

인체 락토페린 생산 형질전환 가시오갈피 배양세포

조승현^{1,4}, 권석윤², 김재훈³, 이기택⁴, 곽상수², 이행순^{1*}

¹한국생명공학연구원 식물세포공학연구실, ²환경생명공학연구실, ³(주)마이크로프랜즈, ⁴충남대학교 식품공학과

Transgenic Siberian Ginseng Cultured Cells That Produce High Levels of Human Lactoferrin

Seung-Hyun Jo^{1,4}, Suk-Yoon Kwon², Jae-Whune Kim³, Ki-Teak Lee⁴, Sang-Soo Kwak², Haeng-Soon Lee^{1*}

¹Laboratory of Plant Cell Biotechnology

²Laboratory of Environmental Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

³Microplants Co., LTD, Jeonju 561-203, Korea

⁴Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 361-763, Korea

ABSTRACT Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein with many biological roles, including the protection against microbial and virus infection, stimulation of the immune system. We developed the transgenic Siberian ginseng (*Acanthopanax senticosus*) cell cultures producing the human lactoferrin (hLf) protein following *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. A construct containing a targeting signal peptide from tobacco endoplasmic reticulum fused to hLf cDNA under the control of an oxidative stress-inducible *SWPA2* promoter was engineered. Transgenic Siberian ginseng cultured cells to produce a recombinant hLf protein were successfully generated and confirmed by PCR and Southern blot analysis. ELISA and western blot analysis showed that full length-hLf protein was synthesized in the transgenic cells. The production of hLf increased proportionally to cell growth and reached a maximal (up to 3% of total soluble proteins) at the stationary phase. These results suggest that the transgenic Siberian ginseng cultured cells in this study will be biotechnologically useful for the commercial production of medicinal plant cell cultures to produce hLf protein.

Key words: *Acanthopanax senticosus*, high expression promoter, human lactoferrin, recombinant protein, transgenic cell cultures

서 론

락토페린 (lactoferrin)은 포유동물 젖에 고농도로 존재하며 철이 결합된 당단백질로서 분자량은 80 kDa로 2개의 로브로 구성되어 있고 각 로브안에 각각 한 개의 철 결합 부위가 존재하고 있다 (Metz-Boutigue et al. 1984). 락토페린은 살균 및 정균작용, 세포증식 조절작용, 과산화질 생성억제작용, 면역계 조절작용, 철 흡수 조절작용, 감

염부위 염증발생 제어작용, 항바이러스 작용, 대장균의 장 세포 부착방지, 비피더스균 증식작용 등의 다양한 생체방어 작용에 관여하고, 유익한 생리활성을 갖고 있다 (Yu 1997). 락토페린을 함유한 주요 제품은 유아용 조제분유를 비롯하여 화장품, 식품첨가물, 향설사약, 복막 투석용제, 임상영양제, 여성위생용품, 안약제품, 껌 등이 있다 (Nam et al. 1996).

현재까지 재조합 인체락토페린 (hLf)은 곰팡이 (Ward et al. 1992), 효모 (Liang and Richardson 1993), baculovirus system (Salmon et al. 1997), 소 (van Berkel et al. 2002)

*Corresponding author Tel 042-860-4439, Fax 042-860-4608

E-mail: hslee@kribb.re.kr

를 비롯한 포유동물 (Legrand et al. 1995) 등에서 생산되었으나 고가의 정제비용, 동물 매개의 virus, 미생물, prion 등의 감염 문제로 인해 상업화되지 못하였다 (Arakawa et al. 1999). 반면에 식물체 및 식물배양세포는 동물유래 병원성 감염문제가 배제되고 적정화된 조건에서 저가의 비용으로 대량생산이 가능하다는 장점이 있다. 그러나 식물체 또는 식물배양세포에서 hLf와 같은 유용단백질을 효율적으로 발현시키기 위해서 고발현 프로모터 이용이 중요하게 고려되어야 한다. CaMV 35S 프로모터를 이용한 담배의 경우 0.3%에서 1.8%의 hLf이 생산되었으며 (Mitra and Zhang 1994; Salmon et al. 1998), 고구마 배양세포에서는 0.1% 미만의 hLf이 생산 (Min et al. 2005), mas P2 프로모터를 이용한 감자 괴경에서 0.1% 생산 (Chong et al. 2000), 베타 글루틴인 프로모터를 이용하여 0.5%-4.3%의 hLf를 생산하는 형질전환 벼가 개발되었다 (Anzai et al. 2000; Nandi et al. 2002; Suzuki et al. 2003). 그러나 식물배양세포에서 고발현 프로모터를 이용하여 특정 배양시기에 인체락토페린을 고생산하는 식물 배양세포주 개발에 관한 보고는 아직까지 없다.

연구팀은 고구마 배양세포로부터 세포배양 후기에서 강하게 발현할 뿐만 아니라 산화스트레스에 의해 발현이 강하게 유도되는 *SWPA2* promoter를 분리하였다 (Kim et al. 2003). 따라서 이 *SWPA2* promoter가 약리활성 단백질을 포함한 유용물질을 생산하는 산업용 식물세포주의 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대되었으며 실제로 형질전환 담배 배양세포와 인삼 캘러스에 hLf를 발현시켰다. 그 결과 3%에서 4%의 hLf 단백질이 생산됨을 확인하였다 (Choi et al. 2003; Kwon et al. 2003).

가시오갈피 (Siberian ginseng, *Acanthopanax senticosus* 또는 *Eleutherococcus senticosus*)는 두릅나무과에 속하는 다년생 관목으로 한반도와 시베리아, 중국 등의 북반구 지역에만 분포하는 약용식물이다 (Lee 1979). 가시오갈피는 외인성 비특이적인 해로운 자극에 대한 저항력 증진효과가 있어 인삼과 함께 중요한 약용식물로 각광받고 있다. 최근 오갈피의 약효가 널리 알려지면서 우리나라에 자생되고 있는 수종의 오갈피가 거의 멸종위기에 처해 있는 실정이다. 가시오갈피의 약용성분은 뿌리에 있으며 (Han et al. 2003a) 또한 배양세포에서도 식물체와 동일한 면역증진 효과가 있음이 보고되었다 (Han et al. 2003b). 본 연구에서는 실험재료를 무한적으로 이용할 수 있는 장점이 있는 가시오갈피 배양세포를 재료로 하여 배양세포 고발현 *SWPA2* 프로모터를 이용하여 인체락토페린을 고생산하는 배양세포주를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

(주)마이코프렌츠가 개발한 가시오갈피 배발생 캘러스를 분양받아 형질전환에 이용하였다. 이 배발생 캘러스는 가시오갈피 성숙종자로부터 무균 상태로 적출한 접합자배의 자엽 및 배축을 2,4-D 1 mg/L, 3% sucrose, 0.4% Gelrite가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 유도된 것으로 3주 간격으로 동일배지에 계대배양 하였으며 계대배양 5-7일 된 캘러스를 형질전환에 이용하였다.

식물발현 벡터 제작

hLf 유전자가 세포내에서 발현될 수 있도록 담배의 소포체 (endoplasmic reticulum, ER) 단백질로 알려진 calreticulin의 signal peptide를 coding하는 염기서열을 PCR 방법으로 cloning하였다. 주형으로는 담배 cDNA library를 사용하였으며 primer에는 *NcoI* 및 *SalI* 제한효소 절단부위가 포함되었다. hLf 단백질은 N-말단에 존재하는 분비신호를 제거하고 앞에서 제조한 calreticulin의 signal peptide sequence와 연결하였다. 이를 위해 hLf cDNA (U07643)의 149번 염기에서 시작하는 primer (5'-GTC GAC GGC CGT AGG AGA AGG AG-3', 5'-GGC CAT CTA GAT CGG TTT TAC TTC CTG A-3')를 사용하여 PCR을 수행하였고, 증폭된 약 2.1 kb의 절편을 pRTL2 벡터에 cloning하였다. 염기서열 분석에 의해 hLf 유전자가 정확하게 증폭된 것을 확인하고, primer 절단부위를 이용하여 *SalI* 및 *XbaI*으로 절단하였다. 이러한 절편들 및 배양세포 고발현 *SWPA2* promoter를 이용하여 hLf를 발현할 수 있도록 하였다. 이렇게 제작된 유전자 카세트를 pCAMBIA2300에 삽입하여 식물발현벡터를 제조하여 *SWPA2pro::ER-hLf/pCAMBIA*이라 명명하였다. 식물발현벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입하여 배양세포의 형질전환에 사용하였다.

형질전환 및 배양

SWPA2pro::ER-hLf/pCAMBIA 벡터를 함유한 *Agrobacterium* 배양액 100 µL와 계대배양 5-7일째의 가시오갈피 배양세포를 10 mL의 액체배지가 들어 있는 Petridish에 각각 넣어 잘 섞은 후 25°C, 암조건에서 2일 동안 공동배양하였다. *Agrobacterium*를 제거하기 위하여 공동배양한 배양세포를 15 mL 원심분리용 tube에 옮기고 원심분리 (1,000 rpm, 5 min, 25°C)하여 상등액을 제거한 후, 새로이 MS배지에 넣고 원심분리 (1,000 rpm, 5 min, 25°C)하여 세포를 4번 세척하였다. 공동배양하였던 가시오갈피 배양세포를 2,4-D 1 mg/L, cla-

foran 300 mg/L, kanamycin 100 mg/L을 함유한 MS배지 (MS1DCK 선발배지)에 치상한 후 25°C, 암조건에서 3주 간격으로 3개월 이상 계대배양 하였다.

형질전환 배양세포의 선발

Kanamycin 저항성 가시오갈피 배양세포를 선발하기 위하여 선발배지에 3주 간격으로 3개월 이상 선발하였다. Kanamycin이 첨가된 선발배지에서 선발된 캘러스를 대상으로 PCR로 형질전환된 캘러스 라인을 확인하였다. PCR 수행을 위하여 캘러스로부터 genomic DNA를 추출한 후 hLf 특이 primer (5'-CGG GGC TGG AGA CGT GGC TTT AT-3', 5'-ACG GCG GTG TGG CAG GAC TTC T-3')을 이용하여 94°C에서 1분간 DNA를 변형시키고 62°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension 반응을 30회 반복시켜 DNA를 합성한 후 1% agarose gel에 전기영동하여 hLf 밴드를 확인하였다.

Southern blot 분석

ELISA 분석으로 hLf 함량이 비교적 높았던 6개 세포주 (5, 6, 23, 25, 27, 28)를 대상으로 Southern 분석을 실시하였다. Genomic DNA는 DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN)를 이용하여 분리하였으며 이를 제한효소 *EcoRI*로 처리하여 0.8% agarose gel에 전기영동하고 20X SSC buffer를 이용하여 Zeta-Probe GT membrane (Bio-Rad)으로 전이하였다. 1 kb의 hLf cDNA를 probe로 하였으며, rediprime II kit (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.)를 사용하여 probe를 [α -³²P]dCTP로 labelling하였다. Hybridization은 7% (v/v) SDS가 들어 있는 0.25 M sodium phosphate buffer (pH 7.2)를 사용하여 60°C에서 수행하였다. Hybridization 후 1% SDS가 들어 있는 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2)를 사용하여 실온에서 10분간 washing한 후 같은 buffer를 사용하여 세척을 2회 반복한 후 X-ray 필름에 노출하여 밴드를 확인하였다.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

PCR 분석으로 hLf 유전자 도입이 확인된 세포주를 대상으로 hLf 함량을 OxiResearch사의 BioxyTech Lactof-EIA Kit를 사용하여 조사하였다. 계대배양 4주된 배양세포 각 line으로부터 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 단백질을 추출하였다. hLf과 반응하는 항체로 미리 coating이 되어 있는 96 well plate에 hLf standard solution과 희석된 sample solution을 넣고 1차, 2차 항체를 차례로 넣어 37°C에서 각각 1시간씩 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

가시오갈피 배양세포의 현탁배양

형질전환 가시오갈피 배양세포주 중 hLf 함량이 가장 높은 23번 세포주와 비형질전환 세포주의 현탁배양을 위하여 캘러스 생중량 0.3 g을 2,4-D 1 mg/L을 함유한 MS배지 (MS1D 액체배지) 20 mL이 들어있는 100 mL Erlenmeyer 삼각플라스크에 접종하여 25°C, 암상태의 진탕배양기 (100 rpm)에서 배양하였다. 배양 3일 간격으로 21일째까지 배양세포를 수거한 다음 감압여과하여 생중량을 측정하고, 배양기간에 따른 세포의 hLf 함량을 ELISA 방법으로 측정하였다.

SDS-PAGE 및 western blot 분석

현탁배양 동안 수거된 형질전환 가시오갈피 배양세포주로부터 생산되는 hLf의 활성 분석을 위해 SDS-PAGE 및 western 분석을 실시하였다. 형질전환 가시오갈피 배양세포로부터 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 전체 수용성 단백질을 추출하였다. 50 µg 단백질을 10% acrylamide gel에서 전기영동하고 Coomassie brilliant R-250이 들어있는 염색액으로 염색한 후, 메탄올과 초산이 들어있는 탈색용액에 넣어 탈색하였다. 또한 같은 sample을 사용하여 SDS-PAGE를 실시한 후 gel을 nitrocellulose membrane에 전이하였다. Membrane을 5% skim milk로 4°C에서 overnight 처리하여 blocking시킨 후 TBST (Tris-Buffered Saline Tween, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 3회 세척하였다. Primary antibody를 10,000배 희석한 TBST에 membrane을 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 TBST로 세척하였다. TBST에 16,000배 희석한 secondary antibody (peroxidase conjugated anti-rabbit IgG)로 membrane을 1시간 동안 반응시킨 후 TBST로 세척하였다. Western blotting의 detection은 ECL kit (Amersham pharmacia biotech사)를 사용하였다.

결과 및 고찰

hLf 식물발현벡터 제작

hLf 단백질을 생산하는 형질전환 가시오갈피 배양세포주를 개발하기 위한 벡터는 hLf 유전자를 소포체에서 발현할 수 있도록 hLf의 N-말단에 있는 분비 peptide를 제거한 대신에 calreticulin의 signal peptide를 연결시킨 후 배양세포 고발현 SWPA2 promoter의 조절을 받도록 제작하였다. 이것을 kanamycin 선발표지를 함유하고 있는 pCAMBIA2300에 도입하여 SWPA2pro::ER-hLf/pCAMBIA라 명명하였다 (Figure 1). 이 형질전환 벡터는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입시킨 후 가시오갈피 배양세포 형질전환에 이용하였다.

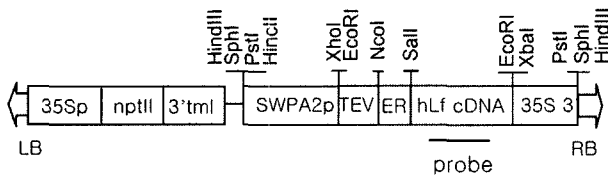


Figure 1. Structure of the plant expression vector, SWPA2-pro::ER-hLf/pCAMBIA for the Siberian ginseng transformation. SWPA2p: sweetpotato peroxidase promoter; TEV: tobacco etch virus leader sequence; ER: signal peptide of calreticulin; 35S 3': CaMV 35S transcription terminator; 35S p: CaMV 35S promoter; nptII: neomycin phosphotransferase gene; 3' tml: tml terminator. LB and RB: T-DNA left and right border sequences, respectively. Bar represents the probe form the 1.0 kb fragment of hLf cDNA for the Southern blot analysis.

Agrobacterium 매개에 의한 형질전환 및 배양세포주 선발

SWPA2pro::ER-hLf/pCAMBIA 벡터를 함유한 *Agrobacterium*과 2일 동안 공동배양 후 가시오갈피 배양세포를 100 mg/L kanamycin과 300 mg/L claforan이 첨가된 MS1DCK 선발배지에서 3주 간격으로 3개월 이상 계대배양하면서 선발하였다. 선발배지에서 배양 4주후부터 kanamycin 저항성 세포괴가 형성되기 시작하였으나 대부분의 세포들은 증식하지 않았다 (Figure 2A). 직경이 2 mm 이상인 세포괴의 형성빈도는 Petri dish당 5개 미만으로 8%에서 20% 정도의 빈도를 나타내었다 (결과 미제시).

Kanamycin 첨가 선발배지에서 형성된 캘러스의 hLf 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR를 수행하였다. 캘러스로부터 genomic DNA를 분리하고 hLf 유전자 특이 primer를 사용하여 PCR분석을 실시한 결과 kanamycin 저항성을 지닌 캘러스에서 0.78 kb의 hLf 유전자의 밴드가 관찰되었으며 그 효율은 약 75%이었다 (Figure 2B).

hLf 형질전환 가시오갈피 배양세포의 분석

PCR 분석으로 hLf 유전자 도입이 확인된 11개 가시오갈피 배양세포주를 대상으로 계대배양 21일째에 ELISA방법을 통해 hLf 단백질 함량을 측정하였다. 그 결과 5번 세포주가 140 µg/g fr wt로 가장 높은 함량의 hLf를 생산하였고, 23번 세포주는 120 µg/g fr wt을, 6번 세포주는 110 µg/g fr wt의 hLf를 생산하였다 (Figure 3). 이때 생산되는 hLf 함량은 전체 수용성 단백질의 약 2.5-3%에 해당된다. 다른 세포주들은 전체 수용성 단백질의 1% 이상을 hLf를 생산하는 것으로 나타났다. 이것은 동일한 벡터를 사용하여 형질전환된 담배 BY-2 혹은 인삼 배양세포주에서와 비슷한 수준임을 알 수 있다 (Choi et al. 2003; Kwon et al. 2003).

ELISA로 hLf 함량이 높았던 6개 세포주 (5, 6, 23, 25, 27, 28)를 대상으로 hLf 유전자의 도입 여부를 Southern

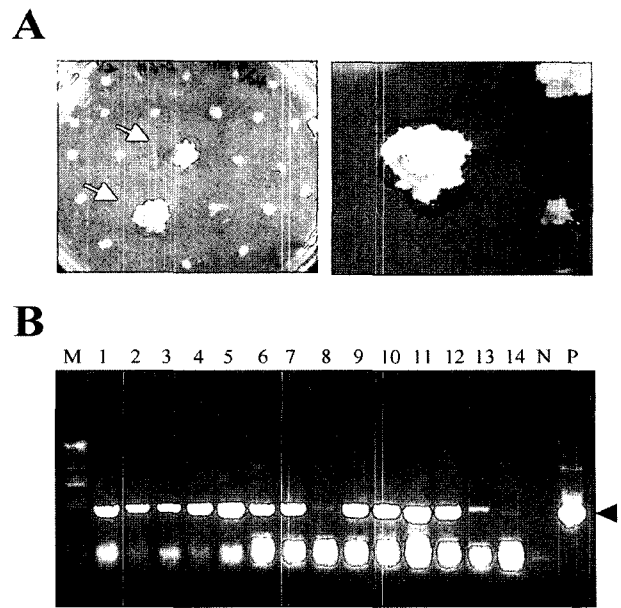


Figure 2. Kanamycin-resistant calli development of Siberian ginseng following *Agrobacterium*-mediated transformation. A: Proliferated calli lines on selection medium with 100 mg/L kanamycin, 8 weeks after culturing. Picture on the right is higher magnification of A. B: PCR analysis of kanamycin-resistant Siberian ginseng cell lines expressing hLf (◀ 0.8 kb). M, size marker; Lane 1-14, kanamycin-resistant cell lines; N, non-transformed callus; P, plasmid DNA as a positive control.

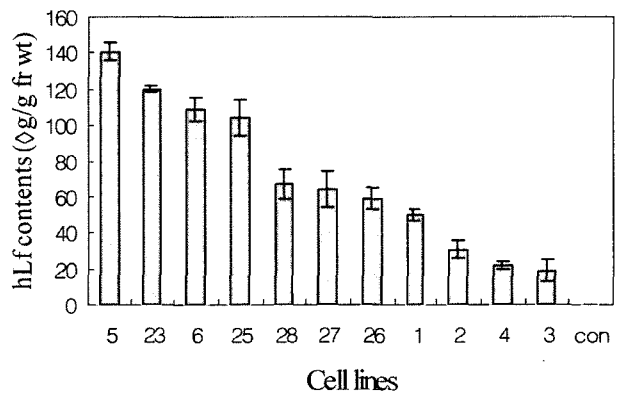


Figure 3. The human lactoferrin content in transformed Siberian ginseng calli. Eleven PCR positive Siberian ginseng calli were selected, and proteins were extracted. CON represents non-transgenic callus. The expression levels of human lactoferrin were estimated by ELISA. Data were obtained from means of 3 independent replicates.

blot 분석으로 확인하였다. 배양세포로부터 추출한 각각의 genomic DNA를 *EcoRI*으로 처리하였으며 hybridization은 hLf 유전자의 약 1 kb부분을 probe로 하여 수행하였다. 그 결과 형질전환 가시오갈피 배양세포주에서 도입시킨 hLf의 유전자가 1개의 밴드로 존재하였으며 이로써 hLf 유전자가 가시오갈피 계통내로 안정적으로 도입되었음을 알 수 있었다 (Figure 4). 그러나 *EcoRI* 절단에 의해서는 도입된 유전

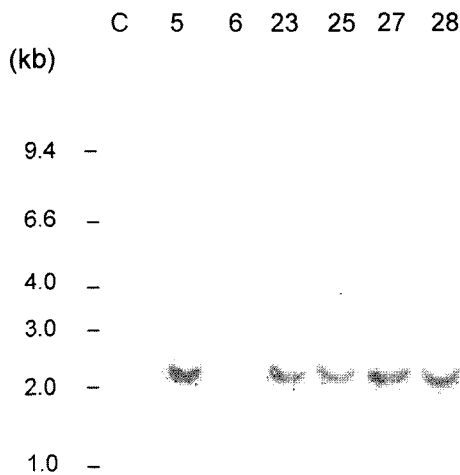


Figure 4. Southern blot analysis of transgenic Siberian ginseng calli. Genomic DNA (30 µg) prepared of transgenic and non-transgenic calli was digested with EcoRI, electrophoresed in 0.8% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with the 1.0 kb fragment of hLf as a probe. C, non-transgenic callus. 5-28, transgenic cell lines. The positions of molecular weight markers are shown on the left.

자의 단편만이 인지되기 때문에 다른 종류의 제한효소를 이용하여야만 정확한 copy 수를 알 수 있다. 하지만 도입 유전자의 염기서열에 많은 제한효소 site가 있어서 벡터와 식물 게놈 DNA를 절단할 수 있는 적절한 제한효소 site가 없어서 도입된 hLf 유전자의 copy수는 확인할 수 없었다.

hLf 고생산 세포주로 선발된 6개를 대상으로 전사 및 단백질 발현을 조사한 결과 23번 세포주에서 가장 높은 활성을 알 수 있었다 (결과 미제시). 따라서 hLf 함량이 높았던 형질전환 세포주 (23번)의 철 함량을 조사하기 위하여 충남대학교 기초과학연구소에 시료를 의뢰하였다. 그 결과 비형질전환 가시오갈피 배양세포의 철 함량은 172 ppm이었으나 23번 세포주는 417 ppm으로 약 2배 높은 철 함량을 나타내었다 (결과 미제시). 이러한 결과는 hLf이 2개의 철 (Fe³⁺)이 결합된 단백질이기 때문이며 hLf가 도입된 형질전환 배에서의 보고와 일치되는 것으로 대조구에 비해 형질전환체가 2배 이상의 철 함량을 나타내었다 (Anzai et al. 2000; Nandi et al. 2002).

현탁배양세포의 세포생장 및 hLf 함량

hLf 고생산 세포주인 23번 세포주 및 비형질전환 가시오갈피 배양세포의 세포생장은 sigmoid 성장곡선으로 비슷한 패턴을 나타냈으나 형질전환 세포주의 생중량이 비형질전환 세포주보다 높게 나타났다 (Figure 5A). 형질전환 세포주는 배양 3일 이후에 급격히 증가하기 시작하여 18일째에 최대 성장에 이르렀으나 비형질전환 세포주는 현탁배양 시작부터

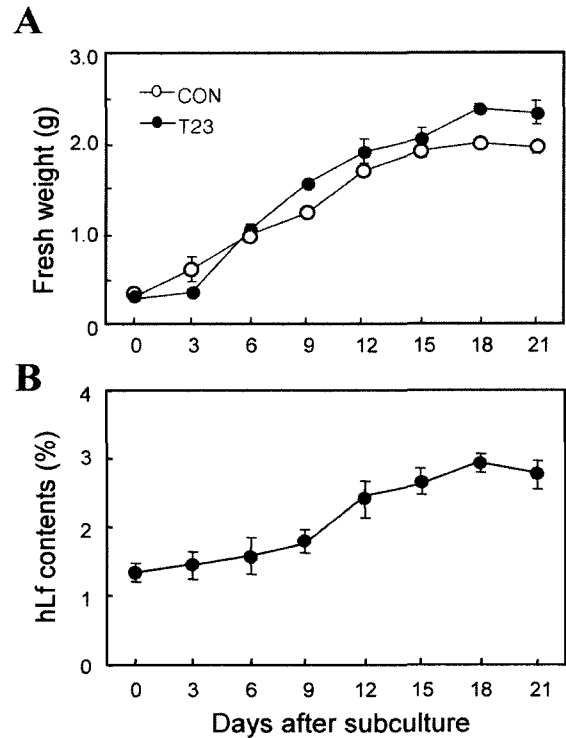


Figure 5. Changes in cell growth (A), content of human lactoferrin (B) in suspension cultures of transgenic Siberian ginseng cell line (T23). Cells were grown in the 100 mL Erlenmeyer flask. CON and T23 represent non-transgenic control cells and transformed cell line, respectively.

서서히 증가하여 15일째에 정지기에 이르렀으며 18일 이후 감소하였다. 현탁배양 동안 hLf 함량은 세포생장에 비례하여 증가하는 경향으로 배양 9일까지는 일정하게 유지 되다가 이후에 증가하기 시작하여 세포생장이 최대인 배양 18일에 최대치를 나타내었다. 이때 hLf 함량은 전체 수용성 단백질의 약 3%를 차지하였다 (Figure 5B). 18일째의 배양세포에서 생산되는 hLf의 활성은 배양초기에 비해 최대 2.3배 증가하였으며 이러한 현상은 형질전환에 이용한 스트레스 유도성 SWPA2 프로모터의 특성을 잘 반영한 결과이다. SWPA2 프로모터는 배양세포에서 정지기 단계 이후에 높은 발현을 유도하는 특징이 있어 형질전환 담배 배양세포에서 GUS 단백질을 최고 6.2배 향상시킨 보고가 있다 (Kim et al. 2003).

형질전환 가시오갈피 배양세포주 (23번 세포주)의 현탁배양 동안 3일 간격으로 수거된 배양세포의 hLf 단백질의 활성을 western blot으로 조사하였다 (Figure 6). 전체 수용성 단백질을 추출한 후 변성시켜서 SDS-PAGE로 전개한 다음 막 전사 과정으로 hLf 생산을 확인한 결과 천연의 hLf와 비슷한 크기인 약 80 KDa의 hLf 밴드를 확인할 수 있었다. 현탁배양 초기에는 hLf가 약하게 발현하였으며 배양 12일 이후부터 발현이 증가하여 18일에 최대로 발현하였다. 이러한 결과는 hLf의 ELISA 결과와 거의 일치함을 알 수 있다.

형질전환 가시오갈피 배양세포로부터 생산된 재조합 hLf

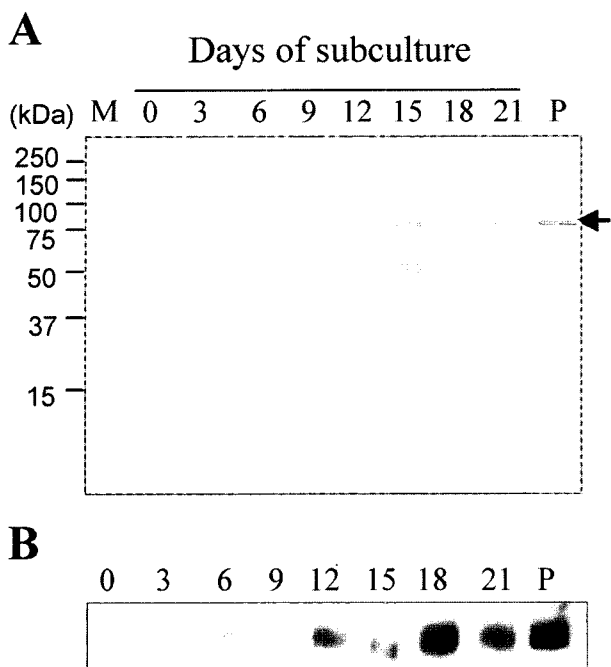


Figure 6. SDS-PAGE (A) and western blot analysis of human lactoferrin (B) in transgenic Siberian ginseng cell line (T23). Total soluble proteins were extracted suspension cultured cells after subculture. Lane M, marker. Lanes 0-21, days after subculture. P, commercially available lactoferrin (1 µg). Arrows indicate hLf protein (80 kDa).

의 N-말단 염기서열과 당조성 분석뿐만 아니라 항박테리아 활성 분석이 이루어져야 한다. 일반적으로 형질전환 식물체 유래 재조합 hLf는 authentic hLf와 동일한 N-말단 염기서열을 가지나 당조성은 다른 것으로 보고 되고 있으며 높은 항박테리아 활성을 갖는다고 보고 되었다 (Salmon et al. 1998; Chong and Langridge 2000; Nandi et al. 2002; Choi et al. 2003). 가시오갈피 형질전환에 사용한 *SWPA2* 프로모터는 스트레스에 의해 발현이 유도되는 특징이 있다 (Kim et al. 2003). 따라서 형질전환 가시오갈피 배양세포에 스트레스 관련 처리 및 배지 첨가제 등을 처리하여 hLf 생산성을 향상시키는 연구가 진행 중에 있어 보다 효율적인 생산성 향상 시스템이 확립될 수 있을 것이다. 결과적으로 본 연구는 배양세포 고 발현 프로모터를 이용하여 hLf 단백질을 약용식물 배양세포에서 생산할 수 있는 배양세포 고 발현 시스템 확립에 중요한 의미가 있다 하겠다.

적 요

락토페린은 철 결합 당단백질로서 항 미생물활성과 면역강화와 같은 생리활성 기능을 가지고 있다. 본 연구는 배양세포 고 발현 *SWPA2* promoter를 이용하여 인체락토페린 (hLf)을 생산하는 형질전환 가시오갈피 배양세포주 개발에 관한 것이다. 형질전환에 이용된 벡터는 산화스트레스 유도

성 *SWPA2* promoter의 조절 하에서 hLf이 소포체로 targeting되도록 제작된 *SWPA2pro::ER-hLf/pCAMBIA*이다. hLf을 생산하는 각 형질전환 배양세포들은 PCR과 Southern 분석을 통해 hLf 유전자가 가시오갈피 게놈내로 성공적으로 도입되었음을 확인하였으며, western blot과 ELISA를 통해 형질전환 가시오갈피 배양 세포주에서 hLf 단백질이 활성이 있음을 확인하였다. 형질전환 가시오갈피 배양세포에서 hLf 단백질의 함량은 세포배양이 진행될수록 증가하여 정지기 때 가장 높았으며 전체 수용성 단백질의 약 3%를 차지하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 인체락토페린을 고생산하는 약용식물 가시오갈피 배양 세포주는 산업적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비지원 (#PF0330602-02)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

Anzai H, Takaiwa F, Katsumata K (2000) Production of human lactoferrin in transgenic plants. In: Shimazaki K, Tsuda H, Tomita M, Kuwata T, Perraudin J, editors. Lactoferrin: Structure, Function and Applications. Elsevier, pp 265-271

Arakawa T, Chong DKX, Slattery CW, Langridge WHR (1999) Improvements in human health through production of human milk proteins in transgenic food plants. In: Shahidi eds. Chemicals via Higher Plant Bioengineering. New York: Kluwer Academic Publishers, Plenum Publishers, pp 149-159

Choi SM, Lee OS, Kwon SY, Kwak SS, Yu DY, Lee HS (2003) High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnol Lett* 25: 213-218.

Chong DK, Langridge WH (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Res* 9: 71-78.

Han SB, Park SK, Ahn HJ, Yoon YD, Kim YH, Lee JJ, Lee KH, Moon JS, Kim HC, Kim HM (2003a) Characterization of B cell membrane receptors of polysaccharide isolated from the root of *Acanthopanax koreanum*. *Int Immunopharmacol* 3: 683-691

Han SB, Yoon YD, Ahn HJ, Lee HS, Lee CW, Yoon WK, Park SK, Kim HM (2003b) Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. *Int Immunopharmacol* 3: 1301-1312

Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur YK, Bang JW, Kwak SS (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter

- from sweet potato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51: 831-838
- Kwon SY, Jo SH, Lee OS, Choi SM, Kwak SS, Lee HS (2003) Transgenic ginseng cell lines that produce high levels of a human lactoferrin. *Planta Med* 69: 1005-1008
- Lee WT (1979) Distribution of *Acanthopanax* plants in Korea. *Kor J Pharmacol* 10: 103-107
- Legrand D, Salmon V, Coddeville B, Benaissa M, Plancke Y, Spik G (1995) Structural determination of two N-linked glycans isolated from recombinant human lactoferrin expressed in BHK cells. *FEBS Lett* 365: 57-60
- Liang Q, Richardson T (1993) Expression and characterization of human lactoferrin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 41: 1800-1807
- Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P (1984) Human lactoferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem* 145: 659-676
- Min SR, Woo JW, Jeong WJ, Han SK, Lee YB, Liu JR (2005) Production of human lactoferrin in transgenic cell suspension cultures of sweetpotato. *Biol Plant* (in press)
- Mitra A, Zhang Z (1994) Expression of human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol* 103: 977-981
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nam MS, Yu DY, Lee KK, Kim JW, Lee SW (1996) Lactoferrin: A review *Kor J Dairy Sci* 18: 289-298
- Nandi S, Suzuki YA, Huang J, Yalda D, Pham P, Wu L, Bartley G, Huang N, Lonnerdal B (2002) Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci* 163: 713-722
- Salmon V, Legrand D, Georges B, Slomianny MC, Coddeville B, Spik G (1997) Expression and characterization of human lactoferrin produced in the Baculovirus expression system. *Protein Express Purif* 9: 203-210
- Salmon V, Legrand D, Slominanny MC, el Yazidi I, Spik G, Gruber V, Bournat P, Olganier B, Mison D, Theisen M, Merot B (1998) Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Express Purif* 13: 127-135
- Suzuki Y, Lelleher SL, Yalda D, Wu L, Huang J, Huang N, Lonnerdal B (2003) Expression, characterization, and biological activity of recombinant human lactoferrin in rice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36: 190-199
- van Berkel PHC, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pquwels EKJ, Nuijens J, Nibbering PH (2002) Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol* 20: 484-487
- Ward PP, May GS, Headon DS, Conneely OM (1992) An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 122: 219-223
- Yu DY (1997) Studies on the structure, function and production of lactoferrin. *Korean Dairy Technol* 15: 83-89

(접수일자 2005년 7월 15일, 수리일자 2005년 8월 19일)