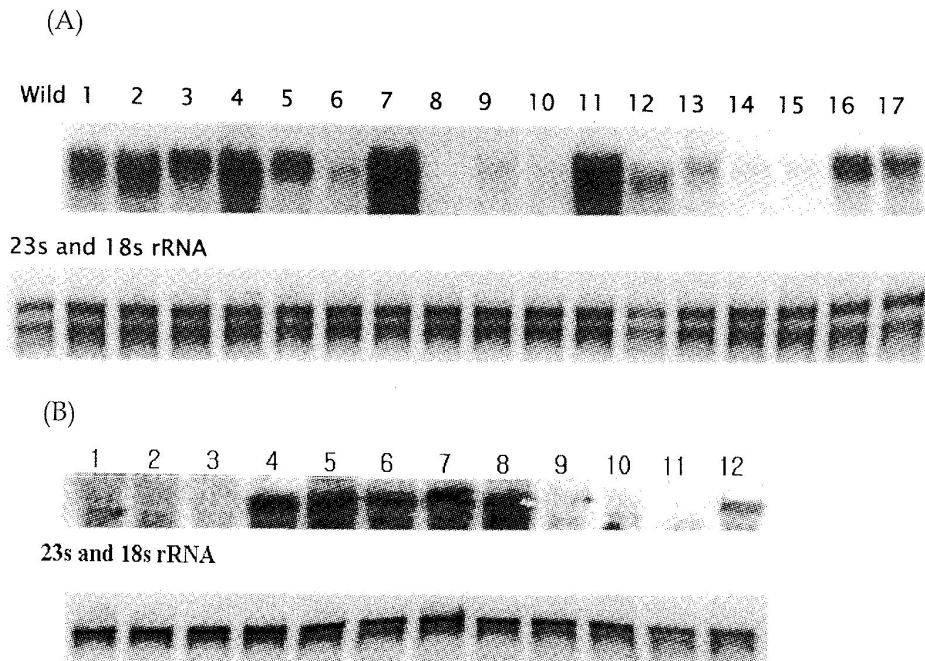
재조합 단백질은 0.1 M DTT를 함유하는 extraction buffer로 추출하고, ion exchange

chromatography로 분리였다. 각각의 재조합 단백질에 대한 분리 정제는 동물 및 미생물 실험에서 확립된 방법을 따랐다.

2 절. 연구내용 및 결과

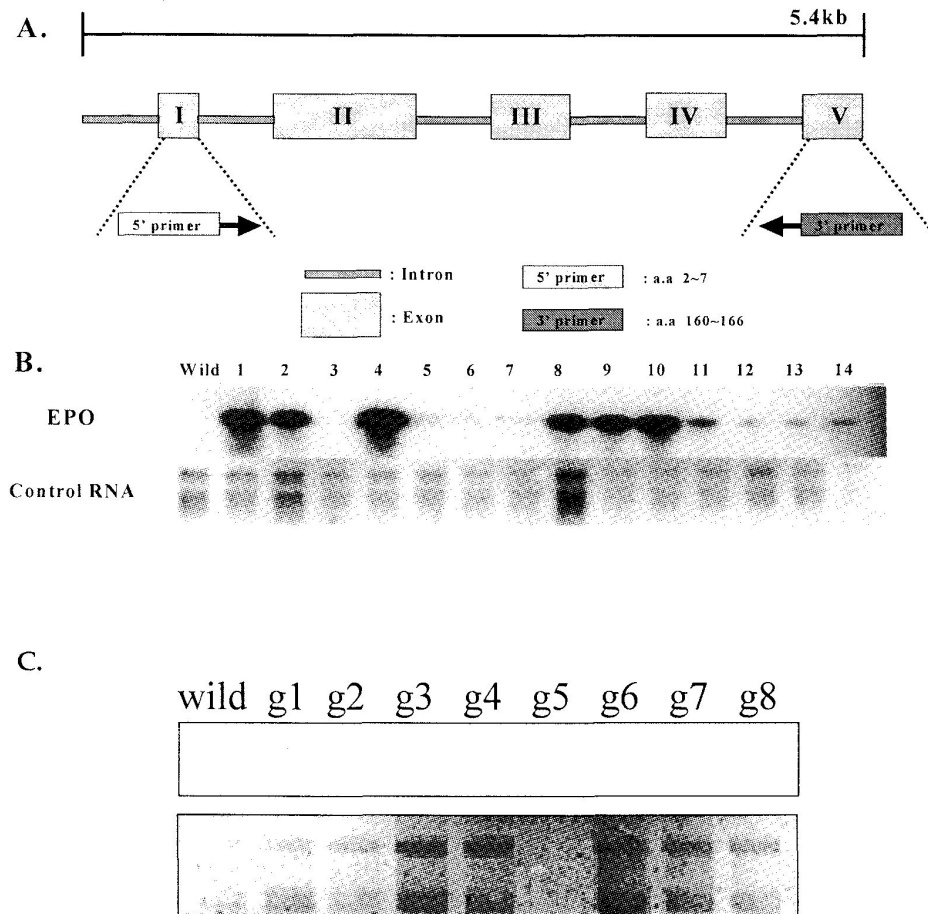
1. 이끼 형질전환체의 확보 및 재조합 유전자 발현 분석

이끼의 핵내 형질전환을 실시하였으며, 형질전환 이끼 내로 유전자가 도입이 되었다는 것을 PCR 및 Southern으로 확인한 후에 (그림은 생략), 재조합 유전자의 발현 정도를 확인하였다. 이는 많은 형질전환체를 유지하는 것보다 RNA 수준에서 미리 선발을 하기 위한 것이었다.



<그림 2> bGH 형질전환체의 northern blot 분석 결과. (A) pGAbGH1 형질전환체의 northern blot 분석결과. 발현효율이 높은 pGAbGH1-7과 pGAbGH1-11의 두 계통을 선발. wild: 형질전환되지 않은 이끼; Lane 1~17: bgh 유전자 형질전환 이끼; (B) signal peptide sequence를 갖는 pGAbGH15 형질전환체의 northern blot 분석 결과. 발현효율이 높은 pGAbGH15-4와 pGAbGH15-7의 두 계통을 선발. Lane 1~12: bgh 유전자 형질전환 이끼; 23S and 18S rRNA: 동일한 양의 RNA 전기영동을 확인.

PCR로 유전자 도입이 확인된 모든 형질전환 계통에서부터 Northern blot 분석을 실시하였다. Hybridization을 위해 사용된 probe는, bGH의 경우 540 bp의 dCTP-biotin으로 labeling시킨 probe를 사용하였고, EPO의 경우는 498 bp의 dCTP-biotin으로 labeling된 probe를 사용하였다.

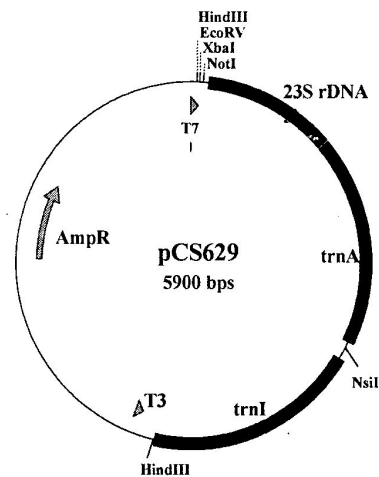


<그림 3> EPO 형질전환체의 northern blot 분석 결과. (A) Northern 분석용 probe 제작을 위해 사용된 primer. 5'-primer: 아미노산 2~7, 3'-primer: 아미노산 160~166에 해당되는 염기서열. (B) pEVcEP 벡터의 형질전환체에 대한 northern blot 분석. 위의 계통들 중에서 발현 효율이 높은 pEVcEP-12, pEVcEP-14 그리고 pEVcEP-16의 형질전환체들을 선발하여 다음 실험에 적용. wild: 형질전환되지 않은 이끼, Lane 1~14 : pEVcEP vector의 형질전환체 (C) pEVgEP 벡터의 형질전환체에 대한 northern blot분석. Lane g1~g8 : pEVgEP vector의 형질전환체. pEVgEP 형질전환체들은 RNA가 발현되지 않았음.

<그림 3>에서 보는 바와 같이 외래 EPO 유전자를 형질전환한 후에 실시한 Northern blot 분석에서는 bGH의 경우와는 조금 다른 결과를 볼 수 있었다. EPO cDNA를 갖는 pEVcEP 벡터의 형질전환체에 대하여 northern blot 분석을 실시한 결과, bGH에서의 경우와 마찬가지로 여러 계통들에서 높은 발현 효율을 확인 할 수 있었다 (그림 3-B). 그 중에서 발현 효율이 높은 pEVcEP-12 (lane 1), pEVcEP-14 (lane 2) 그리고 pEVcEP-16 (lane 4)의 형질전환체들을 선발하여 다음 실험에 적용하였다. 하지만 EPO genomic DNA clone으로 형질전환을 실시한 경우 아무런 발현결과를 관찰할 수 없었다 (그림 3-C). 이것은 아마도 식물과 동물 세포내의 어떠한 기작의 차이로 인하여 완전한 발현이 일어나지 않거나 splicing의 차이에서 기인된 것으로 여겨진다.

2. 이끼 엽록체 형질전환용 발현 벡터 제작 및 형질전환

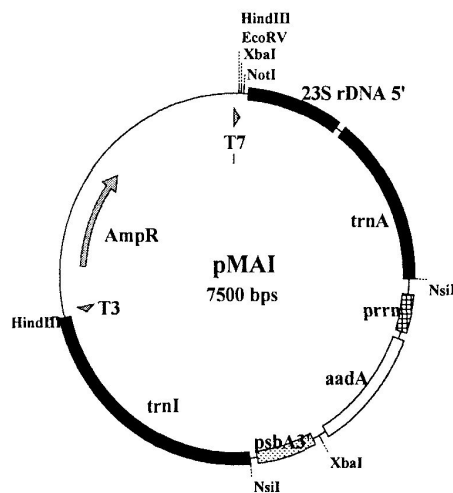
이끼 *P. patens*의 엽록체 형질전환용 벡터는 일본 나고야대학교의 Mamoru Sugita 교수와 공동 제작하여 국내 특허출원을 하였다 (대한민국 특허출원 10-2002-0019857; *Physcomitrella patens*의 엽록체 형질전환 벡터). 형질전환용 발현벡터는 기본적으로 pBluescript SK(+)를 골격으로 하였다. *P. patens*의 엽록체 게놈의 *trnI*와 *trnA* 유전자 부위를 포함시켜 증폭한 2767 bp의 염기서열을 *HindIII*로 절단하고 벡터의 *HindIII* 부위에 도입해서 pCS629를 제조하였다 (그림 4).



<그림 4> pCS 629 벡터의 개발. 벡터는 pBluescript SK(+)를 골격으로 하였으며, *P. patens*의 엽록체 게놈의 *trnI*와 *trnA* 유전자 부위를 포함시켜 증폭한 2767 bp의 염기서열을 *HindIII*로 절단하고 벡터의 *HindIII* 부위에 도입해서 pCS629를 제조.

<그림 4>를 구체적으로 기술한다면, *trnI*의 유전자 부위 전체 (859 bp)와 *trnA*의 유전자 부위 전체 (855 bp)를 증폭대상으로 사용하였고, 클로닝을 위한 제한효소의 인식부위를 첨가해 주기 위해 *trnI* 유전자가 시작되는 부위로부터 5'-flanking region 쪽으로 153 bp에 해당하는 부분을 더 첨가하였다. 또한 *trnI*와 *trnA* 유전자 사이의 36 bp도 첨가되었다. 이것은 *trnI*와 *trnA* 유전자를 클로닝할 때 한 번에 들어내었으므로 자동적으로 첨가되었기 때문이다. 또한 *trnA* 유전자의 3' 말단 마지막 부위에서부터 117 bp 부위를 더 첨가하였다. 추가로 cloning의 편의를 위하여 23S rDNA (23S ribosomal RNA 유전자)의 5' 부위 747 bp를 추가로 첨가하였다. 이 부위는 엽록체 게놈 상의 inverted repeat region으로서 한 엽록체 게놈 상에 두 개씩 존재한다. 그러므로 엽록체 형질전환이 성공했을 시에는 다른 부위로 삽입되는 것보다 2배의 높은 발현 효과를 기대할 수 있다.

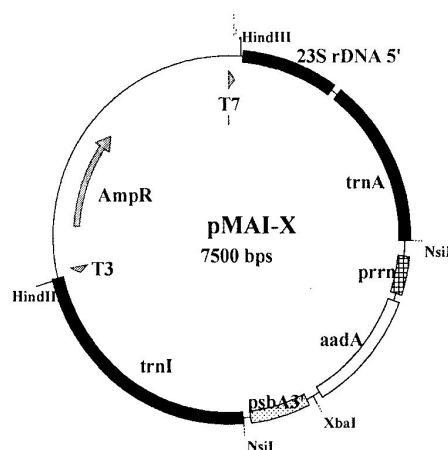
pCS629내에 외래 단백질의 발현을 위한 유전자를 삽입하기 위해, PCR을 사용하였다. 먼저, 담배 형질전환용 벡터인 pCT-V2 벡터 내의 유전자 발현 세트를 증폭시키고, 제한효소 인식부위를 첨가하기 위하여, 5'-TTGACGATGCATAGACATCCAACCCGTAATCGC-3'와 5'-ACATGTAT GCATCCCAATTGGTTGGACCGTAGG-3'의 primer를 이용하였다. pCS629와 PCR 산물을 각각 *NsiI*을 이용하여 절단을 실시하였으며, 이것을 ligation을 통하여서 벡터 내에 삽입해서 pMAI를 제조하였다 (그림 5).



<그림 5> pMAI 벡터의 개발. pCS629내에 외래 유전자를 삽입하기 위하여, 담배 엽록체 형질전환용 pCT-V2 벡터내의 유전자 발현 세트를 PCR로 증폭시키고, pCS629와 PCR 산물을 각각 *NsiI*을 이용하여 절단하여 벡터 내에 삽입해서 pMAI를 제조.

<그림 5>에서 유전자 발현 세트로는 *prrn*, *aadA*, *psbA3'*이 사용되었다. *prrn*은 엽록체 ribosomal RNA의 promoter로서, 엽록체에서 발현 효율이 가장 높은 promoter로 보고되어 있다. *aadA*는 박테리아의 aminoglycoside 3'-adenyltransferase 유전자이며 항생제인 spectinomycin과 streptomycin에 대한 저항성을 제공하는 유전자이다. *aadA* 단백질은 translational inhibitor이며 식물 세포에는 그다지 큰 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있다. *psbA3'* 부위는 photosystem II 32 kDa 단백질을 발현하는 유전자의 3' UTR (Untranslated region)로서, 식물 세포 내에서 전사되어지는 *aadA* mRNA의 안정성을 높여주는 역할을 한다. 이 유전자 발현세트는 담배에서 이미 보고된 발현 세트이다. 엽록체의 DNA, 특히 rRNA와 photosystem II에 관련된 유전자들은 종간에 상대적으로 보존성이 높으므로 이 세트를 이끼 벡터 제작에 이용할 수 있었다.

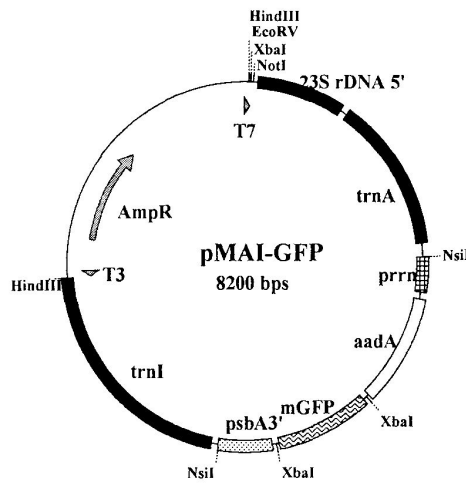
다른 유전자의 삽입을 용이하게 하기 위하여서 또다시 pMAI 벡터 내의 *XbaI* 인식 부위 하나를 제거하였다. *EcoRI*과 *NotI*으로 동시에 절단한 후에 Klenow fragment를 처리하여서 말단을 fill-in시키고, Self-ligation시켰으며, pMAI-X라고 명명하였다 (그림 6).



<그림 6> pMAI-X 벡터의 개발. 다른 유전자의 삽입을 용이하게 하기 위하여서 pMAI 벡터를, *EcoRI*과 *NotI*으로 동시에 절단한 후에 Klenow fragment를 처리하여서 말단을 fill-in시키고, Self-ligation시켰으며, pMAI-X를 제작.

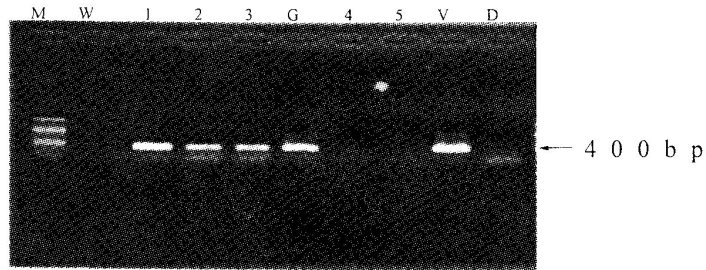
외래유전자의 발현여부를 확인하기 위해 동일한 primer세트를 사용하여 pCT-GFP 벡터의 유전자 발현 세트를 증폭시켰고, *NsiI*으로 절단하여 pCS629내에 삽입을 하였고, 이를 pMAI-GFP라고 명명하였다 (그림 7). GFP는 Green Fluorescent Protein의 약자이며, 해파리에서 분리된 유전자인 *gfp*의 최종산물인 단백질이다. 이 유전자는 기존에 사용되어 지던 reporter유전자들에 비해서 여러 가지 장점이 있다. 기존에 대표적으로 사용되고 있

는 reporter gene으로는 GUS나 luciferase가 있는데 이들의 발현을 관찰하기 위해서는 외부에서 기질을 첨가하여 반응을 시켜야만 하는 번거로움이 있고, 또한 표본 시료가 되는 세포가 더 이상 살지 못한다는 단점이 있다. 그러나, GFP는 외부에서 어떠한 기질을 첨가할 필요 없이 자외선 하에서, FITC 필터를 이용할 경우 쉽게 발현을 관찰할 수 있기 때문에, 표본을 살아있는 상태로 유지시킬 수 있다. 그래서 최근 몇 년 동안에 많은 연구자들이 GUS 및 luciferase와 마찬가지로 널리 사용하는 reporter 유전자이다. 최근에는 자연상태 그대로의 GFP를 사용하기보다는 사용하고자 하는 숙주의 codon usage와 유전적인 특성 등을 고려하여 약간 변형을 시킨 GFP들을 사용하고 있는데, pMAI-GFP는 그 중에서도 codon usage를 식물에 맞게 변형시킨 mGFP를 사용하여 제작하였다.

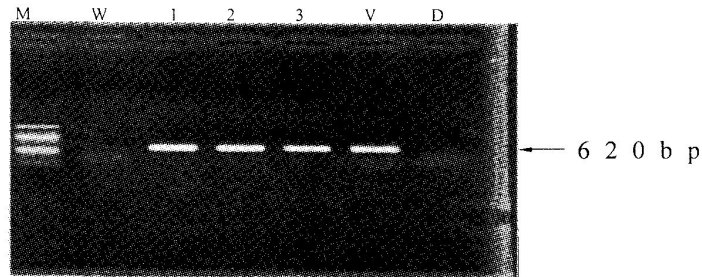


<그림 7> pMAI-GFP의 개발. 외래유전자의 발현여부를 확인하기 위해, 담배의 엽록체 형질전환용 벡터인 pCT-GFP 벡터의 mGFP 유전자 발현 세트를 증폭시키고 NsiI로 digestion하여 pCS629 내에 삽입하여 pMAI-GFP를 제작.

형질전환을 실시한 이끼는, 2~3 일 지난 후, 1200 rpm의 속도에서 5 초 정도 갈아준 후, 셀로판이 얹혀진 500 µg/ml의 spectinomycin (Sigma, USA)이 첨가된 BCD 선발배지에서 형질전환된 이끼만 선발하였다. 3 회 반복으로 실시된 선발 후에 pMAI-GFP에서는 3 개, pMAI에서는 2 개의 형질전환체를 얻을 수 있었다. 선발된 이끼 안으로 정확히 형질전환이 되었는지를 확인하기 위하여, PCR을 이용하여 확인하였다. PCR에 사용된 primer는 pMAI 벡터 내의 *aadA* primer (5'-CTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGC-3'/5'-GTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTC-3')와 pMAI-GFP의 *gfp* primer (5'-GGAGAGGTGAAGGTGATGCAA-3'/5'-CCATGCCATGTGTAATCCCAGC-3')이었다. 예상되는 크기는 *aadA*의 경우 400 bp, *gfp*의 경우 620 bp이었으며, 예상되었던 결과와 같이 이끼내에 외래유전자가 도입되었음을 확인하였다 (그림 8과 그림 9).

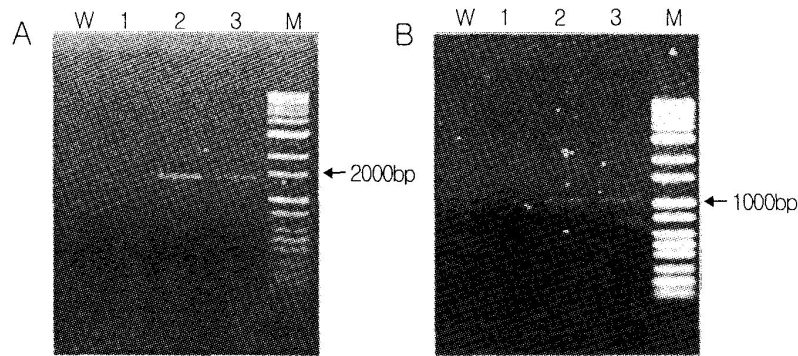


<그림 8> *aadA* 유전자의 primer를 이용한 엽록체 형질전환체의 PCR 확인. M: 100 bp ladder, W: wild type, Lane 1~3: pMAI-GFP transgenic, 4~5: pMAI transgenic, G: pMAI-GFP, V: pMAI, D: DW.



<그림 9> *gfp* 유전자의 primer를 이용한 엽록체 형질전환체의 PCR 확인. M: 100 bp ladder, W: wild type, Lane 1-3: pMAI-GFP transgenic, V: pMAI-GFP, D: DW.

엽록체 계놈상의 정확한 위치로 외래 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여, 목표가 되는 부위의 엽록체 상 염기서열을 이용하여 primer를 작성하였다. Primer의 염기서열은 *trnA* 유전자의 인접 부위의 5'-TACCGCTCTCGCAGCCCGCACCGAAA-3' (Flank *trnA* primer) 였고, *trnI* 유전자의 인접부위는 5'-ATATTTTTGTTTTAAGTAAACTAAAACTAGATTCC-3' (Flank *trnI* primer)이었다. 이들 primer들을 벡터내의 *gfp* 유전자의 primer들과 조합하여 PCR을 실시한 결과 다음과 같이 예상된 증폭밴드들을 관찰할 수 있었다. 따라서, 외래의 유전자들이 실제로 엽록체의 *trnA*와 *trnI* 사이로 재조합되어 삽입되어 들어가서 존재함을 확인하였다 (그림 10).



<그림 10> 외래 유전자의 염록체 게놈 내 존재 여부 확인. A: Flank trnA primer와 gfp antisense primer를 이용한 PCR, B: Flank trnI primer와 gfp sense primer를 이용한 PCR, W: wild type, Lane 1-3: pMAI-GFP transgenic, M: marker.

3. 이끼 대량 액체배양 시스템 확립

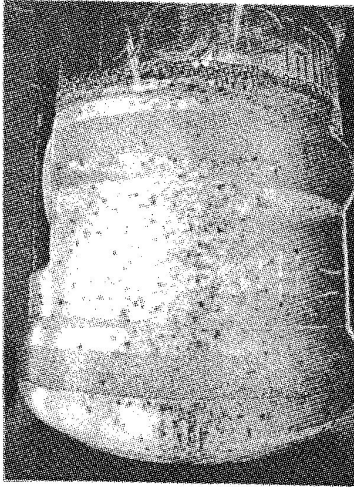
1차년도에는 500 ml 플라스크를 이용한 이끼 액체배양 방법을 확립하였으며, 3차년도 최종 목표 도달치인 20 L 용량의 용기에서 대량 배양할 수 있는 시스템도 확립하였다. 20 L 대량 액체배양 시스템은 경희대학교의 양덕춘 교수의 도움으로 성공할 수 있었으며, 국외의 다른 어떤 시스템보다도 월등한 방법이라고 평가된다. 사용된 배지의 조성은 다음 [표 1]과 같이 하여 고체배양에서의 기준 보다 더 저렴한 배지로 조정하여 사용하였다.

15 L 배지 제조시 Solution B, Solution C, Solution D, NH₄-Tartrate를 각각 150 ml을 첨가하고, TES, TPN은 각각 15 ml을 첨가하였고, 멸균이 끝난 이후에 CaCl₂ 용액을 30 ml을 첨가하였다. 15 L 배지가 준비된 후, 500 ml 삼각 플라스크 안에서 배양된 이끼의 protonema를 sieve를 통하여 수확하였다. 수확된 이끼를 1200 rpm으로 살짝 갈아준 후 15 L 배지에 첨가하였다. 뚜껑을 닫고 통에 연결된 호수의 끝에 지름 0.2 μm의 필터를 설치하였고, 필터의 반대쪽 끝은 산소발생 장치와 연결하였다. 통을 뒤집어 놓고, 산소 발생장치를 작동시키면, 산소에 의해서 배지가 순환하므로, 산소도 공급하고 shaking도 되는 이중의 효과를 갖는다. 배양실의 조건은 25℃를 유지하였으며, 16 시간 동안 빛을 공급하고, 8 시간 동안 암상태를 유지하는 일반적인 배양 환경을 따라 배양하였다. <그림 11>에서 보는 바와 같이, 배양 후 7주 정도가 지나면 배양탱크가 protonema로 포화상태가 되었다. 배양 초기의 무게는 약 10 g정도였고, 배양 7 주 후의 무게는 약 300 g 이상에 달하였다.

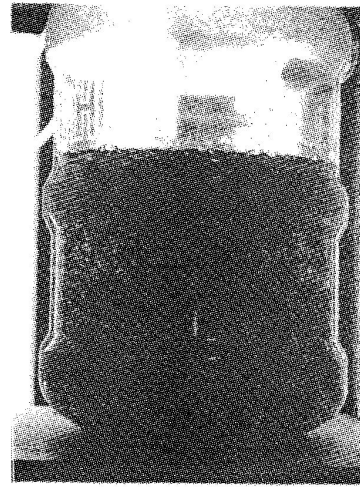
[표 1] 이끼 대량배양에 사용된 BCD 배지의 조성표

종 류	component	양\농도	비 고
Solution B	MgSO ₄ ·7H ₂ O ddH ₂ O	25 g to 1 L	표시된 양은 100×를 기준으로 하는 실제 사용 가능량임
Solution C	KH ₂ PO ₄ ddH ₂ O	25 g to 1 L	단, 500 ml H ₂ O 첨가 후 4M KOH로 pH 6.5적정 표시된 양은 100×를 기준으로 하는 실제 사용 가능량임
Solution D	KNO ₃ FeSO ₄ ·7H ₂ O ddH ₂ O	101 g 1.25 g to 1 L	표시된 양은 100×를 기준으로 하는 실제 사용 가능량임
TPN	Nicotinic acid p-aminobenzoic acid Thiamine-HCl dH ₂ O	1 g\8 μM 0.25 g\1.8 μM 0.5 g\1.5 μM to 1 L	표시된 양은 1000×를 기준으로 하는 실제 사용 가능량임
NH ₄ -Tartrate	NH ₄ -Tartrate dH ₂ O	92.05 g\5 mM to 1 L	표시된 양은 100×를 기준으로 하는 실제 사용 가능량임
TES	H ₃ BO ₃ Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ CuSO ₄ KBr LiCl MnCl ₂ ·4H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O KI SnCl ₂ ·2H ₂ O dH ₂ O	0.614 g 0.03 g 0.025 g 0.055 g 0.028 g 0.028 g 0.389 g 0.055 g 0.055 g 0.028 g 0.028 g to 1 L	표시된 양은 1000×를 기준으로 하는 실제 사용 가능량임
Calcium Chloride	CaCl ₂	73.51 g\500 mM	따로 autoclave 후 보관

(A)



(B)

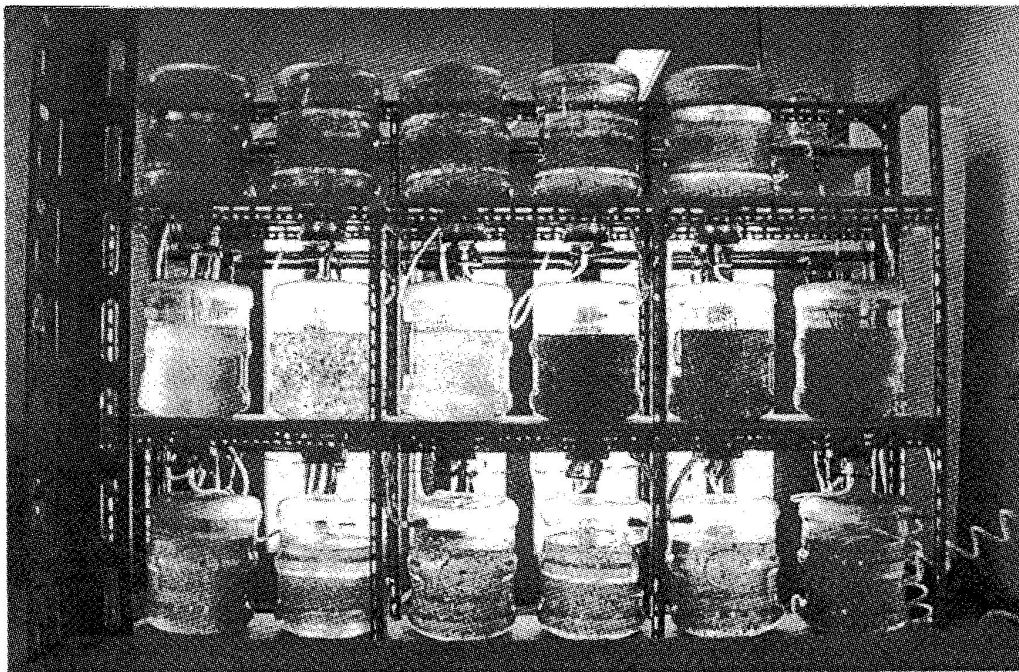


(A) 배양 1 일 후

(B) 배양 7 주 후

<그림 11> 이끼의 20 L 대량 배양

<그림 12>에서 보는 바와 같이 그 부피를 얼마든지 늘려갈 수 있게 되었으며, 본 시스템의 개발로 일단 형질전환에 성공하면 아주 극소량 발현이 가능한 외래 단백질이라 할지라도 이끼에서 대량생산이 가능한 시스템이 확립되었다.



<그림 12> 이끼의 대량 배양 시스템.

4. 단백질의 분리 및 활성연구

가. 형질전환 이끼에서 단백질의 추출

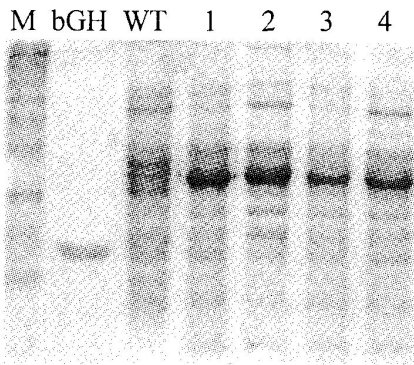
형질전환된 이끼의 조직에서부터 단백질을 추출하기 위해, 1 g 정도의 샘플을 채취하여서 액체질소를 첨가하고 막자사발을 이용하여 마쇄하였다. Powder들을 3 ml의 extraction buffer (PBS, pH 7.5, 1 mM PMSF)를 첨가하여 suspension하였다. 1시간 동안 4°C에서 incubation하고, 원심 분리를 한 후 녹지 않는 찌꺼기들을 제거하였다. 이렇게 얻은 상등액을 amicon-10 (Millipore, USA)을 이용하여 10 kDa이하의 protein들은 cut-off하여 농축하고, western blot 분석에 사용하였다. 단백질의 정량은 Bradford 방법을 사용하였고, 이미 알려져 있는 BSA의 양을 표준으로 사용하였다.

나. Immunoblot 분석

형질전환된 식물체 내에서 실제로 단백질이 생성되었는지를 확인하고자 immunoblot 분석 실험을 수행하였다. 표준이 되는 단백질 bGH는 미국의 NHPP (National Hormone & Peptide Program)에서부터 얻었고, EPO는 Roche Co. (Germany)로부터 구입하였다.

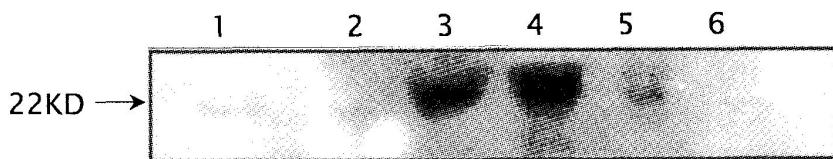
20 ng씩의 total protein과 10 ng의 표준 단백질을 12% SDS-PAGE gel 상에 전기영동하였다. 전기영동된 단백질은 electroblotting 방법 (Bio-Rad Co., USA)을 이용하여 PVDF membrane (Millipore, USA)상으로 전이시켰다. Membrane 상으로 전이된 단백질을 육안으로 확인하기 위하여, coomassie staining (0.1% coomassie brilliant blue, 50% methanol, 10% glacial acetic acid)을 5 분간 실시하였고, destaining solution (30% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 destaining하였다 (그림 13).

면역학적인 반응을 위하여, membrane을 blocking 용액 (5% skim milk, 100 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20) 속에 넣고, 실온에서 1시간 동안 저속으로 흔들어주었다. Blocking reagent인 skim milk를 제거하기 위하여, TTBS 용액 (100 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20)으로 씻어주었다. TTBS 용액 안에 1/500로 희석을 한 polyclonal rabbit anti-bGH 항체와 membrane을 섞고 1시간 동안 느리게 흔들어주었다. 남아 있는 항체를 제거하기 위하여, TTBS 용액으로 다시 씻어주었다. 2차 항체는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 conjugation 되어있는 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, inc., USA)를 TTBS에 1/3000로 희석하여서 사용하였고, 실온에서 1시간동안 느리게 흔들어주었다. 면역 반응이 끝난 immune complex의 발현을 관찰하기 위하여 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, USA)를 사용하였으며 X-ray film 상에서 최종적인 결과를 확인하였다.



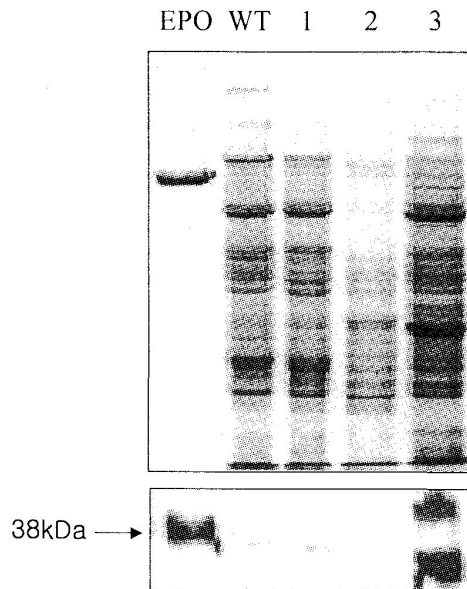
<그림 13> bGH 형질전환 식물체의 Immunoblot 분석을 위한 SDS-PAGE. 20 ng 씩의 total protein과 10 ng의 bGH 표준 단백질을 12% SDS-PAGE gel상에 전기영동. M: Molecular weight marker, bGH: bGH 표준 단백질, WT: 야생형, Lane 1: pGAbGH1-7 형질전환체, 2: pGAbGH1-11 형질전환체, 3: pGAbGH15-4 형질전환체, 4: pGAbGH15-7 형질전환체.

<그림 14>에서 보는 바와 같이 pGAbGH1 벡터로 형질전환된 식물은 정제된 22 kDa의 bGH 단백질과 동일한 발현양상을 보였다. 특별히 pGAbGH1-7이 더 높은 수준의 발현 효율을 보였다. 그러나, pGAbGH15 벡터로 형질전환을 시도한 경우는 어떠한 발현도 관찰되지 않았다. 이들 형질전환체들의 차이는 사용한 벡터에 있다. pGAbGH1 벡터의 경우는 자연 상태의 bGH cDNA 유전자와 모든 염기서열이 같지만, signal peptide를 coding 하는 염기서열이 없다. 반면에 pGAbGH15 벡터의 경우는 자연 상태의 bGH cDNA와 정확히 일치하는 것으로서 signal peptide를 coding하는 염기서열을 포함하고 있다. 아마도 pGAbGH15 벡터로 형질전환한 식물에서는 생성된 bGH 단백질이 분해되었거나, bGH transcript가 단백질로 전사되는 과정 중의 차이로 인하여 단백질이 제대로 만들어지지 않았던 것으로 여겨진다 (James *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 1995).



<그림 14> bGH 형질전환체의 Immunoblot 분석. Lane 1: 정제된 bGH 단백질, 2: 야생형, 3: pGAbGH1-7 형질전환체, 4: pGAbGH1-11 형질전환체, 5: pGAbGH15-4 형질전환체, 6: pGAbGH15-7 형질전환체.

EPO cDNA 유전자의 형질전환체에 대한 immunoblot 분석의 결과는 <그림 15>에서 보는 바와 같다. 예상하였던 바와 같이 야생형인 이끼에서는 단백질 발현이 되지 않았으며, 형질전환체 중에서 pEVcEP 3 계통에서 band를 확인할 수 있었다. pEVcEP-12와 pEVcEP-14 형질전환체는 극히 미미한 발현 정도가 관찰되었으나, pEVcEP-16의 경우에는 단백질 발현의 정도가 매우 높다고 판단되었다. 하지만 pEVcEP-16에서는 2 개의 band가 관찰되었고, 그 크기 또한 정확히 대조구의 표준 EPO 단백질의 크기와 일치하지 않아서, 이 band가 정확한지는 반복의 실험을 통하여 확인 중에 있다. 또한 야생형 이끼에서 극히 미미하게나마 발현되는 것으로 보아 Western 분석 시에 specificity가 높지 않았거나 구입한 항체에 문제점이 있을 것으로 추정되었고 따라서 다른 회사의 정제된 항체를 구입하여 계속 연구 중에 있다. 또한 이외의 다른 형질전환체들도 단백질 분석을 위한 재료를 확보하는대로 실험을 수행할 계획이다.

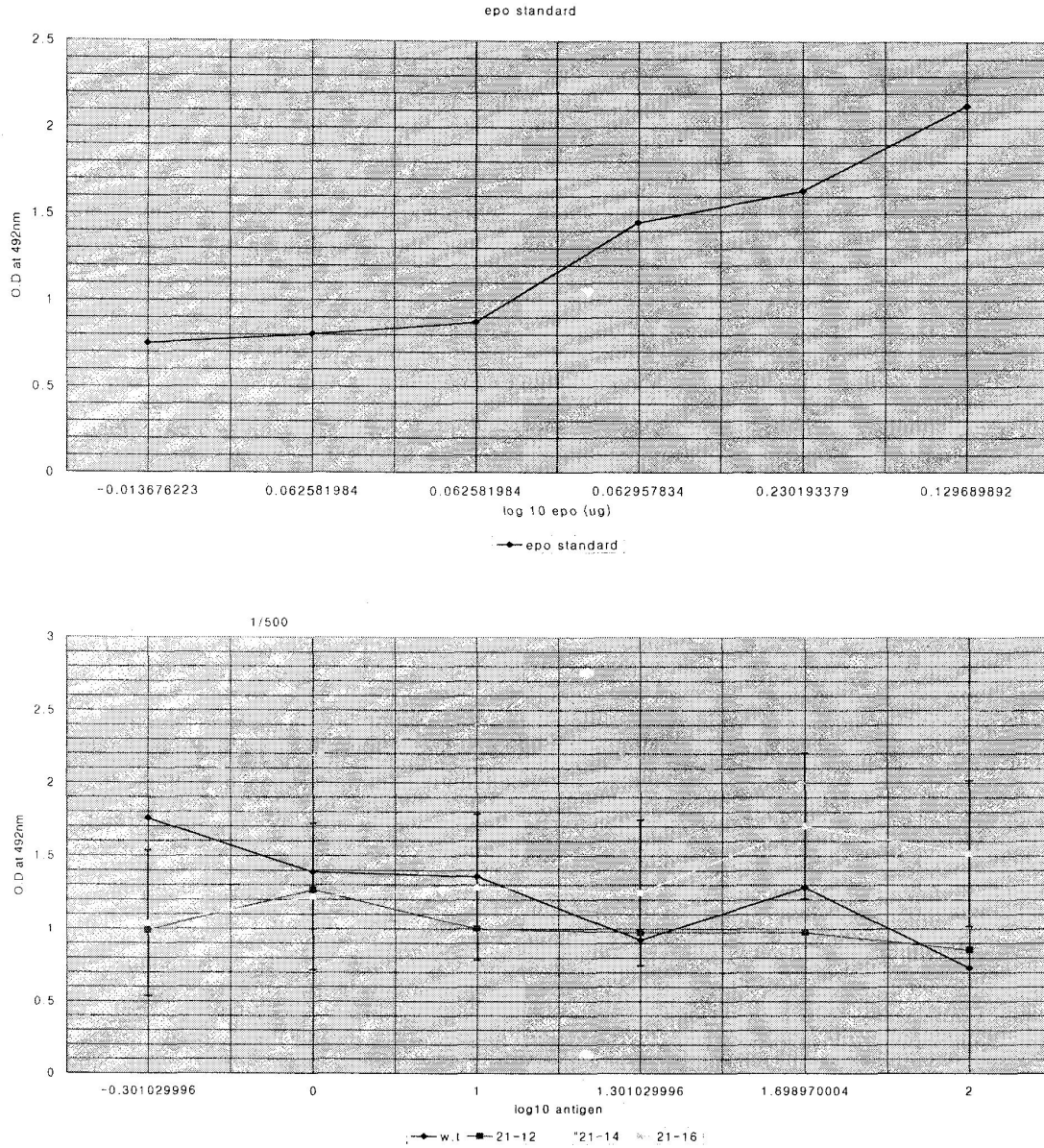


<그림 15> EPO 형질전환체의 Immunoblot 분석. (A) EPO 형질전환 식물체의 Immunoblot 분석을 위한 SDS-PAGE. (B) EPO 형질전환체의 Immunoblot 분석. EPO: 정제된 EPO 단백질, WT: 야생형, 1: pEVcEP-12 형질전환체, 2: pEVcEP-14 형질전환체, 3: pEVcEP-16 형질전환체

다. ELISA

형질전환 식물 내에 EPO 단백질이 존재하는지를 확인하고자 ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay)를 실시하였다. cDNA transformant 21 line의 4 가지 개체에서 단백질을 추출하여 시료 0.5, 1, 10, 20, 50, 100 µg protein을 100 µl의 PBS buffer와 섞어

서 96 well plate에 2회 반복으로 넣고 실온에서 16 시간 동안 유지하여 plate 벽면에 단백질들을 결합시켜서 실험에 이용하였다. 0.1% BSA와 0.05% Tween-20을 함유한 PBS buffer에 1/500로 희석한 polyclonal rabbit anti-EPO antibody를 1시간 37°C 처리하였다.



<그림 16> 형질전환 식물체로부터 추출한 단백질의 ELISA 분석. (A) 재조합 EPO 단백질의 ELISA 결과. (B) 형질전환 식물체로부터 추출한 단백질의 ELISA 결과. 그래프에서 가로축은 사용된 EPO 단백질의 양을 나타내며, 세로축은 spectrophotometer에서 얻은 O.D. 값.

Washing buffer로 씻어낸 후, primary antibody 처리 조건과 동일한 buffer 조건에서 1/1000로 희석한 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody를 넣고 1시간 37°C 처리하였다. washing 후, 각 well 안에 100 µl의 substrate solution (4% OPD, 30% H₂O₂, 1× substrate buffer)을 넣고 암 조건, 실온에서 20 분간 보관하였고, 여기에 8 N H₂SO₄를 15 µl 첨가하였다. 그 후, spectrophotometer에서 A₄₉₂의 파장으로 density를 측정하였다.

<그림 16>는 EPO 형질전환 식물체에서 추출한 total 단백질에 1/500의 비율로 항체를 사용하여서 얻은 ELISA 분석 결과이다. 형질전환되지 않은 야생형의 경우는 뚜렷이 감소하는 양상을 보였다. 그러나, 형질전환체들로부터 얻은 단백질은 감소하는 경향이 없이 소폭의 상향 curve를 나타내다가 고농도의 단백질을 사용함에 따라 감소되는 양상을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 본 실험의 결과만으로 단백질 생산의 확인이 불명확하였기 때문에 더 많은 형질전환체를 이용하고 새로운 항체를 이용하여 반복된 실험을 수행하고 있어 명확한 결과를 확보할 수 있을 것이다.

라. 단백질의 활성도 분석

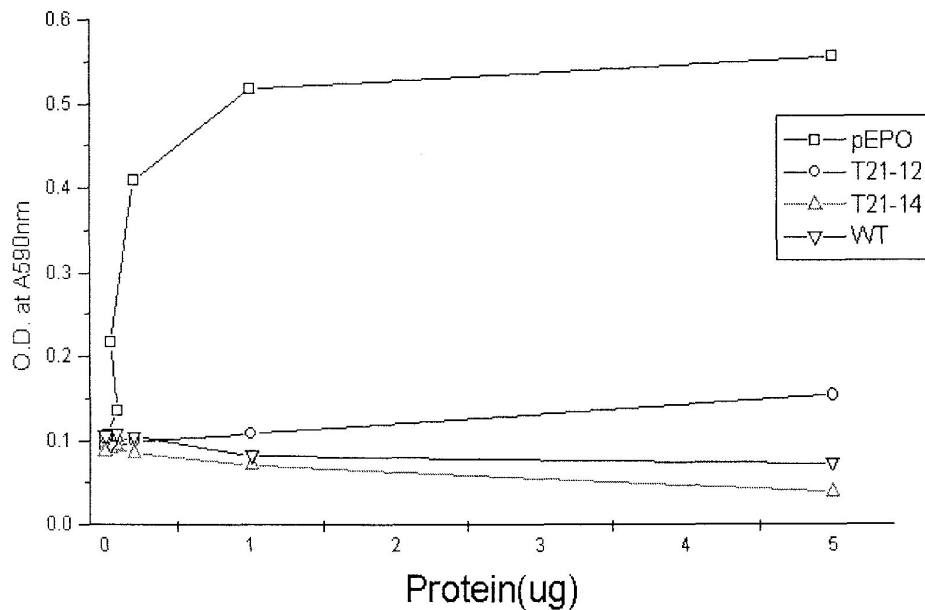
(1) MTT assay

형질전환 식물체 내에서 발현하는 EPO 단백질의 활성도를 조사하기 위하여 MTT assay 방법을 이용하였다. MTT assay는 동물세포를 이용하는 방법으로서 고려대학교 생명공학원의 김익환 교수의 도움으로 수행하였다. 이 방법은 발색반응을 이용하는 검정 방법으로써, 아주 민감하고 정량이 가능하면서도 매우 안정적인 검사방법이다. 살아있는 세포 내 mitochondria의 dehydrogenase가 노란 수용성의 MTT (Methylthiazoletetrazolium)를 균청색의 formazan으로 전환시키는 능력을 측정하는데 그 기초를 두고 있다.

MTT assay를 위하여, EPO-dependent cell line인 leukemia cell line F-36E을 5 U의 EPO를 함유한 RPMI 1640 배지에서 키웠다. 여기에서 자란 cell line을 10⁵ cell/ml의 농도로 1.5 ml tube에 분주하였다. 그리고 각각의 tube에 crude extract를 각각 dilution하여 첨가하였다. 각각의 tube에 먼저 키운 F-36E cell line을 100 µl씩 분주하였다. 3~4일간 배양을 한 후 세포의 viability를 측정하였다. 이를 위하여 각각의 tube에 50 µg의 MTT를 첨가한 후 배양기 (5% CO₂)에서 3시간을 더 배양하였다. 그런 다음 Isopropanol을 100 µl 첨가한 후 잘 섞어주었고, 파장 A₅₇₀과 A₆₃₀에서 OD를 측정하였다.

아래 <그림 17>에서 보는 바와 같이 정제된 EPO의 경우는 급격한 성장의 곡선을 그리며 cell line이 성장을 하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 야생형의 경우는 그 발현이 없기 때문에 세포가 사멸되어 가는 것이 확인되었다. T21-14의 경우 야생형에 비해

서 더 빠른 속도로 cell line이 죽어가는 반면에, T21-12는 어느 정도까지는 세포의 활력이 유지되고 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 예상만큼 급격한 성장을 보이지 않는 이유는 crude extract를 사용하였기 때문이라고 여겨진다. 식물 세포 내에 세포 성장에 관여하는 phenolic compound 등의 저해물질이 존재하거나, 아니면 EPO의 활성을 억제하는 어떠한 물질이 존재하기 때문일 것이라고 여겨진다. 즉, 외래 EPO의 생성으로 인하여 F36E cell line이 성장을 할 수는 있으나 식물 세포 내에 기존에 존재하는 phenolic compound 같은 다른 물질들이 F36E cell line의 성장 자체를 방해할 가능성이 있다. 또는, 식물 세포 내에 EPO와 결합하는 물질이 있어서 비록 EPO가 식물 내에 고도로 생성되었다고 할지라도 EPO와 결합하여서 EPO의 역할을 수행하는 것을 억제하거나 EPO를 분해 시켜 버릴 가능성이 있다. 현재는 Western 분석에서 고도의 발현율을 보였던, pEVcEP-16 계통 등을 이용하고 보다 정제된 식물추출물 및 단백질을 이용하여 실험을 진행하고 있는 중에 있다.



<그림 17> 형질전환 식물로부터 추출한 단백질의 MTT 분석. 가로축은 사용된 단백질의 양, 세로축은 A590에서 측정된 O.D. 값.

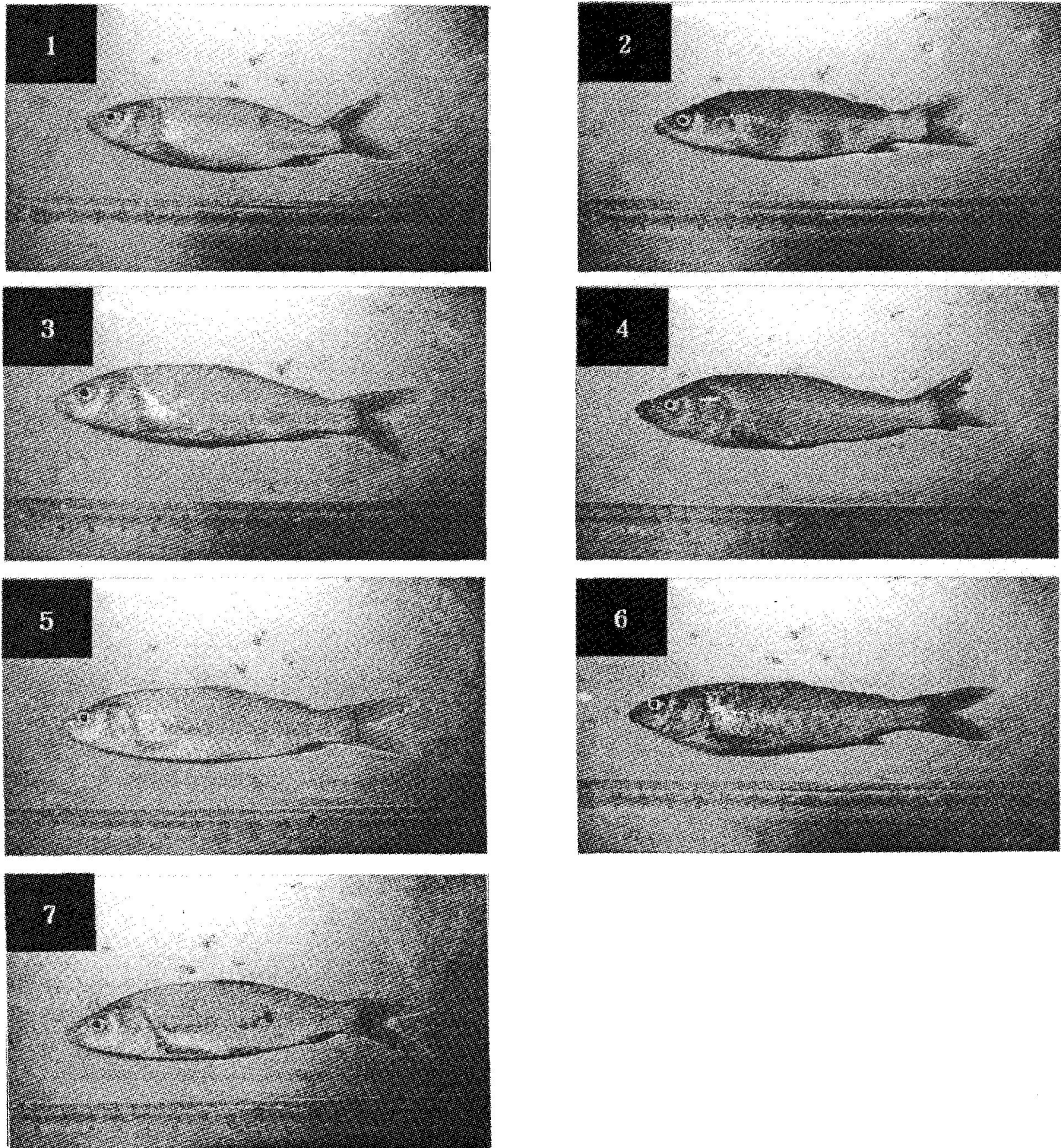
(2) 효모에서 발현된 bGH의 생물학적 활성도 검사

bGH를 분비하는 효모 powder를 일정비율로 사료에 첨가하여 투여한 결과 아래의 [표 2]와 <그림 18>에서처럼, bGH-15C의 경우가 71.94%의 성장을 보여서 가장 높게 나타났으며, 성장호르몬을 분비하지 않는 일반효모의 경우는 26.11%의 성장을 나타내었다. bGH-1 group과 bGH-15 group을 비교하여 큰 성장효과의 차이는 관찰되지 않았으나 비교적 bGH-15 group의 성장이 양호하였다. 첨가비율에 따른 성장효과는 1%첨가의 경우, bGH-1은 34.67%, bGH-15는 40.76%였고, 대조군과 같은 비율인 5%첨가의 경우, bGH-1은 50.80%, bGH-15는 52.75%를 기록하였다. 10%를 첨가한 실험군의 경우는 bGH-1은 63.71%인데 비해 bGH-15는 71.94%로 다소 높은 성장률을 나타내었다. 측정된 개체의 사진을 그림16 에 나타내었는데, 개체의 크기와 무게는 완전 상관관계에 있지 않으므로 무게측정치와는 다소간 다르게 보일 수 있음을 밝혀 둔다.

[표 2] 성장촉진사료의 첨가함량별 체중변화 - 효모

Group	측정치(g)와 성장률				치사수
	1차측정	2차측정	증가량	성장률(%)	
일반효모	4.10±0.08 ¹⁾	5.17±0.39	1.07	26.11	3
bGH-1A	4.13±0.27	5.56±0.24	1.43	34.67	4
bGH-1B	4.00±0.35	6.03±0.32	2.03	50.80	3
bGH-1C	4.21±0.33	6.89±0.39	2.68	63.71	2
bGH-15A	3.98±0.34	5.61±0.32	1.62	40.76	3
bGH-15B	4.20±0.19	6.41±0.33	2.21	52.57	3
bGH-15C	4.15±0.27	7.13±0.35	2.98	71.94	2

¹⁾평균±표준편차



<그림 16> 성장촉진사료첨가에 따른 어류의 성장. 1:일반효모, 2:bGH-1A, 3:bGH-1B, 4:bGH-1C, 5:bGH-15A, 6:bGH-15B, 7:bGH-15C

3 절. 대표적 성공사례

1. 이끼 엽록체 형질전환용 벡터 개발 (국내 특허 출원 1건)

담배와 감자 등 몇몇 식물 중에서는 엽록체 형질전환용 벡터가 이미 개발되었다. 하지만 이들 벡터를 이끼에 직접 활용할 수 없기 때문에, 이끼 엽록체 genome의 염기서열을 이용하여 적합한 벡터를 만들 필요성이 있었다. 일본 나고야대학의 수기타 마모루 교수와 공동으로 이를 개발하였고, 국내에서 특허출원한 상태에 있다. 이를 이용하여 앞으로 더 많은 유용한 유전자를 도입하여 단백질 발현에 관한 연구를 수행할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 이끼 대량 액체배양 성공

이끼 *P. patens*는 기초 및 응용연구에 적당한 모델 식물시스템으로 기대된다. 응용연구의 필수적인 것은 대량배양을 이용한 생산에 있다. 영국과 독일 등 국외에서는 10 L 대량배양을 실시하고 있으나 고가의 장비를 이용하고 실험이 매우 까다롭다는 단점이 있다. 이번에 개발된 기술은 이끼를 20 L 용량의 생수 통에 매우 간편하면서도 오염의 우려가 없도록 설계되어 있어 단백질 발현연구에 특별히 유용하게 사용될 수 있을 전망이다.

3. 유용 재조합 단백질 발현 이끼 형질전환체 개발

하등식물인 이끼 *P. patens*에 유용 유전자를 도입하는 형질전환 후, 대량 액체배양 시스템을 통해 의학적, 산업적으로 유용한 단백질들의 산업적 생산이 가능한지를 확인하였다. 이를 위하여 *bgh*와 *epo* 유전자를 도입하여 bGH와 EPO 단백질이 생산되는 이끼 형질전환체를 확보하였다. Northern과 Western 분석으로 단백질이 정상적으로 발현되는 것을 관찰하였다. 앞으로 더 효과적으로 발현되는 시스템으로 보완한다면 산업화가 가능할 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1 절. 연구개발목표의 달성도

1. 이끼 형질전환체의 확보 및 재조합 유전자 발현 분석

bgh와 epo 유전자를 도입한 형질전환체들을 Northern 분석하여 재조합 유전자들이 정상적으로 발현되고 있는 것을 확인하였다. 특별히 over-expression되는 형질전환체들을 따로 선발하여 단백질 연구를 실시하였다.

2. 이끼 엽록체 형질전환용 발현벡터 제작 및 형질전환

일본 나고야대학교의 Sugita 교수로부터 이끼 엽록체 DNA clone과 염기서열을 분양 받아서 이끼 엽록체 형질전환용 발현벡터를 공동 제작하여 국내 특허출원하였으며 본 연구에 활용하였다.

3. 이끼 대량 액체배양 시스템 확립 및 단백질 분리

이끼 500 ml 액체배양을 확립하였을 뿐만 아니라 20 L 배양기에서도 대량배양이 가능하도록 체계를 확립하였다. 이는 국외에서 사용되고 있는 고가장비를 이용한 10 L 액체배양 시스템에 비하여 월등하게 저렴한 시스템이다. 단백질 분리를 위하여 액체배양 시스템을 사용하였으며, 단백질 순수분리의 방법을 확립한 후 분자량에 따라서 분리하였다.

4. 단백질 특이성 및 활성연구

EPO 단백질의 활성도를 조사하기 위하여 MTT assay법을 이용하였다. 이는 배양 중인 동물세포 내 mitochondria의 dehydrogenase가 노란 수용성의 Methylthiazoletetrazolium (MTT)를 균청색의 formazan으로 전환시키는 능력을 측정하는 방법이다. EPO-dependent 인 leukemia cell line F-36E을 5 U의 EPO를 함유한 RPMI 1640 배지에서 키웠고 활성변화를 측정하여 약간의 활성을 관찰하였다. 배양 조건과 추출 조건을 변화시키면서 계속 수행 중에 있다.

5. Antibody 제작 및 생화학적 활성확인

bGH 항체는 자체 제작하였고, EPO 항체는 구입하여 확보하였다. bGH와 EPO에 대한 ELISA와 Western 분석을 실시하여 데이터를 제시하였다.

2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 기술적 효과

- 가. 형질전환식물을 이용하여 재조합 단백질을 생산할 경우에는 상대적으로 낮은 생산 가격, 대량생산의 용이함, 우수한 단백질 저장성뿐만 아니라 인체단백질의 경우에는 동물바이러스 등의 병원체 감염의 우려가 없다는 중요한 장점 등이 있으나 적절한 모델 생물체를 선택하지 못하여서 현재까지 연구가 더디어 왔다.
- 나. 최근의 국제적인 기술동향을 보면 가능하면 인체 단백질을 형질전환과 재분화가 용이한 식물체를 이용하고자 하는 추세이며, 국내에서도 몇몇 대학과 기관에서는 많은 시도가 되고 있다. 하지만 본 연구에서처럼, 핵 및 엽록체 형질전환이 매우 용이하게 수행되며 대단히 짧은 기간에 발현 결과를 얻을 수 있는 이끼를 이용한 경우는 없다.

2. 경제적 효과

- 가. 세계 생명공학산업은 1995~2005년 기간 중 22%에 달하는 고도성장이 예상되어 반도체 (9.4%), 메카트로닉스 (9.1%) 등 다른 첨단 산업분야의 성장률을 훨씬 상회할 것으로 전망하고 있고, 세계의 생물 시장은 1992년 100억 달러 이후 2000년 1,000억 달러가 예상되어 10배 이상 확대되고 있다. 그중 식물관련 생명공학산업은 약 30~40%에 달할 것으로 추정된다.
- 나. 국내 생명공학시장은 1995년 약 2,500억원에서 1998년 6,500억원으로 급속 성장하였으며, 2010년에는 약 9조원의 시장형성이 예상된다.
- 다. 현재 국내에서도 유망한 벤처회사가 출현하고 벤처산업이 국가적인 차원에서 육성됨에 따라 개인투자거나 기업투자자들에 의한 활발한 투자로 해당 연구가 가속화되

고 있다. 하지만 식물체에서 이러한 재조합 단백질을 생산하는 연구는 미진하며, 특히 형질전환과 조직배양이 어떤 식물보다도 월등한 이끼를 사용하여 대량생산하고자 하는 연구는 없었다. 따라서 본 연구결과는 산업화에 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1 절. 추가연구의 필요성

식물에서 생산된 단백질이 실제 임상에 사용되기 위해서는 단백질의 활성이나 구조적 차이, 그리고 발현 단백질의 순수분리 등 여러 가지 조절 인자등을 고려해야만 하며 실제 임상 실험을 거쳐야만 한다. 또한, 각각의 단백질에 대해서 독자적으로 수행되어야만 한다. 그러므로 이러한 연구는 2-3년 안에 이루어질 수 없고 계속된 투자와 연장된 연구기간을 필요로 하게 된다. 그러므로 추가적인 연구가 필요하다고 여겨진다.

2 절. 기업화 추진방안

1. 이끼는 액체배양이 용이하고 적절한 광과 온도가 주어지면 대량생물공정이 가능하기 때문에 신물질을 직접 생산할 수 있을 것이며, 이러한 하등식물의 기초실험을 고등식물에 응용할 수 있는 토대를 마련할 수 있을 것이다. 본 기술은 현재 *E. coli*와 yeast 등에서 생산되고 있는 의료용/축산용 단백질을 식물에서 발현시키는 산업에 접목될 수 있을 것이다.

2. 현재 국내에서는 선진국과 마찬가지로 유망한 벤처회사가 출현하고 벤처산업이 국가적인 차원에서 육성됨에 따라 개인투자거나 기업투자자들에 의한 활발한 투자로 해당 연구가 가속화되고 있다. 하지만 식물체에서 이러한 재조합 단백질을 생산하는 연구는 미진하며, 특히 형질전환과 조직배양이 어떤 식물보다도 월등한 이끼를 사용하여 대량생산하고자 하는 연구는 없었다. 따라서 본 연구결과는 산업화에 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1 절. 이끼 *Physcomitrella patens*에 관한 genomics 관련 연구의 증가.

2000-2003년 현재에 이르기까지, 영국 Leeds 대학, 일본의 NAIST, 독일의 Freiburg 대학, 미국의 St. Louis 대학 등에서 경쟁적으로 *Physcomitrella*의 유전자에 관한 연구를 수행하고 있다. 왜냐하면, *Physcomitrella*는 homologous recombination에 의한 유전자의 knock-out이 가능하고, Arabidopsis의 알려진 염기서열과 65% 이상의 유전자를 공유하고 있으며, 이들 유전자의 homologue를 발견한다면, yeast에서와 같은 유전자의 기능 연구가 가능하기 때문이다 (Nishiyama et al., 2003). 또한 기존의 고등식물에는 존재하지 않는 새로운 유전자원을 발굴하기 위해서이다. NCBI에 등재된 EST의 개수는 65,000여개 정도이지만 각 group이 비공개로 보유하고 있는 EST의 수를 합하면 177,000여개 이상 된다. 위에 열거한 group 중에서 가장 규모가 큰 곳은 독일 group인데, 이들은 찾아놓은 염기서열을 비공개로 유지하고 있으며 또한 본 과제에서와 유사한 방법으로 human의 단백질을 *Physcomitrella*에서 발현시키기 위하여 막대한 자본을 투자하고 있는 것으로 드러났다. 게다가 나아가서는 현재 회사를 설립하고 산업화를 위해 박차를 가하고 있음을 알 수 있게 되었다. 현재까지 이와 비슷한 방법으로 경쟁하고 있는 group은 세계적으로 우리나라의 본 실험실 뿐이며, 세계적인 추세에 비추어서 조금은 앞서나가고 있다고 사료된다.

제 7 장 참고문헌

- Ashton, W., Cove, D. (1977) The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue-resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 154 : 87-95
- Bateman, J., Purton, S. (2000) Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol. Gen. Genet.* 263: 404-410
- Cho, S., Chung, Y., Cho, S., Rim, Y., Shin, J. (1999) Particle bombardment mediated transformation and GFP expression in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Cells.* 9:14-19.
- Choi, J., Ra, K., Lee, Y. (1999) Enhancement bovine growth hormone gene expression by increasing the plasmid copy number. *Biotechnol. Let.* 21 : 1-5
- Cove, D., Knight, C., (1993) The moss *Physcomitrella pates*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *Plant Cell* 5 : 1483-1488
- Cove, D., Knight, C., Lamparter, T. (1997) Mosses as model systems. *Trends Plant Sci.* 2: 99-105
- Featherstone, D., Cove, D., Ashton, N. (1990) Genetic analysis by somatic hybridization of cytokinin overproducing developmental mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 222: 217-224
- Fischer, R., Emans, N. (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.* 9: 279-299
- Fried, W. (1995) Erythropoietin. *Ann. Rev. Nutrition* 15 : 353-377
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotech.* 18 : 1151-1155

- Girke, T., Schmidt, H., Zahringer, U., Reski, R., Heinz, E. (1998) Identification of a novel Δ 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 15: 39-48
- Girod, P., Fu, H., Zryd, J., Viersta, R. (1999) Multiubiquitin chain binding subunit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 11: 1457-1471
- Knight, C. (1994) Studying plant development in mosses: the transgenic route. *Plant Cell Environ.* 17: 669-674
- Koprivova, A., Meyer, A., Schween, G., Herschbach, C., Reski, R. (2002) Functional knockout of the adenosine 5'-phosphosulfate reductase gene in *Physcomitrella patens* revives an old route of sulfate assimilation. *Jr. Biol. Chem.* 277: 32195-32201
- Mason, H., Lam, D., Arntzen, C. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11745-11749
- McCormick, A., Kumagai, M., Hanley, K., Turpen, T. (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single chain Fv-epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 703-708
- Nishiyama T., Fujita, T., Shin-I, T., Seki, M. et al. (2003) Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 : 807-812
- Reski, R. (1998) *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends Plant Sci.* 3: 209-210
- Reski, R. (1999) Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta* 208 : 301-309
- Schaefer, D., Zryd, J. (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 11 : 1195-1206

Schaefer, D., Zryd, J. (2001) The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol.* 127 : 1430-1438

Schaefer, D. (2001) Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr. Opinion Plant Biol.* 4: 143-150

Schumaker, K., Dietrich, M. (1998) Hormone induced signaling during moss development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 501-523

Sidorov, V., Kasten, D., Pang, S., Hajdukiewicz, P., Staub, J., Nehra, N. (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* 19: 209-216

Staub, J., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, T. et al. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotech.* 18 : 333-338

Svab, Z., Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 913-917

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	중점국가연구개발사업		
	세부사업명	생명공학실용화사업		
과제명	형질전환 이끼를 이용한 의약·축산용 기능성 단백질 생산			
연구기관	고려대학교	연구책임자	신정섭	
총연구기간	2000년 8월 10일 ~ 2003년 5월 31일 (33 개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	174,000	15,000	189,000	
기술분야	생명과학			
참여기업				
공동연구기관	대 구 대 학 교			
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진 (√)	4. 타사업에 활용(√)
	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육,연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2003 년 7 월 25 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 신 정 섭 (인) 연구기관장 : 고 려 대 학 교 총장 (직인)</p> <p>과학기술부장관 귀하</p>				

연구결과와 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

식물 내에서의 의약품 단백질 생산을 위해, 소의 성장호르몬인 bovine growth hormone (bGH)과 빈혈치료제인 erythropoietin (EPO) 유전자를 이끼에 도입하여 그 유전자발현 양상과 활성도에 관하여 연구하였다. EPO와 bGH 유전자를 이끼 내로 형질전환 하였고, 그 중에서 대량 발현되는 형질전환체만을 선발하였다. 자체 개발한 20L 액체배양 기술로 대용량으로 증식시킬 수 있었다. 형질전환 이끼로부터 저순도로 분리 정제된 EPO는 약간의 활성도가 있는 것으로 확인되었고, bGH 형질전환 식물은 활성도를 검증하지 못했지만, 형질전환된 효모에서 추출한 bGH를 사료에 첨가하여 잉어류인 치어에서 시험한 결과 활성도가 높은 것으로 판명되었다.

2. 연구수행결과 현황

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
퍼옥시나이트라이드에 대한 세포보호 활성을 갖는 이끼 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 퍼옥시나이트라이트 생성 억제·소거용 조성물	10-2001-0027405		고려대	대한민국	
수퍼옥사이드 음이온 라디칼에 대한 생성억제 활성을 갖는 이끼 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 수퍼옥사이드 음이온 라디칼 생성억제용 조성물	10-2001-0027406		고려대	대한민국	
이끼의 조직배양을 이용한 문자 및 그림 캐릭터 생산방법	10-2001-0042271		고려대	대한민국	
피스코미트렐라 파텐스의 엽록체 형질전환 벡터	10-2002-0019857		진앤셀	대한민국	벤처설립

나. 프로그램 등록목록

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
Transgenic Research	Expression of the bovine growth hormone alters the root morphology in transgenic tobacco plants.	2003년 6월 1일	12	Kluwer Academic publisher	UK	SCI
계: 1 건						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
한국분자생물학회 추계학술대회	Stable plastid transformation of the moss <i>Physcomitrella patens</i>	00. 10. 13.			대한민국
Moss2001 - An International Meeting on Moss Biology	Construction of a gametophore-selective subtraction library in <i>Physcomitrella patens</i>	01. 5. 27.			일본
한국분자·세포생물학회 추계학술대회	Expression of human erythropoietin in transgenic plants	01. 10. 12.			대한민국
	Production of bovine growth hormone in transgenic plants	01. 10. 12.			대한민국
한국생화학분자생물학회	The expression of erythropoietin in the moss <i>Physcomitrella patens</i>	03. 5. 14.			대한민국
계: 5 건					

3. 연구성과

벤처 창업 : 2001년 9월 벤처회사인 (주)진앤셀 설립

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원을 받아 식물 형질전환체에서 의료용 재조합 단백질 생산의 제목으로 계속적으로 연구를 수행하고 있음.

나. 활용방법

다양한 유전자를 도입하여 발현을 검정하고 기능분석을 지속적으로 수행할 예정이다. cytokine 종류 외에도 항체생산을 위한 연구도 병행하고 있음.

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

2-3년의 후속 연구를 진행한 후에 정제된 재조합단백질을 생산할 계획을 갖고 있음.

5. 기대효과

미국 생명공학 산업협회 (Biotechnology Industry Organization)의 보고를 보면, 지난 10년간 생명공학산업에 종사하는 종사자의 수가 2배로 증가하였고, 2002년에는 20만명 이상이 생명공학 산업에 종사하고 있으며, 향후 지속적으로 증가할 것으로 보여진다. 또한, 미국 생명공학회사 1세대라고 부를 수 있는 Genetech, Amgen, Biogen, Chiron, Genzyme 등의 회사는 최근 5년마다 총 매출액이 2배씩 성장하는 고도의 성장률을 보이고 있다. 이에 따라 국내에서도 비슷한 추세와 고용창출효과를 가져오게 될 것으로 보인다. 본 과제에서 연구되어진 EPO와 growth hormone은 이미 넓은 시장이 형성되어 있다. 또한 특허 만료가 가까워옴에 따라 저가의 대량생산이 가능한 체계가 구축된다면, 열려질 생명공학 시장의 한 부분을 선점할 수 있는 효과를 얻게 될 것이다.

6. 문제점 및 건의사항

해당없음.

기술 요약서

■ 기술의 명칭

형질전환 이끼를 이용한 의약·축산용 기능성 단백질 생산기술

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	00-J-BP-01-B-68			
과제명	형질전환 이끼를 이용한 의약·축산용 기능성 단백질 생산			
사업명	중점국가연구개발사업			
세부사업명	생명공학실용화사업			
연구기관	고려대학교	기관유형	대학교	
참여기관(기업)				
총연구기간	2000 . 8 . 10 - 2003 . 5 . 31			
총연구비	정부(174,000)천원 민간(15,000)천원 합계(189,000)천원			
연구책임자 1	성명	신정섭	주민번호	
	근무기관 부서	고려대학교 생명과학대학	E-mail	jsshin@korea.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	02-3290-3430
연구책임자 2	성명	최장원	주민번호	
	근무기관 부서	대구대학교 자연자원대	E-mail	
	직위/직급	교수	전화번호	
실무연락책임자	성명	조성현	소속/부서	고려대학교 생명과학대학
	직위/직급	박사과정	E-mail	joseph@korea.ac.kr
	전화번호	02-3290-3958	FAX	02-3290-3430
	주소	(136 - 701) 서울시 성북구 안암동 5가 1번지 고려대학교 생명과학대학		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

형질전환이 쉽고 용이하며 대량생산이 가능한 식물인 이끼 (*Physcomitrella patens*)를 이용하여, 의약품 축산용 단백질을 식물에서 생산할 수 있는 기술을 확립하였다. 모든 실험은 실험실 내에서 수행할 수 있고 배양 환경조건을 쉽게 조절할 수 있다. 생산량을 늘리기 위해, 액체배양을 수행할 수 있다. 그러므로, 원하는 단백질의 유전자를 벡터에 삽입한 후, particle bombardment를 이용하여 형질전환을 실시하면 3주 정도면 원하는 형질전환체의 출현을 관찰할 수 있고, 2-3개월이면 형질전환체를 확보할 수 있게 된다.

<기술적 특징>

- (1) 이끼의 기내배양이 매우 쉽고 간단하다.
- (2) 형질전환이 잘 되고 생활사가 짧다.
- (3) 분석이 용이하고 대량생산을 위한 액체배양이 가능하다.

[용도 · 이용분야]

- (1) 식물의 형질전환
- (2) 각종 단백질의 생산을 위한 bioreactor
- (3) 각종 유전자의 기능 연구

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			