식물생명공학회지 제30권 제1호
Korean J. Plant Biotechnology
Vol. 30, No. 1, 97~102 (2003)

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 상추의 세포 현탁배양으로부터 hGM-CSF의 생산

김영숙, 김미영, 권태호[2], 양문식[1*]
전북대학교 유전공학연구소, [1]생물과학부, [2]기초과학연구소

Production of hGM-CSF from Cell Suspension Culture of Transformed Lettuce Using *Agrobacterium*-mediated Transformation System

Young-Sook Kim, Mi-Young Kim, Tae-Ho Kwon[2], Moon-Sik Yang[1*]
Institute for Molecular Biology and Genetics
[1]Division of Biological Sceince
[2]Basic Science Research Institute, Chonbuk National University, Chonbuk 561-756, Korea

ABSTRACT Lettuce (*Lactuca sativa*) was transformed with *Agrobacterium tumefacience* LBA4404 containing human granulocyte macrophage colony stimulating factor (*hGM-CSF*) gene to produce in cell suspension cultures. Cell suspension culture was established using callus from transgenic lettuce plant. Integration of *hGM-CSF* gene into plant chromosome was confirmed through genomic PCR and Southern blot analysis. In addition, Northern blot analysis indicated the expression of the introduced *hGM-CSF* gene in transformed lettuce. The recombinant hGM-CSF was expressed in transgenic cell cultures derived from transgenic plants as a yield of about 149.0 μg/L in culture filtrate, which was determined by ELISA. These results demonstrated that transformed lettuce cell suspension cultures could be used as a production system of therapeutic proteins such as hGM-CSF.

Key words: Cell suspension culture, ELISA, hGM-CSF, transformation

서 론

의료용 재조합 단백질을 생산하기 위한 방법으로 미생물, 동물, 식물세포를 이용하는 방법이 보고된 이후, 과거 20여 년 동안에는 주로 미생물과 동물세포배양방법에 집중적으로 연구가 되었다. 최근에는 식물을 이용한 배양시스템이나 재조합 단백질을 이용한 대량생산 가능성에 대한 연구가 수행되고 있다 (Miele 1977; Doran 2000). 식물을 이용한 유용한 외래 단백질의 생산은 β-glucuronidase (GUS) (Kurata et al. 1988), interleukin (Magnuson et al. 1988), murine granulocyte macrophage colony stimulating factor (mGM-CSF) (Lee et al. 1997), human granulocyte macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) (James et al. 2000) 등이 담배를 이용하여 생산되었음이 보고되었으나 인간이 먹을 수 있는 상추 식물을 이용한 외래단백질의 생산에 관한 연구는 아직 보고되지 않았다.

담배 이외의 다른 식물체를 이용하여 외래 단백질을 생산하려고 할 때 가장 먼저 선결되어야 할 점은 대상식물에 대한 형질전환체계가 확립되어야 한다는 것이다. 상추의 경우 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 대한 연구가 진행되어 *GUS* 유전자 (Chung et al. 1998a), 오존내성유전자인 *glutathione reductase* (*GR*) (Chung et al. 1998b), 저온관련유전자인 *BN115* (Jeong et al. 2000) 등의 형질전환과 *Amaranthus* 저장단백질인 *AmA1* 유전자를 상추에 도입시켜 *AmA1* 유전자의 발현 (Kim and Kim 2000)이 보고된 바가 있다.

*Corresponding author Tel 063-270-3569 Fax 063-270-3345
E-mail mskyang@moak.chonbuk.ac.kr

GM-CSF는 조혈모세포에 작용하여 백혈구의 생산을 촉진하는 당 단백질로서 (John and Gough 1994) 사람, 쥐, 원숭이, 소 등 몇 종의 포유동물에서 단백질의 아미노산 서열이 밝혀져 있으며, 사람의 경우 25개의 leader peptide를 포함하여 127개의 아미노산으로 구성되어 있다 (Gough et al. 1984). GM-CSF는 항암화학요법에 따른 호중구 (neutrophil) 감소증, 재생불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 자가골수 이식, 후천성면역결핍증에 대한 임상보고가 있으며 특히 호중구 감소증과 골수이식의 환자에 명확한 효과가 있음이 보고되었다 (Antman et al. 1988; Champlin et al. 1989).

본 연구에서는 식물 세포배양을 통하여 사람의 GM-CSF를 생산하고자 *hGM-CSF* 유전자를 형질전환체계가 확립된 상추에 도입하여 GM-CSF의 생산 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

상추 (*Lactuca sativa* cv. Chongchima)의 종자를 Kim과 Kwon (1999)의 방법에 따라 무균 발아시킨 유묘의 자엽 조직을 재료로 사용하였다.

유전자 재조합 및 배양

hGM-CSF를 식물에서 발현시키기 위해 먼저, PCR 산물인 471 bp의 *hGM-CSF*를 포함하고 있는 pQE vector로부터 hGM-CSF를 *Bam*HI과 *Sma*I으로 절단하여 얻은 후 *Bam*HI과 *Sma*I으로 절단한 pMY16에 재조합하였다. 이를 pMYO62라 명명하였으며, pMYO62의 *hGM-CSF*를 *Bam*HI과 *Kpn*I으로 절단하여 BamHI과 KpnI으로 절단한 binary vector인 pMY27에 재조합하여 pMYO64로 명명하였다 (Figure 1). 이 발현 vector를 tri-parental mating (Ditta et al. 1980) 방법을 이용하여 *A. tumefacience* LBA4404에 형질전환시켰다.

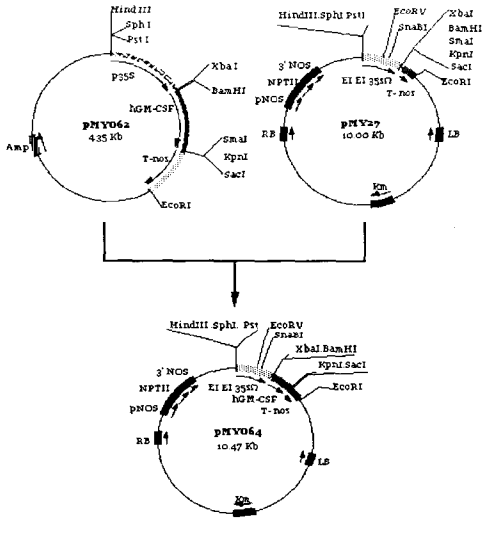

Figure 1. A schematic diagram of the expression vector containing *hGM-CSF* gene.

식물체에 형질전환시키기 위한 공시 균주의 배양은 50 mg/L의 kanamycin이 첨가된 LB액체배지에 접종한 후 28℃에서 2일 동안 배양하였다.

식물의 형질전환

상추의 형질전환은 종자를 기내 발아시킨 후 전개된 자엽 조직을 사용하여 0.5×0.5 cm 크기로 자른 뒤 Kim과 Kwon (1999)이 상추의 재분화에 가장 효과적이라고 보고한 0.5 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA를 첨가한 MS (Murashige and Skoog 1962)배지 (재분화 배지)에 2일간 전 배양하였다. 전배양 후 치상체를 *Agrobacterium*용액에 15분간 접종시켰으며 치상체 표면의 *Agrobacterium*은 멸균된 filter paper로 완전히 닦은 후 배지에 치상하여 25℃ 암소에서 2일간 공동배양 하였다. 공동배양 후 재분화 배지에 50 mg/L kanamycin과 300 mg/L cefotaxime을 첨가한 배지 (선발배지)에 치상하여 kanamycin에 내성이 있는 신초를 유도하였다. 선발배지에서 잎 절편으로부터 분화된 신초는 MS배지에 식물 생장조절제를 첨가하지 않고 50 mg/L kanamycin과 250 mg/L cefotaxime을 첨가한 발근배지에서 뿌리를 유도하여 형질전환체를 선발하였다. 뿌리가 형성된 형질전환 상추는 화분에 옮겨 순화시킨 다음 유전자 분석에 사용하였다.

PCR 및 Southern 분석

MS selection 배지에서 선발된 형질전환 식물체에 *hGM-CSF* 유전자가 안정적으로 도입되었는지 확인하기 위해 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 분리하고, *hGM-CSF* 유전자의 특이적 primer를 사용하여 PCR 분석을 수행하였다. 형질전환된 상추의 잎을 액체질소를 첨가하면서 마쇄한 다음 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고 200 ng의 DNA를 사용하여 PCR을 수행했다. PCR은 foward primer (5′-GCG GAT CCG TTC TCT GGA GGA TGT-3′)와 reverse primer (5′-TTG GTA CCA TCT GGC CGG TCT CA-3′)을 이용하여 94℃에서 3분간 pre-denaturation하고, 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 primer annealing, 72℃에서 30초간 primer extension하는 과정을 30번 반복하고 마지막으로 72℃에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1.0% agarose gel로 전기영동하였으며 EtBr로 염색하여 UV lamp하에서 밴드를 확인하였다. PCR방법에 의해 증폭된 밴드가 *hGM-CSF* 유전자인지를 확인하기 위하여 이 젤의 DNA 밴드를 nitrocellulose filer로 옮긴 후 *hGM-CSF* DNA를 probe로 하여 Church buffer를 이용한 방법

(Church and Gibert 1984)으로 Southern blot analysis를 시행하였다.

RNA 추출 및 Northern 분석

Genomic PCR 분석을 통해 *hGM-CSF* 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 정상적으로 *hGM-CSF* 유전자의 발현이 일어남을 확인하기 위하여 Northern blot analysis를 시행하였다. 형질전환 식물체의 전체 RNA 분리는 RNA Zol을 이용하였으며 RNA를 30 μg으로 정량하여 formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 뒤 capillary transfer 방법에 의해 Hybond N^+-membrane으로 transfer한 후 α^{32}P-dCTP로 표지한 *hGM-CSF* DNA를 probe로 하여 hybridization 하였다.

hGM-CSF 생산을 위한 현탁배양세포의 유도 및 배양

Northern blot analysis를 통해 *hGM-CSF* 유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체를 이용하여 현탁배양 세포를 유도하였다. 먼저 형질전환 식물체의 잎을 적당한 크기로 잘라 50 mg/L kanamycin이 포함된 재분화배지 (MS selection 배지)에 치상하여 캘러스를 유도한 후, 선발된 캘러스를 한천을 첨가하지 않은 MS selection배지에 옮겨 10일 간격으로 계대 배양하였다.

현탁배양 세포로부터 분비된 hGM-CSF의 정량

상추의 현탁세포배양을 통하여 분비된 hGM-CSF의 양을 측정하고자 계대배양 3, 6, 9, 12일째의 현탁 배양세포를 사용하였다. 정량은 ELISA (Human ELISA GM-CSF kit. Endogene Co.)를 이용하여 측정하였으며, *E. coli*에서 발현된 recombinant human GM-CSF (Endogene Co.)을 standard로 사용하였다.

결 과

식물의 형질전환

상추에 *hGM-CSF* 유전자를 도입시키기 위하여 제조된 recombinant vector를 포함하고 있는 *A. tumefacience* LBA4404를 기내 발아한 상추의 자엽 절편에 15분간 접종한 후에 2일간 공동배양하였다. 공동배양 후 잎 절편을 kanamycin을 첨가한 선발배지에 계대 배양한 결과, 배양 10일경부터 치상체의 절단면에 캘러스가 형성되기 시작하였으며 배양 3주 후부터 캘러스의 표면이나 치상체의 절단면에서 신초가 분화되기 시작하여 정상적으로 발달되었다 (Figure 2). 정상적으로 발달된 신초는 kanamycin을 첨가한 발근배지에 옮긴 후 2주 경부터 뿌리가 분화되어 kanamycin배지 상에서 선발된 형질전환체를 획득할 수 있었으며 이 개체들을 화분에 이식하여 정상적인 식물체로 순화시켰다. 반면 형질전환이 되지 않은 식물체는 발근배지에서 뿌리가 전혀 형성되지 않았으며 배양일이 경과함에 따라 kanamycin 배지 상에서 하얗게 변화되었다 (data 미제시). 따라서 kanamycin이 포함된 MS selection배지 상에서 1차로 형질전환체의 식별이 가능함을 알 수 있었다.

Genomic DNA 추출 및 PCR 분석

1차로 kanamycin이 첨가된 배지에서 선별된 상추식물체에 *hGM-CSF* 유전자가 상추식물체의 핵 안에 들어갔는지 확인하기 위해 형질 전환된 상추 중 5개체를 골라 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. *hGM-CSF* 유전자에 specific한 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 형질 전환된 상추 5개체 모두에서 0.47 kb 단편을 확인하였으나 대조구인 형질전환을 시키지 않은 상추에서는 같은 크기의 DNA단편을 확인할 수 없었다 (Figure 3). PCR분석 결과로 나온 DNA 단편이 *hGM-CSF* 유전자가 확실한지 확인하기 위하여 *hGM-CSF* 유전자를 probe로 사용하여 Southern blot analysis를 하였다 (Figure 4). Southern blot analysis 결과도 PCR 결과와 일치하였는데 이것으로 보아 상추에 *hGM-CSF* 유전자가 성공적으

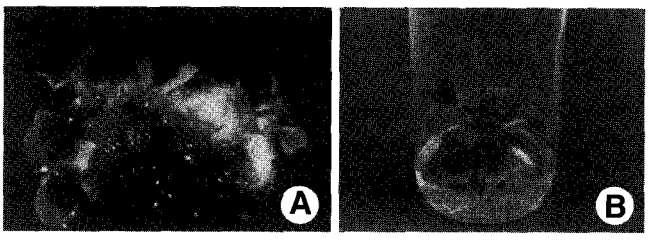

Figure 2. Regeneration of lettuce (*Lactuca sativa*) transformed with *hGM-CSF* gene. A, Putative transgenic shoots formation on MS medium with 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA, 50 mg/L kanamycin and 300mg/L cefotaxime; B, Normal plantlet transformed with *hGM-CSF* gene on MS medium containing 50 mg/L kanamycin.

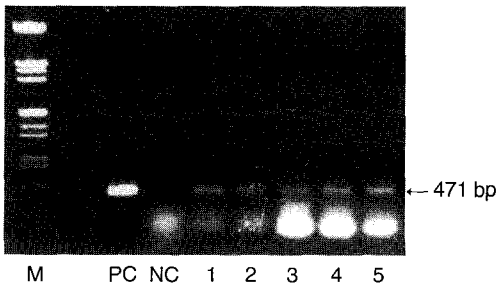

Figure 3. Genomic DNA PCR analysis of transgenic lettuce plants. M, size marker; PC, positive control (plasmid); NC, negative control (non-transgenic lettuce); lane 1-5, transgenic plants.

로 도입되었음을 확인하였다.

Northern blot analysis를 통한 형질전환체의 *hGM-CSF* 유전자 발현

Genomic PCR과 Southern blot analysis 결과 *hGM-CSF* 유전자의 도입이 확인된 상추로부터 *hGM-CSF* 유전자가 정상적으로 발현되는지를 확인하기 위하여 Northern blot analysis를 시행하였다. Northern blot analysis 결과 형질전환 되지 않은 대조구에서는 유전자의 발현이 확인되지 않은 반면 형질전환된 4개체 모두에서는 *hGM-CSF* 유전자가 정상적으로 발현됨을 확인하였다 (Figure 5).

상추 현탁 배양 세포로부터 생산된 hGM-CSF의 정량

Northern blot analysis 결과 RNA발현이 확인된 4개 line의 형질전환 식물체로부터 만들어진 캘러스를 현탁 배양을 하여 배양세포로부터 배지 내로 분비된 hGM-CSF 단백질의 양을 측정하기 위해 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)를 시행하였다. Standard로서 *E. coli*로부터 생산된 재조합 human GM-CSF를 사용하였으며, ELISA 결과 세포배양 12일 후에 배지 내로 분비된 hGM-CSF 단백질의 양은 4 번 line에서 149.0 μg/L로 가장 높았다. 반면, 1, 2, 3번 line에서는 75.2, 32.6, 68.9 μg/L로 비교적 4번 line보다 배지 내로 분비되어진 양이 적음을 보여서 개체간 분비량의 차이가 있음을 나타냈다 (Figure 6). 따라서 상추의 현탁 배양 세포를 이용하여 유용한 단백질의 생산이 가능함을 확인하였다. James 등 (2000)도 murine의 GM-CSF를 식물세포 현탁 배양을 이용하여 생리활성을 갖는 형태로 생산이 가능함을 보고한 바 있다.

고 찰

GM-CSF는 조혈모세포에 작용하여 백혈구 생성을 촉진하는 유용한 당 단백질로서 식물 세포배양을 이용하여 대량 생산하고자 하는 연구가 이루어지고 있으며, 담배의 현탁 배양 세포로부터 GM-CSF의 생산이 보고된 바 있다 (Lee et al. 1997).

본 실험에서는 상추의 세포배양을 통하여 의료용 유용단백질의 생산 가능성과 그의 생산체계확립 및 대량 생산을 위한 기초자료를 얻기 위하여, 항체 분자에 비하여 구조가 간단하고 분자량이 작아 유전자의 조작과 단백질 생산이 상대적으로 용이할 것이라고 예상되는 고가의 cytokine으로 알려진 human GM-CSF를 전세계적으로 유용한 원예작물인 상추에 형질전환시켜 형질전환상추의 세포배양을 통하여 생산하고자 시도하였다.

먼저, *hGM-CSF* 유전자를 식물에 도입시키기 위하여 유전자를 식물 발현벡터에 재조합하여 상추에 도입하였으며, PCR, Southern 및 Northern blot analysis를 통해 *hGM-CSF* 유전자가 형질 전환된 상추에서 정상적으로 발현됨을 확인하였다. *hGM-CSF* 유전자가 발현된 상추를 이용하여 현탁배양을 실시하고 현탁 배양 세포로부터 배지 내로 분비된 hGM-CSF를 ELISA 방법에 의해 측정한 결과 배양 12일 후에 최고 149.0 μg/L 수준의 생산량을 보였다. 이것은 hGM-CSF 단백질이 정상적으로 만들어져 식물 세포벽을 통과하여 세포 밖으로 분비됨을 의미하는 것으로 이것은 면역학적으로 중요한 단백질들이 식물세포 현탁 배양을 통하여 생산될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 한편, 상추 형질전환세포의 현탁 배양 시 유전자 발현에 있어, 배양 9일째까지 4 line 모두 *hGM-CSF* 유전자의 단백질 발현수준은 꾸준히 증가하였으며 배양

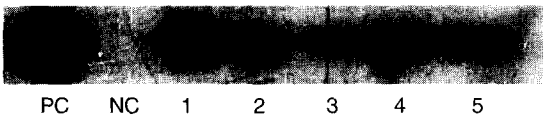

Figure 4. Southern blot analysis of *hGM-CSF* gene amplified by genomic DNA PCR of transgenic lettuce plant (Figure 3). PC, positive control; NC, negative control (non-transgenic lettuce); lane 1-5, transgenic lettuce.

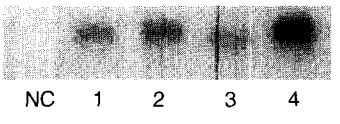

Figure 5. Northern blot analysis from transgenic lettuce indicating the expression of *hGM-CSF* gene. NC, negative control (non-transgenic lettuce); lane 1-4, transgenic lettuce.

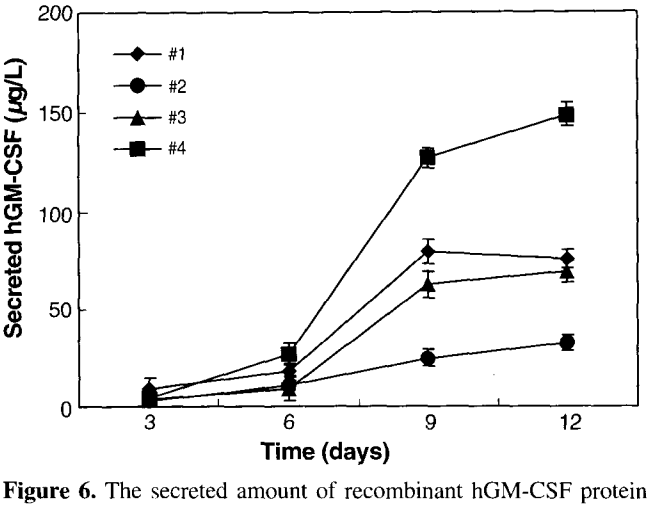

Figure 6. The secreted amount of recombinant hGM-CSF protein during batch culture. The each value was average concentrations of hGM-CSF measured by ELISA method.

9일이 경과한 후에 1번 line에서만 분비되는 양이 감소되는 경향이 나타났다 (Figure 6). 담배 세포배양의 경우 배양 6일 이후의 단백질의 양과 활성은 급격히 감소하는 것이 관찰되었으며 이는 배양 6일 이후에 세포 밖으로 분비되어 진 단백질이 배양 용기 내의 세포 수의 포화, 배지의 pH 변화 등으로 인한 환경적인 요소와, 세포 자체의 노화로 인한 단백질 분비 능력의 상실, 또는 식물 세포로부터 만들어진 protease 등의 영향에 의한 것으로 생각된다고 하였다 (Lee 등, 2001). 상추의 경우 비록 3개 line의 결과이기는 하나 배양 12일까지 분비되는 단백질의 양이 증가하였지만 배양 기일을 더 연장하였을 경우는 세포로부터 만들어지는 protease의 영향은 어떠한지도 검토해야 할 것으로 생각되었다. 또한 상추 세포배양의 경우 분비되는 단백질의 양이 담배에 비하여 적었으나 이러한 문제는 배지의 영양 조건이나 배양 환경을 달리 하여 단백질 생산을 위한 최적조건을 규명하는 연구가 이루어지면 해결될 것으로 생각된다. 또한 합성된 단백질의 분해 등에 대한 안정성을 개선하기 위해서는 stabilizer의 첨가나 protein inhibitor 등을 배지에 첨가하는 등의 연구가 이루어져야 할 것이다. 이외에 숙주세포로서 생육이 빠른 다른 상추의 품종의 선발과, 생장이 빠른 변이세포의 선발 등을 고려한다면 상추의 세포 배양을 통한 유용한 단백질 생산의 수율은 더욱 개선될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

hGM-CSF가 식물세포 현탁 배양을 통하여 생산이 가능한지를 조사하기 위하여 *hGM-CSF*를 포함하고 있는 *A. tumerfaciens* LBA4404를 가지고 상추에 형질전환시켰다. 형질전환된 상추로부터 캘러스를 유도하여 캘러스를 이용한 세포배양체계를 확립하였다. PCR과 Southern blot analysis 결과 상추에 *hGM-CSF* 유전자가 도입된 것을 확인하였으며, Northern blot analysis 결과 상추식물체에 *hGM-CSF* 유전자가 발현됨을 확인하였다. 현탁 배양 세포로부터 분비된 hGM-CSF를 ELISA를 이용하여 측정한 결과 149.0 μg/L가 생산됨을 확인하였다. 이러한 결과는 상추의 현탁 배양 세포가 hGM-CSF와 같은 치료용 단백질의 생산 숙주로 이용될 수 있음을 보여주었다.

사사 - 본 연구결과는 2001년도 산업자원부 (차세대 기술개발사업)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

Antman K, Griffin JD, Elias A, Socinski MA, Ryan N, Cannistra SA, Oette D, Whitley Mfrei E, Schnipoer LE (1988) Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. N Engl J Med 319: 593-598

Champlin RE, Nimer SD, Ireland P, Oette DH, Goled DW (1989) Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 73: 694-699

Chung JD, Kim CK, kim KM (1998a) Expression of glucuronidase (*GUS*) gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) and it's progeny analysis. Kor J Plant Tiss Cult 25: 225-229

Chung JD, Kim CK, Jo JK (1998b) Expression of Chinese cabbage glutathione reductase gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Kor J Plant Tiss Cult 25: 267-271

Church GM, Gibert W (1984) Genomic sequenceing. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1991-1995

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range cloning system for gram negative bacteria construction of a gene bank of *Rhizobium melliloti*. Proc Natl Acad Sci USA 77: 7347-7351

Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. Curr Opin Biotech 11: 199-204

Gough NM, Gough J, Metcalf D, Dunn AR (1984) Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Nature 309: 763-767

James EA, Wang C, Wang Z, Reeves R, Shin JH, Magnuson NS, Lee JM (2000) Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. Protein Expr Purif 19: 131-138

Jeong JH, Yang DC, Jang JG, Pack KY (2000) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (BN 115). Kor J Plant Tiss Cult 27: 7-12

Johe EJR, Gough NM (1994) The cytokine hand book. Academic Press pp 343-369

Kim YS, Kim TG (2000) Heterologous expression of *AmA1* gene encoding storage protein of Amaranthus in transgenic Lettuce (*Lactuca sativa*). J Kor Soc hort Sci 41: 495-498

Kim YS, Kwon TH (1999) Establishment of efficient regeneration system through *in vitro* culture of Lettuce (*Lactuca sativa*). Plant Res 2: 16-21

Kurata H, Takemura T, Furusaki S, Kado CI (1998) Light-controlled expression of a foreign gene using the chalcone synthase promoter in tobacco BY-2 cell. J Ferment Bioeng 86: 317-323

Lee JS, Choi SJ, Kang HS, Oh WG, Choi KH, Kwon TH, Kim DH, Yang MS (1997) Establishment of transgenic tobacco cell suspension culture system for producing murine granulocyte-macrophage colony stimulation factor. Mol Cell 7: 783-787

Lee JH, Kim NS, Kim YS, Hong SY, Shin YJ, Seo JE, Kwon TH, Yang MS (2001) The effects of light on the production of hGM-

CSF in transgenic plant cell culture. Kor J Biotechnol Bioeng 16: 568-572

Magnuson N, Linzmaier SPM, Reeves R, An G (1998) Secretion of biologically active human interlerkin-2 and interlerkin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. Biogechnol Lett 19: 93-96

Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceutiacals: regulatory considerations. Trends Biotechnol 15: 45-50

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497

(접수일자 2003년 1월 17일, 수리일자 2003년 2월 24일)