

# 단일항체를 발현하는 형질전환 식물체의 *In Vitro* 화분발아에 대한 Boric Acid의 영향

안미현, 이경진, 고기성\*  
원광대학교 생명과학부

## Effect of Boric Acid on *In Vitro* Pollen Germination in Transgenic Plants Expressing Monoclonal Antibodies

Mi-Hyun Ahn, Kyung-Jin Lee, and Kisung Ko\*

Department of Biological Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

**ABSTRACT** Pollen germination viability is an essential factor to produce seeds from pollination and fertilization, which are required to maintain plant generation. In this study, we tried to identify the effect of boric acid on pollen germination and tube growth in non-transgenic and transgenic plants expressing monoclonal antibodies (anti-colorectal cancer mAb CO17-1A, anti-breast cancer mAb BR55, and anti-rabies virus mAb57). The pollen of non-transgenic plant was treated with different concentration of boric acid (0, 5, 10, 15, 20, 40  $\mu\text{g/mL}$ ) in germination buffer to investigate its effect on *in vitro* pollen germination. At 20  $\mu\text{g/mL}$  of boric acid, the pollen germination rate was the highest (49.5%) compared to other concentrations. In general, the germination rate significantly increased 3-10 folds in boric acid (20  $\mu\text{g/mL}$ ) treated group in non-transgenic and transgenic plants. Also, the pollen tube length increased in boric acid (20  $\mu\text{g/mL}$ ) treated groups. In the treated group, the pollen tube length increased until 3 h boric acid treatment and decreased after the 3 h, indicating that the 3 h is the most appropriate incubation time period. Western blot analysis showed that the mAb transgene expression was more stable in leaf than pollen in transgenic plants. This study suggested that 20  $\mu\text{g/mL}$  of boric acid is ideal concentration to induce *in vitro* pollen germination of transgenic plants expressing therapeutic monoclonal antibodies, indicating stable pollination and fertilization in transgenic plants.

### 서 론

Pollen germination viability (화분발아능력)은 식물의 종자 형성에 있어 중요한 fertilization (수정)이 이루어 지기 위한 필수요소이다. 종자에 의해 식물개체의 세대가 지속적으로

유지 될 수 있고, 식물체에 있는 유용한 유전인자가 다음세대로 안정하게 이동될 수 있기 때문이다. 최근 식물생명공학과 분자면역학 기술의 발달로 인해 식물소재를 이용한 경제적으로 저렴하고 안전한 의료용 항체 생산에 대한 관심이 높아지고 있다 (Ko and Koprowski 2005). 특히, 자가 및 교배 수정을 이용하여 항체를 생산하는 형질전환 식물체들의 세대번식과 seed bank의 구축을 위해서도 화분발아능력이 중요하다. 때문에, 형질전환식물체의 pollen germination viability

\*Corresponding author Tel 063-850-6088 Fax 063-857-8837  
E-mail: ksko@wonkwang.ac.kr

에 대한 연구가 몇몇 이루어지고 있다 (Chesnokov and Manteuffel 2000; Koga-Ban et al. 2004). 하지만, 고부가가치의 의료용 항체를 발현하는 식물에서 얻은 pollen germination viability에 대해서는 아직 발표된 바가 없다. Pollen germination이 원활하게 이루어져야만 fertilization에 의해 항체 유전자를 지니는 식물의 개체가 다음 세대로 지속적으로 유지 될 수 있기 때문에 pollen germination viability의 특성인 pollen의 germination rate (발아율)과 germ tube growth (발아체성장)이 중요하다.

인간 및 동물에게 발병하는 질병치료를 위한 면역치료제인 의료용 항체 단백질을 생산하기 위한 방법으로 박테리아, 미생물, 곤충, 동물 세포배양 시스템을 사용되고 있으나 (Breedveld 2000, Ma et al. 2003, Ko et al. 2005), 이러한 방법은 단백질의 분리 및 정제가 매우 어렵고 고가의 생산비용 등으로 인해 대량 생산하기가 어려운 단점이 있다 (Bakker et al. 2001, Ko et al. 2005). 하지만, 식물을 이용한 항체 생산은 동물을 이용하여 생산한 항체보다 안전하고 값이 싸며 쉽게 생산할 수 있는 장점이 있다 (Gomord et al. 2005). 최근에는 식물생산시스템에 대한 관심이 높아지고 있으며, 실제로 항암 혹은 항바이러스 효능을 지닌 항체를 식물에서 대량생산에 대한 연구가 보고되고 있다 (Ko et al. 2003, Ko et al. 2005, Brodzik et al. 2006). 따라서, 본 연구에서는 탄수화물, calcium, 호르몬 등과 같이 수분 발아에 영향을 미치는 boric acid (Kwack 1976; Picton and Steer 1983; Shivanna and Johri 1985)를 이용하여 의료용 항체를 발현하는 형질전환식물 [(대장암 치료용 항체 (mAb CO17-1A) (Ko et al. 2005), 유방암 치료용항체 (mAb BR55) (Brodzik et al. 2006), 광견병 치료용 항체 (mAb57) (Ko et al. 2003)]과 형질전환하지 않은 [non-transgenic plant (NT)] 식물의 *in vitro* pollen germination과 *in vitro* pollen tube length growth 생리적 특성을 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 식물화분재료

연구에 사용된 화분 (pollen)은 항암활성을 갖는 항체 [monoclonal antibody (mAb) CO17-1A (Ko et al. 2005), mAb BR55 (Brodzik et al. 2006)] 혹은 항바이러스 활성을 갖는 항체 [(mAb57) (Ko et al. 2003)] 유전자를 갖고 있는 형질전환 담배 (*Nicotiana tabacum* Xanthi) T<sub>2</sub> 식물체들과 NT식물의 꽃에서 얻었다. 형질전환식물의 종자들을 MS [Murashige and Skoog (Sigma,

Germany) 4.4 g/L, phyto agar (Duchefa, Netherlands) 7 g/L, sucrose 30 g/L, kanamycin (Duchefa, Netherlands) 100 mg/L]배지에 파종하여 발아 유도하였다. NT식물의 종자들은 kanamycin을 제외한 MS 배지에서 발아 유도하였다. 발아된 담배식물을 원예용 상토 (KumJungWon Topsoil, Korea)에 심어서 광주율은 16 h에 8 h 기준으로 22°C의 온도에서 5개월 정도 키웠다. 각 식물에서 꽃이 개화하기 직전에 pollen을 추출하여 4°C에서 보관하였다.

### 화분발아 (Pollen Germination)와 화분발아체성장 (Pollen tube Length Growth) 분석

Pollen germination에 대한 boric acid (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) (Hanawa Guaranteed reagent, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Osaka, Japan)의 영향을 분석하기 위하여 pollen germination buffer (10% sucrose가 포함된 증류수)를 이용하였다. Boric acid의 농도 별 영향을 파악하기 위하여 0, 5, 10, 15, 20, 40 µg/mL를 포함하는 germination buffer를 만들어 실험에 사용하였다. Germination buffer를 20 µL를 하나의 glass microscope slide에 3곳에 올리고, 그 위에 화분들을 떨어뜨려 섞어주었다. Pollen germination 수분 유지를 위해서 slide를 petri-dish 안에 증류수 5 mL로 적신 filter paper위에 올려놓았다. 30°C incubation을 하여 광학 현미경 (Olympus Inc., Japan)상에서 화분발아율 (pollen germination rate)과 pollen tube length growth를 관찰하였다. 시간에 따른 pollen tube length growth의 변화를 보기 위하여 germination buffer의 incubation 시간을 1, 2, 3, 4, 5 h 으로 나누어 관찰하였다. slide위에 놓인 각각의 20 µL의 germination buffer 방울을 실험반복단위로 삼았다. 전체 관찰한 pollen의 개수와 발아된 pollen의 개수를 나눈 백분율을 pollen germination rate로 계산하였다. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS V10.0, SPSS Inc., Chicago, IL) 통계 프로그램을 이용하여 그룹간의 차이를 알아보았다.

### Genomic DNA 분리 및 PCR

형질전환식물에서의 항체유전자 유무를 보기 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR) 방법을 사용하였다. Genomic DNA는 NT식물과 형질전환식물의 잎에서 DNA 분리 kit (Qiagen Inc., Germany)을 사용하여 각각 분리하였다. 그 방법을 간단히 설명하자면, 100 mg의 식물 잎을 갈아준 뒤 RNase A를 처리하여, DNA column에 걸어주고 column을 여러 차례 씻

는 과정을 거치게 함으로써 깨끗한 상태의 genomic DNA를 추출하였다. 이러한 genomic DNA에 각각의 형질전환 유전자인 mAb CO17-1A의 증쇄 (Forward; 5'-ATGGAATGGAGCAGAGTCTTT-3', Reverse; 5'-ATCGATTTTACCCGGA GTCCG-3'), mAbBR55 증쇄 (Forward; 5'-ACCATGGACTT GGGGCTCAGCTTGATT-3', Reverse; 5'-TCTAGATCAAAG TTCATCTTACCCGAGTCCGGGAGAAGCT-3'), mAb57의 증쇄 (Forward; 5'-CGCCATGGACTGGACCTGGAGGTT-3', Reverse; 5'-GCTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGTTACCC GGGGACAGGGAG-3')를 증폭하기 위한 primer를 섞어주고, DNA polymerase (i-Max II, Intron Inc., Korea)를 처리하여 PCR 반응을 수행하였다. mAb CO17-1A에 대한 PCR 조건은 94°C에서 20초 denaturing, 53°C 10초 annealing, 72°C 40초 extension 반응으로 30회 반복하였고, mAb BR55와 mAb57의 경우 primer annealing 온도만 각각 64°C와 67°C로 변경하여 수행하였다. 증폭된 DNA fragment를 1% agarose gel에 전기영동 한 후 UV에서 확인하였다.

#### Western Blot을 통한 단백질 발현 확인

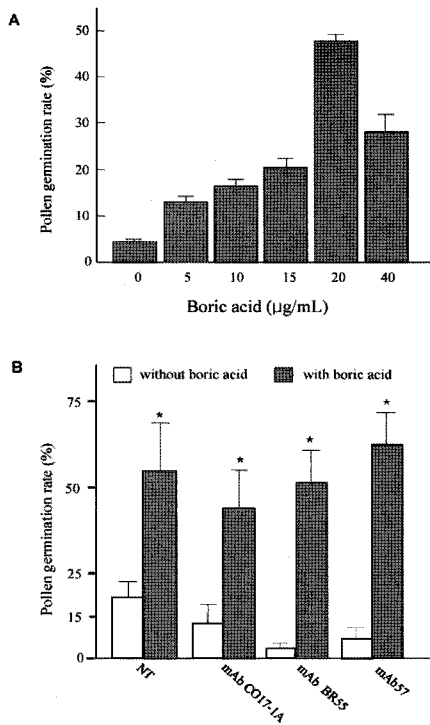
형질전환식물에서 항암 혹은 항바이러스 항체 (mAb) 단백질의 발현을 확인하기 위하여, Western blot 방법을 사용하였다. 형질전환 혹은 NT식물로부터 얻은 잎 혹은 pollen의 100 µg을 200 µL의 Bradely buffer (50 mM Tris, pH7.5, 10 mM KCl, 20% glycerol, 0.4 M sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM β-mercaptoethanol)에서 각각 갈아주었다. 잎 혹은 pollen의 extract을 4X sample buffer (0.24 M Tris-HCl, 0.24 M SDS, 40% glycerol, 20% β-mercaptoethanol, pH6.8)에 넣어 1분간 끓인 후 원심분리로 상정액을 취하여 12.5%의 SDS-PAGE에서 mini-Protean II™ system (Bio-Rad Labs, Hercules, CA)을 사용하여 단백질을 분리하였다. Nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)에 단백질을 이동 시킨 후 blocking buffer [0.2% I-Block (Tropix, Bedford, MA) in 0.1% Tween-20 (Duchefa, Netherlands) in 1X PBS]를 이용하여 4°C에서 12 h 이상 blocking 해주었다. Murine 항체 (mAb CO17-1A와 mAb BR55) 증쇄 혹은 경쇄의 발현을 확인하기 위하여 Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-murine IgG (Fc<sub>v</sub> fragment-specific) 혹은 HRP conjugated goat-anti murine IgG [F(ab')<sub>2</sub> fragment-specific] (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA)를 blocking buffer 1:3,000 비

율로 희석하여 membrane에 2 h 동안 실온에서 각각 처리하였다. 인간 항체인 항광견병 virus 항체의 발현을 보기 위하여 HRP conjugated goat-anti human IgG [Fc<sub>v</sub> 혹은 F(ab')<sub>2</sub> fragments-specific] (Immuno Research Labs, West Grove, PA)을 1:3,000 농도로 사용하였다. Substrate로 Super Signal® West Pico Kit (Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 반응시킨 후 film 통하여 signal을 육안으로 확인하였다.

## 결 과

### Boric Acid에 의한 Pollen Germination 영향

Boric acid에 의한 pollen germination의 영향을 보기 위해 형질전환 하지 않은 담배 식물 [non-transgenic plant (NT)]의 화분을 채취한 뒤 boric acid (0, 5, 10, 15, 20, 40 µg/mL)를 처리하여 boric acid 농도에 따른 pollen germination rate의 증감을 확인하였다 (Fig. 1A). Pollen germination rate은 boric acid 0 µg/mL (5%) 농도에서 20 µg/mL (49.5%) 농도까지 계속 증가하다가, 더 높은 농도인 40 µg/mL (29.9%)가 처리되었을 때는 오히려 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 1A). 항암 활성을 갖는 항체 [monoclonal antibody (mAb) CO17-1A (Ko et al. 2005), mAb BR55 (Brodzik et al. 2006)] 혹은 항바이러스 활성을 갖는 항체 (mAb57) (Ko et al. 2003) 유전인자를 갖고 있는 형질전환 담배 (*N. tabaccum* Xanthi) 식물과 NT식물을 비교해 볼 때에도 위와 동일하게 boric acid (20 µg/mL) 농도가 처리되었을 때 pollen germination rate이 가장 높았다. Pollen germination rate은 boric acid (20 µg/mL)를 처리하지 않은 것에 비해 처리한 mAb CO17-A 형질전환식물에서 3.4배, mAb BR55 형질전환식물에서 10배, mAb57 형질전환식물에서 8.6배까지 각각 증가하였다 (Fig. 1B). Boric acid 비처리 그룹 (0 µg/mL)과 처리 그룹 (20 µg/mL) 사이에서 pollen germination rate의 증가는 통계적으로 유의하였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1B). NT의 경우, boric acid의 농도차에 따른 실험결과 (5%) (Fig. 1A)와 형질전환 pollen과의 비교실험결과 (18%) (Fig. 1B) 사이의 pollen germination rate의 차이를 보였다. 이러한 boric acid 비처리 NT그룹 간의 실험 별 pollen germination rate 차이는 수집된 pollen sample 간의 차이로 생각 되어진다. Boric acid에 의한 pollen tube length를 현미경으로 관찰한 결과, 0과 10 µg/mL에서는 pollen tube growth가 그리 활발히 이루어지지 않았다. 반면, boric acid 20 µg/mL 농도에

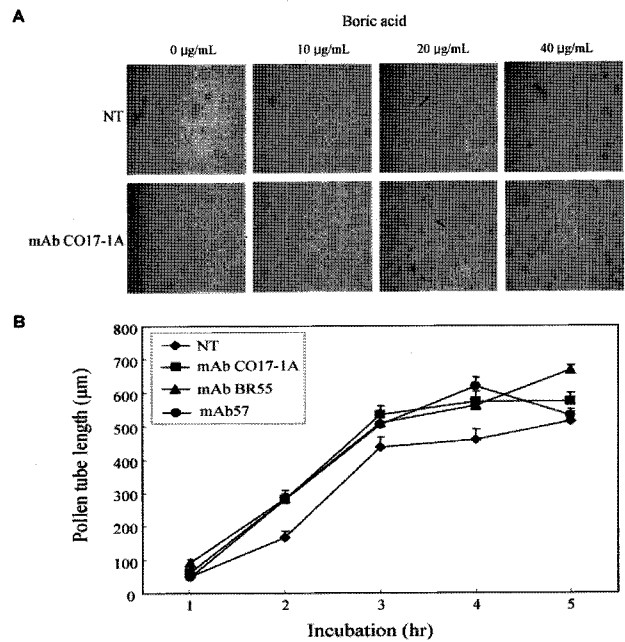


**Figure 1.** Effect of boric acid on pollen germination rate in non-transgenic (A) and transgenic (B) tobacco plant. A. Different amount of boric acid (0, 5, 10, 15, 20, 40 µg/mL) was added to pollen germination buffer (10% sucrose in H<sub>2</sub>O). The pollen germination rate was calculated as the number of germinating pollens divided by the total number of assayed pollens multiplied by 100. For each assay the number of pollens counted was more than 100. The bar graphs show mean values of the germination rate obtained from triplicate assays. B. Different pollen germination rate between with and without boric acid (20 µg/mL) in non-transgenic and transgenic plants. The germination rate significantly increased in boric acid treated groups. \* indicates significantly different germination rate between with and without boric acid treated groups,  $p < 0.05$ .

서 pollen tube growth가 가장 활발하게 나타났다 (Fig. 2A, arrows). 이러한 결과는 mAb CO17-1A 형질전환식물과 NT 식물에서 모두 동일하게 나타났다 (Fig. 2A). 위의 결과를 통해, germination buffer에 적정농도 (20 µg/mL)의 boric acid를 첨가한다면, 형질전환식물 혹은 NT식물 여부에 관계없이 pollen germination rate과 pollen tube length가 증가한다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 시간변화에 따른 Pollen Tube Growth 추이 변화

Pollen germination rate이 가장 높은 20 µg/mL의 boric acid에서 각 시간에 따른 pollen tube growth를 확인하였다 (Fig. 2B). NT식물의 pollen에서 매 1 h 단위로 pollen tube length를 관

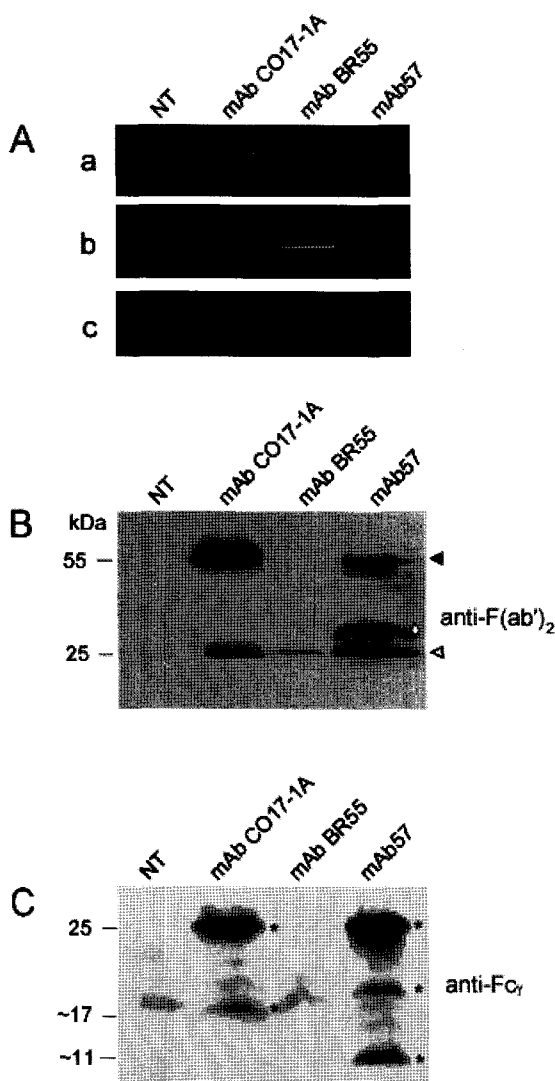


**Figure 2.** Pollen tube growth at different concentration of boric acid. A. Pollens of non-transgenic and mAb CO17-1A transgenic plant were treated with different concentration (0, 10, 20, 40 µg/mL) of boric acid. The pollen tube length maximum-increased at 20 µg/mL of boric acid. Arrows indicate germinating pollen tubes. B. Response of pollen tube growth of non-transgenic and transgenic plants to incubation time in germination buffer containing 20 µg/mL of boric acid. The pollen tube growth was observed every 1 h after incubation up to 5 h. For each assay the number of pollens counted was more than 100. The values of pollen tube length represent mean values obtained from triplicate assays.

찰한 결과, 1 h (50 µm) 까지는 크게 변화하지 않았다. 하지만 2 h (152 µm) 및 3 h (430 µm)이 된 후에는 급격히 증가 양상을 확인할 수 있었다. 3 h 후에는 pollen tube growth가 둔화 됨을 확인하였다. 형질전환식물 [mAb CO17-1A (대장암)와 mAb BR55 (유방암)와 항바이러스 항체 mAb57 (광견병)]의 화분에서도 비슷한 양상을 보였다. 형질전환식물의 경우 1 h 에서 3 h 사이에 pollen tube length가 급격히 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 3 h 이후에는 그 pollen tube length의 증가율이 둔화되었다. 심지어는 mAb57을 발현하는 형질전환식물의 경우에는 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2B).

#### 항체 유전자 존재 및 단백질 발현

형질전환식물과 NT식물의 genomic DNA PCR을 수행하여 각각의 항체 유전자가 존재하는지를 확인하였다 (Fig. 3A). 동량의 DNA를 이용하여 primer와 반응을 통해 각각 mAb



**Figure 3.** PCR and western blot to confirm existence and expression of monoclonal antibody transgenes in transgenic plants. A. Presence of the genes of heavy chain of monoclonal antibody in leaf genomic DNA of transgenic plants. PCR was conducted using amplifying primers for heavy chain of mAb CO17-1A (a), mAb BR55 (b) and mAb57 (c). B. Immunoblot with anti-F(ab')<sub>2</sub> specific IgG conjugated to horseradish peroxidase as a secondary antibody to confirm expression of heavy and light chains of monoclonal antibodies in leaf of transgenic plants. Black and white arrow heads indicate heavy (50 kDa) and light (25 kDa) chains, respectively. A diamond indicates an extra protein band. C. Immunoblot with anti-Fc<sub>γ</sub> specific IgG conjugated to horseradish peroxidase as a secondary antibody to confirm expression of heavy chain of monoclonal antibodies in pollen of transgenic plants. Asterisks indicate degraded heavy chain protein bands. NT, non-transgenic plant; mAb CO17-1A, murine mAb CO17-1A transgenic plant; mAb BR55, murine mAb BR55 transgenic plant; mAb57, human mAb57 transgenic plant. Anti-murine or -human goat IgG as a secondary antibody was used to detect murine mAbs (mAb CO17-1A and mAb BR55) or human mAb (mAb57), respectively.

CO17-1A, mAb BR55, mAb57 식물 앞에서 예상한 항체의 heavy chain (중쇄) 유전자의 크기(~1.4 kbs)에서 DNA amplification을 확인하였다 (Fig. 3A). NT식물에서는 DNA amplification을 볼 수 없었다. 식물의 잎에서 항체 protein들이 발현하는 지를 확인하기 위하여 잎의 total protein에 anti-F(ab')<sub>2</sub> goat IgG를 반응 시켰다 (Fig. 3B, arrow heads). mAb CO17-1A 형질전환식물 앞에서 중쇄 (50 kDa)와 경쇄 (25 kDa)의 크기로 예상되는 두 개의 protein band 들을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B, black and white arrow heads, respectively). 하지만, mAb BR55 식물에서는 경쇄는 확인되었으나 중쇄는 확인할 수 없었다. 항광견병바이러스 인간항체유전자를 갖고 있는 mAb57 형질전환식물 앞에서는 중쇄 (50 kDa)과 경쇄 (25 kDa)의 크기로 예상되는 protein band 들을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B, black and white arrow heads, respectively). 또한, 경쇄 protein band 보다 큰 크기의 extra band도 확인되었다 (Fig. 3B, diamond). 식물의 pollen에서의 항체 단백질 발현을 확인하기 위하여, murine 항체유전자를 갖는 형질전환식물 (mAb CO17-1A 혹은 mAb BR55)에서는 2차 항체인 anti-murine Fc<sub>γ</sub> goat IgG를, 혹은 인간 항바이러스 항체유전자 (mAb57)를 갖고 있는 식물에서는 anti-human Fc<sub>γ</sub> goat IgG를 각각 처리하였다 (Fig. 3C). mAb CO17-1A와 mAb57 형질전환식물에서는 여러 protein band들을 확인할 수 있었으나, 중쇄 크기 (50 kDa)의 protein band는 확인되지 않았다 (Fig. 3C, asterisks). mAb BR55의 유전자를 갖는 형질전환식물에서는 mAb BR55의 중쇄 protein band를 전혀 확인할 수 없었다. mAb BR55 식물의 pollen protein에 anti-F(ab')<sub>2</sub> goat IgG를 2차 항체로 반응하였으나, 중쇄 혹은 경쇄 크기의 protein band를 확인할 수 없었다 (data not shown). 예상대로, negative control인 NT식물에서는 중쇄 혹은 경쇄 protein과 관련된 specific protein band를 확인할 수 없었다.

## 고 찰

본 연구를 통해, 의료용 항체를 발현하는 형질전환 담배 식물의 *in vitro* pollen germination rate과 pollen tube growth가 boric acid를 첨가함으로써 증가한다는 것을 확인하였다. 특히, germination buffer에 boric acid가 20 µg/mL의 농도가 처리되었을 때 가장 높은 germination rate 및 pollen tube growth를 갖는 것을 확인하였다. 형질전환 담배식물의 pollen germination을 관찰할 때 germination buffer를 처리한 3 h 직

후가 가장 germination rate이 높았다는 것도 확인하였다. Boric acid는 pollen germination에 중요한 탄수화물, calcium, 호르몬 등의 양이나 활성을 높여주기 때문에 여러 식물의 *in vitro* pollen germination을 보기 위하여 첨가되는 화학물질이다 (Kwack 1976; Picton and Steer 1983; Shivanna and Johri 1985). Boric acid는 pollen tube growth를 위해 pectic compound의 형성이나 당의 흡수 및 사용 기작을 활발히 활성화시키는 역할을 하는 boron의 주 공급원이다 (Wang et al. 2003).

식물을 이용한 부가가치가 높은 의료용 항체 생산은 경제적으로 이득이며, 다른 동물세포나 동물을 이용한 생산 system과 비교해 볼 때 사람에게 감염되는 병원균에 대한 위험이 없어 안전하다 (Ma et al. 2003). 이러한 의료용 항체를 생산하는 식물을 연구하고 상업적으로 재배하기 위하여 반드시 확인되어야 하는 특성은 식물의 재배 생리뿐만 아니라 식물의 생식과정인 수분수정에 있어서 중요한 pollen germination viability이라 할 수 있다. 형질전환식물의 pollen germination이 원활하게 이루어 져야만 자가수정(self-fertilization)을 통한 항체단백질을 생산하는 homozygous 식물 개체가 지속적으로 세대 유지 될 수 있고 식물을 대량재배 생산하기 위한 seed bank를 구축할 수 있다. 단순한 자가수분수정을 위해서라면 식물의 꽃을 개화 전에 봉지를 씌워 다른 화분의 타가 수분수정이 되지 않게 방지를 하면 된다. 하지만, 인위적 인공수정을 위해서는 화분을 채취하여 주어진 기간 동안 저장을 하였다가 다른 식물의 꽃에 수분을 해야 한다. 이때 pollen germination viability가 중요하다. 즉, 항체를 생산하기 위하여 중쇄를 발현하는 형질전환식물과 경쇄를 발현하는 형질전환식물 사이의 교배를 통해 중쇄와 경쇄가 결합된 완전한 full-size antibody를 생산하는 형질전환식물을 만들 경우 더욱 형질전환식물의 pollen germination viability가 중요한 요소라 할 수 있다 (Ma et al. 1998). 이 번 연구에 사용된 pollen은 꽃에서 채취한 후 3-4주 보관하여 pollen germination viability에 관련한 특성 등을 관찰하였다. 본 연구자들은 이러한 3-4주 보관한 pollen들을 이용하여 다른 형질전환 식물 개체 간의 수분수정을 성공시켰다 (data not shown). 이는 두 개의 다른 형질 (중쇄와 경쇄)을 갖고 있는 각각의 형질전환 식물들이 같은 시기에 꽃을 형성하지 않을 경우 먼저 꽃을 형성하는 식물에서 pollen을 얻고 3-4주 뒤에 다른 형질전환 식물의 꽃에 수분이 가능하다는 것을 제시한 것이라 할 수 있다.

형질전환식물에서 얻은 잎 genomic DNA PCR분석을 통해 확인한 결과, 항체유전인자가 안정적으로 잎에 존재함을

확인하였다. Western blot 분석을 통해 잎에서는 중쇄 및 경쇄의 발현을 확인할 수 있었으나, pollen에서는 중쇄 size 보다 작은 여러 specific한 protein들만 확인할 수 있었다. 경쇄의 발현은 확인조차 할 수 없었다 (data not shown). 이 결과로 볼 때, 잎에서의 중쇄 단백질 발현보다 pollen에서의 항체 발현이 양적으로 적게 일어난다고 볼 수 있는데, 이는 중쇄 단백질들이 안정적으로 존재하지 못하고 아마도 pollen 내에 존재하는 protein degradation 관련 효소에 의한 degradation이 되는 것으로 해석할 수 있다 (Ko et al. 2003, Radlowski et al. 2005). 사실, 잎이 항체를 생산하고 추출하는 데 있어 중요한 biomass를 차지하기 때문에 pollen에서 발현량이 적거나 degradation이 일어난다 하더라도 항체유전인자를 다음세대로 안정하게 전달만 한다면 실질적으로 문제가 되지는 않는다. 하지만, mAb CO17-1A나 mAb57 형질전환식물과는 달리 mAb BR55 형질전환식물의 경우와 같이 잎에서 중쇄와 경쇄의 발현이 전 세대보다 감소되었거나 확인할 수 없는 경우에는 문제가 될 수 있다. 즉, 유전인자는 있으나 단백질이 발현되지 않는 경우는 gene silencing에 의한 현상이 아닌가 추측된다 (Ko et al. 1998). 그 이유로 mAb CO17-1A나 mAb57의 경우 중쇄와 경쇄 유전자들은 각각 CaMV35S promoter와 potato protease inhibitor II promoter에 의해 전사가 제어되는 반면, mAb BR55의 경우 중쇄와 경쇄 모두 같은 CaMV35S promoter에 의해 전사가 제어되게 구성하였다 (Ko et al. 2003, Ko 2005, Brodzik et al. 2006). 다시 말하면, 동일한 promoter gene sequences가 중쇄의 gene silencing을 제공한 주요한 원인요소 중 하나가 아닌가 추측된다 (Vaucheret et al. 1998). 이러한 gene silencing의 원인을 제거하기 위하여 mAb CO17-1A나 mAb57 식물과 같이 중쇄와 경쇄 유전인자에 각각 다른 promoter를 사용하여야 할 것으로 본다.

식물에 대한 형질전환 기술을 이용하여 의료용 항체 단백질을 생산하는 것은 아직도 많은 과제가 남아있다. 특히, 의료용 항체 단백질을 대량생산 가능한 seed bank의 확립은 경제적으로도 반드시 수행되어야 할 과제이다. 본 연구를 통하여 확인한 내용들은 형질전환 식물체의 안정적인 유전자 존재 및 단백질 발현에 그 의미를 두기 보다는 형질전환식물에서 얻은 pollen germination viability (pollen germination과 pollen tube growth)를 연구할 때 1) boric acid의 영향을 보았다는 것, 2) 적절한 germination buffer와 관찰시간에 대한 예를 보여준 연구결과, 3) 마지막으로 항체를 발현하는 형질전환식물 혹은 NT식물에서의 pollen germination viability의 차이점이 없다는 것이다.

## 적 요

식물화분발아는 수분수정을 통한 식물의 종자형성과 식물개체의 지속적 세대유지를 위한 중요한 요소이다. 따라서, 본 연구에서는 boric acid를 이용하여 형질전환 하지 않은 (NT) 식물과 항암활성 (anti-colorectal cancer mAb CO17-1A, anti-breast cancer mAb BR55) 혹은 항바이러스 활성을 갖는 항체 (anti-rabies virus mAb57)의 유전인자를 발현하는 형질전환식물 간의 *in vitro* pollen germination과 pollen tube growth의 차이를 알아보았다. Boric acid의 화분발아에 미치는 영향을 보기 위하여 0, 5, 10, 15, 20, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 갖는 발아용액 (germination buffer)을 담배식물 화분에 처리하여 pollen germination rate을 본 결과 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가장 높게 발아율 (49.5%)을 보였다. Boric acid (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 대해 형질전환식물과 NT식물에서 화분발아율을 관찰한 결과, boric acid를 처리하지 않은 화분에 비해 형질전환여부에 관계없이 발아율이 3-10배 증가하였다. 또한, boric acid 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 형질전환식물과 NT식물의 pollen tube length의 성장률이 가장 높게 나타났다. 시간 별로 형질전환 식물들의 pollen tube length를 확인 한 결과, germination buffer (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고 난 후 3시간까지 가장 빠른 성장률을 보였으며, 3시간 후에는 그 성장률이 둔화됨을 확인하였다. Western blot를 이용하여 식물의 화분과 잎에서 황체유전자 단백질 발현을 확인하였다. 화분과 잎에서의 발현을 비교해 본 결과, 잎에서 항체의 안정한 발현을 확인하였다. 본 연구결과를 통해 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 boric acid가 항체발현 형질전환담배식물의 *in vitro* pollen germination을 보기 위해 가장 적절한 농도라는 것을 제시하였다. 궁극적으로 의료용 항체유전자를 발현하는 형질전환식물의 *in vitro* pollen germination viability를 확인함으로써 형질전환식물의 화분의 안정적인 수분수정이 이루어질 수 있음을 간접적으로 제시하였다.

## 사 사

본 연구는 형질전환 식물을 이용한 유용 단백질 생산에 관한 연구로 학술진흥 재단에서 후원하는 연구번호, F000021 (I01150) 과제에 해당합니다.

## 인용문헌

- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord V, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, Bosch D (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2899-2904
- Breedveld FC (2000) Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 355: 735-740
- Brodzik R, Glogowska M, Bandurska K, Okulicz M, Deka D, Ko K, van der Linden J, Leusen JH, Pogrebnyak N, Golovkin M, Stepiewski Z, Koprowski H (2006) Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8804-8809
- Chesnokov V, Manteuffel R (2000) Kanamycin resistance of germinating pollen of transgenic plants. *Sex Plant Reprod* 12: 232-236
- Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, Faye L (2005) Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends in Biotechnol* 23: 559-565
- Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palaugui JC, Vernhettes S (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal* 16: 651-659
- Koga-Ban Y, Tabei Y, Ishimoto M, Nishizawa Y, Tsuchiya K, Imaizumi N, Nakamura H, Kayano T, Tanaka H (2004) Biosafety assessment of transgenic plants in the greenhouse and the field : A case study of transgenic cucumber. *The Jap Agr Res Quarterly* 38: 167-174
- Ko K, Brown SK, Norelli JL, and Aldwinckle HS (1998) Alterations of nptII and gus expression following micropropagation of transgenic M.7 apple rootstock lines. *J Amer Soc Hort Sci* 123: 11-18
- Ko K, Tekoah Y, Rudd PM, Harvey DJ, Dwek RA, Spitsin S, Hanlon CA, Rupprecht C, Dietzschold B, Golovkin M, Koprowski H (2003) Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8013-8018
- Ko K, Koprowski H (2005) Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res* 111: 93-100
- Ko K, Stepiewski Z, Glogowska M, Koprowski H (2005) Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7026-7030
- Kwack BH (1976) Studies on cellular site of calcium action in promoting pollen tube growth. *Plant Physiol* 52: 825-833
- Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L,

- Hein MB, Lehner T (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 4: 601-606
- Ma JK, Drake PM, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4: 794-805
- Picton JM, Steer MW (1983) Evidence for the role of  $Ca^{2+}$  ions in tip extension in pollen tube. *Proto plasma* 115: 11-17
- Radlowski M, Bartkowiak S, Winiarczyk K, Kalinowski A (2005) Differential influence of bacitracin on plant proteolytic enzyme activities. *Biochim Biophys Acta* 1722: 1-5
- Shivanna KR, Johri BM (1985) *The angiosperm pollen*. Wiley Eastern Ltd. pp. 5:94-95.
- Wang Q, Lu L, Wu X, Li Y, Lin J (2003) Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. *Tree Physiol* 23: 345-351

(접수일자 2007년 10월 15일, 수리일자 2007년 11월 23일)