

조직형 플라스미노겐 액티베이터와 관련 변이 단백질들을 발현하는 알팔파 형질전환체

심준수 · 이 용 · 고효림 · 박효경 · 김형미 · 임규희 · 안기성 · 김용환 · 한범수*
농촌진흥청 국립농업과학원

Expression of tissue-type plasminogen activator and its derivative proteins in transgenic alfalfa plants

Joon-Soo Sim · Yong Rhee · Hyo-Rim Ko · Hyo-Kyung Pak · Hyeong-Mi Kim · Kyu-Hee Lim ·
Ki-Seong An · Yong-Hwan Kim · Bum-Soo Hahn*

National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-857, Korea

ABSTRACT Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is a thrombolytic agent important in fibrin clot lysis. T-PA causes fibrin-specific plasminogen activation. Six binary vectors harboring t-PA and its derivative genes were cloned and expressed in transgenic alfalfa plants. The insertion of the t-PA and its derivative genes in genomic DNA of alfalfa plants was confirmed by PCR. The presence of the t-PA and its derivative transcripts in total RNAs of the transgenic alfalfa leaves was verified by RT-PCR. ELISA experiments demonstrated that the highest level of recombinant t-PA expression was 75.1 μg /total soluble protein (mg) in alfalfa plants. The amount of recombinant t-PA and its derivative proteins in transgenic plants was estimated to range from 9.7 to 39.5 μg /total soluble proteins (mg). Western blot analysis of the transformed alfalfa leaves revealed bands of approximately 68-kDa recombinant t-PA and its derivative proteins. The fibrinolysis of recombinant t-PA and its derivative proteins was confirmed by a fibrin plate assay (range from 3.2 to 8.1 cm). The results presented provide information for the development of an additional production of recombinant human proteins having pharmaceutical applications using transgenic plants.

서 론

혈관 내피 조직세포로부터 생성되는 혈전용해제 [tissue-type plasminogen activator (t-PA)]는 피브린 표면에서, 활성이 없는 형태의 플라스미노겐 (plasminogen)을 활성을 갖는 형태의 플라스민 (plasmin)으로 전환을 시켜 혈전 단백질인 피브린의 분해를 유도하는 세린프로테아제 (serine protease) 계열의 단백질 분해효소로 알려져 있다 (Collen and Lijnen 2004). 생체내에서 활성화된 피브린 용해 (fibrinolysis) 과정의 조절은, 혈액내에 존재하는 두 억제제 (PAI-1와 α_2 -antiplasmin)에 의해서 조절이 이뤄진다고 알려져 있다. 이중 PAI-1가 생체내에서 t-PA에 특이적으로 결합하는 억제제로 알려져 있다. 기존의 알려진 혈전용해제들 (urokinase와 streptokinase)

에 비하여 t-PA는 혈액에 순환하는 플라스미노겐과 피브리노겐 (fibrinogen)의 농도에는 영향을 최소화하여 부작용이 적은 것으로 알려져 있다 (Collen and Lijnen 2004). 1982년에 t-PA cDNA 유전자가 (2,530 bp) 클로닝되었으며, cDNA에 의해서 유추된 서열에 따라 35개의 아미노산이 제거된다는 사실과 대장균를 이용한 발현이 가능하게 되었다 (Pennica et al. 1983). 인체 유래의 t-PA는 분자량 70 kDa (pI 7-8)의 단일 사슬로 구조로 되어 있으며, 첫 번째 아미노산이 serine으로 시작하는 527개의 아미노산으로 구성되어 있다. t-PA 단백질 구조는 4개의 도메인으로 구성되어 있고, 이들은 피브린 클랏 (fibrin clot)에 특이적 결합을 위해 중요한 도메인 (finger와 kringle 2 domains), 혈관내에 t-PA 제거에 관여하는 도메인 (finger와 epidermal growth factor domains) 및 프로테아제 활성 도메인 (serine protease domain)으로 구성되어 있다.

이러한 t-PA는 melanoma 세포주 (Bowes, RPMI-7272)에서 생화학적·생물학적 특성 분석이 가능할 정도로 충분한 양이 정제된 후,

*Corresponding author Tel 031-299-1693 Fax 031-299-1672
E-mail: bshahn@rda.go.kr

생체내 t-PA의 혈전용해 효과는 토끼를 이용한 폐색전 (pulmonary embolus) 모델실험에서 처음으로 실험이 성공적으로 확인되었다 (Matsuo et al. 1981). 환자를 치료하기 위한 목적으로 대장균 (Manosroi et al. 2001; Kim et al. 2005)과 Chinese hamster ovary (CHO) 세포주 등에 의해서 대량으로 생산되었으며, 또한 효소학적으로 활성이 있는 형태의 t-PA는 *Aspergillus nidulans*, mouse C127 cells, baculovirus-infected insect cells, goat milk와 mouse milk (Ebert et al. 1991; Pittius et al. 1998) 등에서 생산하는 기술이 개발되었다. 현재 상업적 목적을 위해 사용되는 t-PA는 CHO 세포와 대장균에서 생산되고 있다 (Tate et al. 1987; Keyt et al. 1994). 그러나 t-PA의 혈전질환 치료를 포함한 다른 치료분야의 응용을 위한 접목기술 개발을 위하여 t-PA의 더 많은 공급량의 필요성과, 의약품으로써 보다 안전하고, 소비자가 더 저렴하게 이용할 수 있게 하기 위한 새로운 대량생산 시스템을 요구하고 있다.

이러한 문제점의 대안으로 최근에 식물 시스템을 이용한 바이오 의약품 단백질, 산업적으로 이용 가능한 효소, 기능성 이차 대사산물 등을 생산하는 식물 분자 농업 (plant molecular farming)의 연구가 활발히 진행중에 있다. 식물시스템을 이용하여 재조합 단백질을 생산 하려는 목적을 갖는 연구 집단은 전 세계적으로 학교등을 포함한 100여개의 연구집단 및 20여개의 회사에서 연구를 활발히 진행 중이며, 이중 절반에 해당하는 연구집단은 북미 (캐나다와 미국)에 집중되어 있으며, 나머지는 유럽에 1/3정도의 연구집단이 연구를 추진중이며, 국내에서도 산업화를 목적으로 Nexgen사에서 선도적인 연구를 진행중에 있다. 식물 시스템을 이용하여 재조합 단백질 생산관련 연구는 크게 4가지 분야에서 활발히 연구가 진행중이다. 치료 및 진단용 항체 생산, 형질전환 담배에서 immunoglobulin A (Ma et al. 1995, 1998), 충치 예방용 항체 (CaroRx), non-Hogkin's disease, 감기 예방 (ICAM1), 암 치료, respiratory syncytial disease (Rhino RX), 항 간염 B 항체 (Pujol et al. 2005). 인체 및 동물 백신 생산; 설사 유발 미생물 (대장균, 비브리오균)에 대한 heat-labile enterotoxin subunit B, HBsAg 백신 (Kapusta et al. 1999), 자궁 경부 암 유발 바이러스 (Khalsa et al. 2004), 홍역 백신 (Webster et al. 2006), HIV-1 Tat vaccine (Karasev et al. 2005), Coccidiosis 백신 (Guardian Biosciences, Canada), 구제역 백신 (Pan et al. 2008), anthrax 백신 (Brodzik et al. 2005). 바이오의약 (biopharmaceutical) 및 건강식의 (nutraceutical) 단백질 생산; 인체 성장 호르몬 (Barta et al. 1986), interleukin (Einsiedel and Medlock 2005), human intrinsic factor (Horn et al. 2004), lactoferrin (Meristem Therapeutics, 프랑스), α -galactosidase (Planet Biotech, 미국), plasmin (Biolex, 미국), apolipoprotein (Sembiosys, 캐나다). 산업적 이용 목적 효소 생산; 11 개의 재조합 단백질들 (avidin, trypsin, β -glucuronidase, aprotinin, lactoferrin, lysozyme, thyroid-stimulating hormone receptor, Hantaan and Puumala viral antigen, peroxidase, laccase, cellulase) 등이 이미 개발되었거나 상용화되고 있다 (Horn et al. 2004; Howard and Hood 2005; Woodard et al. 2003). 이외도 생분해가 가능한 플라스틱을 위한 polyhydroxybutyrate (Poirier et al. 1992), 거미 명주실 단백질 생산, elastin, collagen

(Scheller et al. 2004; Christou et al. 2004) 등의 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구 결과에서, 우리는 심근경색, 뇌졸중 등의 치료에 중요한 인체 유래 t-PA 유전자들 [알팔파 코돈 이용에 최적화된 합성 유전자, 소포체 (endoplasmic reticulum)에 표적, 6개의 histidine의 부착된 유전자]을 발현하고자, 두 종류의 프로모터 (CaMV 35S와 알팔파 Rbcsk-1A)를 이용하여 알팔파에서 재조합 t-PA와 t-PA 파생 단백질들을 생산하는 기술을 증명하였다. 이러한 결과를 증명하기 위해서 알팔파 잎에서 효소 활성이 있는 t-PA 및 t-PA 파생 단백질이 발현됨을 증명하였고, 알팔파 잎에서 발현된 재조합 t-PA 및 t-PA 파생 단백질들이 동물세포 배양에 의해서 생산된 재조합의 t-PA 단백질과 피브린 분해 활성이 동등함, 단백질들의 분자량이 동물세포 배양에 의해서 생산된 재조합 t-PA 단백질과 유사함, 면역학적 반응에서도 상업적으로 판매되는 t-PA와 유사하다는 특성들을 규명하였다. 본 연구 결과는 기존의 혈전용해제 생산방법에 비하여 생산단가가 매우 저렴하고, 부작용이 없도록 하여 대량생산할 수 있는 기술 개발 및 식물 시스템을 이용하여 인체와 유사한 당쇄 구조를 갖는 의약품 단백질 생산에 접목이 가능하다.

재료 및 방법

식물 형질전환용 발현벡터 제조 및 *Agrobacterium* 형질전환

본 연구에서 t-PA 및 t-PA 파생 단백질들을 발현하기 위해서 사용한 식물 발현 벡터의 프로모터는 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터와 알팔파 Rbcsk-1A 프로모터 (GenBank accession no. X96847)를 이용하였다. CaMV 35S 프로모터를 이용한 발현벡터는 p221a를 이용하였다 (Hahn et al. 2009). t-PA 유전자 및 t-PA 유전자에 소포체 지연서열 (SEKDEL)이 카르복실 말단에 붙어 있는 t-PAER (1,746 bp) 유전자, histidine이 카르복실 말단에 붙어 있는 t-PAHis₆ (1,749 bp) 유전자 또는 합성 t-PA 유전자 (1,728 bp)를 식물 발현 벡터 p221a에 클로닝하기 위해서 다음과 같이 발현 벡터를 제조하였다. 알팔파 유래의 글루코오스 조절 소포체 단백질의 신호서열 및 이와 상보적인 올리고뉴클레오티드를 혼합하여 끓는 물에 5분간 가열하고 상온에서 30분 어닐링 (annealing)하여 이중나선을 형성하도록 하였다. 프라이머 (5'-TCTTACCAAGTGATCTGCAGAG-3')와 프라이머 (5'-CCCAAGCTTTCACGGTTCGCATGTTGTCACG-3')를 이용하여 ATCC 회사에서 구입한 pETPFR (코드번호, 40403)를 주형으로 증폭된 t-PA PCR 산물과 상기에서 이중나선을 형성한 신호서열을 혼합 후 T4 DNA ligase (Takara, 일본)를 이용하여 16°C에서 30분간 배양하여 연결하였다. 그리고 정방향 프라이머 (5'-CGGGGTACCATGAAAATGGAGATGC-ATCAGATC-3')와 역방향 프라이머 (5'-CCCAAGCTTTCACGGTTCGCAT-GTTGTCACG-3')를 사용하여 PCR (반응조건 : 95°C 5분, 1회; 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 2분, 30회; 72°C 7분, 1회)을 실시하여 알팔파 유래의 글루코오스 조절 소포체 단백질의 신호서열과 연결된 t-PA PCR 산물을

얻었다. t-PA PCR 산물을 *Kpn* I과 *Hind* III 로 절단하여 얻은 단편 (알팔파 유래의 글루코오스 조절 소포체 단백질의 신호서열과 연결된 t-PA 유전자)을 p221a 벡터의 *Kpn* I과 *Hind* III 부위 사이에 클로닝하여 p221a-t-PA를 제작하였다. 그런 후 t-PA에 소포체 지연 서열 (endoplasmic reticulum retention sequence)인 SEKDEL을 카르복실 부분에 부착하기 위해서 p221a-t-PA를 주형으로 사용하여 정방향 프라이머 (5'-CGGGGTACCAT-GAAAATGGAGATGCATCAGATC-3')과 역방향 프라이머 (5'-CCCAAGC-TTTTAAAGTTCATCC TTTTCAGACGGTTCGCATGTTGTCACGAATCC-3')를 사용하였고, 6개의 histidine을 카르복실 부분에 추가하기 위해서 정방향 프라이머 (5'-CGGGGTACCATGAAAATGGAGATGCATCAGATC-3')과 역방향 프라이머 (5'-CCCAAG CTTTACACATGATGATGATGATGATGCG-GTCGCATGTTGTCACGAATCC-3')를 사용하여 PCR (반응조건 : 95°C 5분, 1회; 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 2분, 30회; 72°C 7분, 1회)을 하여 알팔파 유래의 글루코오스 조절 소포체 단백질의 신호서열과 연결된 t-PAER과 t-PAHis₆ PCR 산물들을 얻었다. 그런 후 t-PAER과 t-PAHis₆ PCR 산물을 *Kpn* I과 *Hind* III로 절단하여 얻은 단편을 상기 p221a 벡터의 *Kpn* I과 *Hind* III 부위에 클로닝하여 p221a-t-PAER과 p221a-t-PAHis₆를 제작하였다. 또한 알팔파 유래의 글루코오스 조절 소포체 단백질의 신호서열을 포함하는 합성 t-PA 유전자는 염기서열 합성회사 (Entelochon, 독일)에 의뢰하여 이중나선의 단편을 제작하였다. 이를 *Kpn* I과 *Hind* III 로 절단하여 얻은 단편을 상기 p221a 벡터의 *Kpn* I과 *Hind* III 부위 사이에 클로닝하여 p221a-st-PA를 제작하였다. Rbcsk-1A 프로모터는 정방향 프라이머 (5'-GGAATTCAAATAATTA AAAACTACAACAGATGATT-3')과 역방향 프라이머 (5'-CGACGCGTTTTTTTTCTCCCTTACTTAGTTCAC-3')를 이용하여 Rbcsk-1A 프로모터 (1,149 bp) 클로닝 후 염기서열 확인 후 제한효소 *Eco* RI과 *Mlu* I로 35S 프로모터가 제거된 부위에 Rbcsk-1A 프로모터로 치환하여 p221a-rbc 벡터 제조 후 t-PA 및 합성 t-PA 유전자를 이용하여 p221a-rbc-t-PA와 p221a-rbc-st-PA를 제조하였다. p221a-t-PAER, p221a-t-PAHis₆, p221a-st-PA, p221a-rbc-t-PA, p221a-rbc-st-PA 벡터를 동결-해동 (freeze-thaw) 방법으로 *Agrobacterium* EHA105에 도입시켰다.

알팔파 형질전환

합성 t-PA 및 t-PA 파생 유전자들의 발현벡터를 포함하는 *Agrobacterium* EHA105를 이용하여 Austin 등의 방법에 따라 알팔파 어린 잎을 이용하여 형질전환을 실시하였다 (Austin et al. 1995). 형질전환된 알팔파 어린잎으로부터 체세포배를 통하여 재분화된 어린 식물체는 MS 배지에서 배양, 순화 과정을 거친 후, 온실에서 재배하였다. 형질전환체를 구분하기 위하여 유모에 4일 간격으로 0.3% 바스타를 두 번 살포 후 저항성을 갖는 형질전환체를 선별하였다.

Genomic DNA PCR 및 RT-PCR

알팔파 형질전환체 genomic DNA에 t-PA 및 t-PA 파생 유전자들의 삽입 유무를 확인하기 위하여 바스타 처리 후 생존하는 식물체의 잎에서 genomic DNA를 분리하여 PCR을 이용하여 합성 t-PA 유전자 및 t-PA 파생 유전자들의 삽입을 확인하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 전처리 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분간 30회 반복한 다음 72°C에서 7분간 연장 (extension)하였다. p221a-t-PA, p221a-t-PAER, p221a-t-PAHis₆, p221a-rbc-t-PA에 의해 형질전환된 알팔파에서는 정방향 프라이머로 (5'-TCTTACCAAGTGATCTGCAGAG-3')와 역방향 프라이머로 (5'-TCACGGTTCGATGTTGTCACG-3')를 사용하였고, p221a-st-PA, p221a-rbc-st-PA에 의해 형질전환된 알팔파에서는 정방향 프라이머로 (5'-TCCTACCAAGTCATATGTCGAGA-3')와 역방향 프라이머로 (5'-TT-AAGGACGCATATTGTCACGTAT-3')를 사용하였다.

Total RNAs는 형질전환된 알팔파 잎 (200 mg)에서 제조회사의 방법에 따라 TRIzol reagent를 이용하여 정제하였다 (Invitrogen, Breda, Netherlands). Reverse transcription (RT)-PCR 분석을 하기위해서, total RNA는 DNase 처리 후 다음과 같이 RT-PCR을 실행하였다. 반응물은 50°C에서 30 min 반응 후 94°C에서 2 분간 reverse transcriptase의 활성을 억제 하였다. 그런 후 RT 반응물을 이용하여 PCR 반응을 다음과 같은 조건으로 실행하였다. 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 그리고 72°C 2 분간 30회 실행하였다. 반응 후 72°C에서 10분간 1회 실행하여 반응을 완결하였다. 증폭하기 위해서 사용된 프라이머는 PCR에서 이용된 것을 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% 아가로스 젤을 이용한 전기영동 후 관찰하였다.

ELISA

PCR 분석으로 확인된 형질전환체 중 그룹별 8-27개의 알팔파 형질전환체를 대상으로 재조합 t-PA 및 t-PA 파생 단백질들의 항원력 검증과 발현양을 측정하고자 ELISA를 실시하였다. 수용성 t-PA ELISA 키트(CalBiochem, 독일)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 형질전환체내의 재조합 t-PA 및 t-PA 파생 단백질들의 발현양을 측정하였다. ELISA 키트를 이용하여 PBS-0.5% Tween 20로 추출된 시료 1 µg/100 µl와 상온에서 1시간 반응 후, PBS-0.5% Tween 20으로 3회 세척 후, HRP (horseradish peroxidase)가 붙어 있는 이차 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응 후, PBS-0.5% Tween으로 3회 세척 후, 100 µl의 TMB (tetramethyl-benzidine)를 처리 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fibrinolytic activity 분석

알팔파 형질전환체에서 재조합 t-PA 및 t-PA 파생 단백질들의 피브리린 분해활성을 측정하고자 피브리린 플레이트법 (fibrin-plate method)을 이용하여 재조합 효소들의 피브리린 분해능을 측정하였다 (Astrup and Mullertz 1952). 0.8%의 피브리노젠 (fibrinogen) 용액 40 ml과 5 units의 트롬빈을 혼합한 후 플레이트에 붓고 30분간 상온에 방치

하여 피브린을 형성시켰다. ELISA 결과 단백질 함량이 높은 형질 전환체 각각 13-32개의 알팔파 형질전환체를 대상으로 PBS-0.5% Tween 20 추출물 1 µg을 점적한 후 습도가 높은 37°C 배양기에서 하룻밤 방치한 후 피브린 분해활성을 용해된 부분의 직경으로 표시하였다.

Western blot 분석

발현된 재조합 단백질의 발현 여부 및 분자량을 측정하고자 t-PA에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하였다. 형질전환체 시료 200 mg에 완충용액 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) 0.5 ml을 넣고 4°C에서 60분간 방치하여 균질화한 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 분리하였다. 분리된 단백질을 Bradford 방법으로 정량한 후, 50 µg의 단백질을 Western blot 분석에 사용하였다. 1차 항체로는 t-PA에 대한 polyclonal 항체 (Abcam, 미국)를 사용하여 하룻밤 동안 4°C에서 배양하였고, PBS-0.2% Tween 20 용액으로 5회 세척한 후, HRP가 붙어 있는 이차 항체 (Pierce, 미국)와 상온에서 2시간 배양 후 5회 세척하였으며 마지막으로 ECL (enhanced chemiluminescence) 용액을 이용하여 X-ray 필름에 감광시켜 발현을 확인하였다.

결과 및 고찰

알팔파 형질전환체 확인

알팔파 유래의 글루코오스 조절 소포체 단백질의 신호서열과 합성 t-PA 유전자 (1,728 bp), t-PAER 유전자 (1,746 bp)와 t-PAHis₆ 유전자 (1,749 bp)를 발현벡터들 (p221a와 p221a-rbc)에 클로닝 하였다 (Fig. 1). 합성 t-PA 유전자, t-PAER 유전자와 t-PAHis₆ 유전자들을 각각 35S 프로모터와 Rbcsk-1A 프로모터, 35S 터미네이터에 의해서 발현 및 mRNA의 안정성을 유도하였다. 알팔파 형질전환체 내에서 발현양을 증가시키기 위해서 TEV leader sequence를 35S 프로모터 아래에 삽입하였다 (Fig. 1). 알팔파의 잎 절편은 p221a-t-PA, p221a-st-PA, p221a-t-PAHis₆, p221a-t-PAER, p221a-rbc-t-PA, p221a-rbc-st-PA 발현벡터들로 형질전환된 *A. tumefaciens*를 이용하여 형질전환을 실시하였다 (Fig. 2 A). 제조제에 저항성을 나타내는 조직을 선별하기 위해서, 형질전환된 잎 절편을 PPT (4 mg/L)가 들어 있는 배지위에서 배양하였다. 대조군으로 야생종 알팔파 잎 절편들을 같은 배지위에서 배양하였다. 형질전환된 조직은 체세포 배 발생 (Fig. 2 B)을 통하여 정상적인 잎과 뿌리를 갖는 식물체로 재분화하였다 (Fig. 2 C). 어린 식물체는 뿌리 증식 후, 순화 단계를 거쳐 온실에서 증식하였다 (Fig. 2 D, E). 그런 후 PPT에 대한 저항성을 검증하기 위해서 0.3% Basta 용액으로 분사 후, 생존 여부 및 PAT 유전자 발현을 검증하였다 (Fig. 2 F). 일주일 후 정상적인 성장을 나타내는 잠정적인 형질전환체를 선별할 수 있었다. 대조적

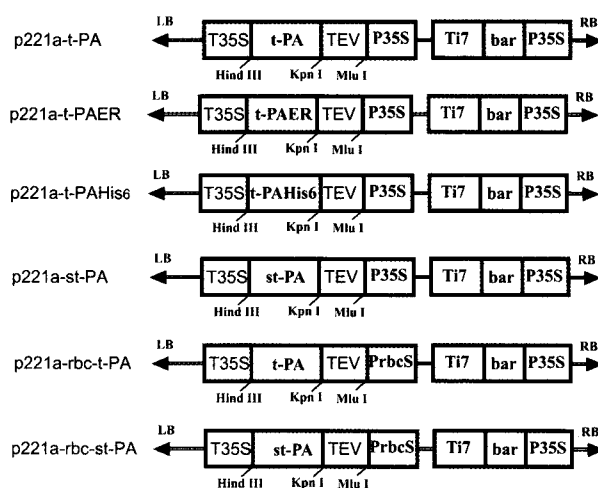


Figure 1. Structure of the T-DNA region of the binary vectors (p221a-t-PA, p221a-st-PA, p221a-t-PAHis₆, p221a-t-PAER, and p221a-rbc-t-PA p221a-rbc-st-PA) constructed for the expression of t-PA and its derivatives. The expression cassettes for t-PA, its derivatives and PAT are located between the left and right T-DNA borders (LB, RB). Transcription of t-PA and its derivative genes is driven by the cauliflower mosaic virus 35S (P35S)/or Rbcsk-1A promoter and the tobacco etch virus 5'-untranslated region (TEV) mediates enhancement of translation initiation. The 3' UTR and polyadenylation signal of cauliflower mosaic virus 35S T35S lie 3' of t-PA, synthetic t-PA and its derivative genes

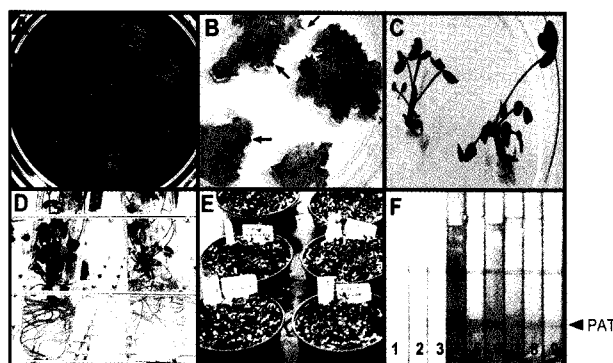


Figure 2. Production of transgenic alfalfa plants with *A. tumefaciens* EHA105. Transgenic plants were regenerated from alfalfa young leaf on selection medium containing 4 mg/L PPT. A. young leaves were wounded with a scalpel and were infected by *A. tumefaciens* EHA105 with the binary vectors on B5 medium containing hormones without antibiotics in dark for 2 days after infection. B. Induction of somatic embryos on transformed young leaves 5-8 weeks after infection with *A. tumefaciens* EHA105 containing the binary vectors. C. Shoot elongation of PPT-resistant plantlets. D. Root elongation. E. The acclimatization of young plants in greenhouse. F. Lateral flow test were performed by using a Trait LL lateral flow test kit. Lane 1 is untransformed plant. Lanes 2-9 are the transgenic alfalfa

으로 사용된 야생종 알팔파 및 비형질전환체는 말라 죽었다. 추가적으로 두 번의 Basta 처리 후에, 각각 유전자별로 16-32개의 잠정적인 형질전환체를 생화학적 및 분자생물학적 특성 규명을 하기

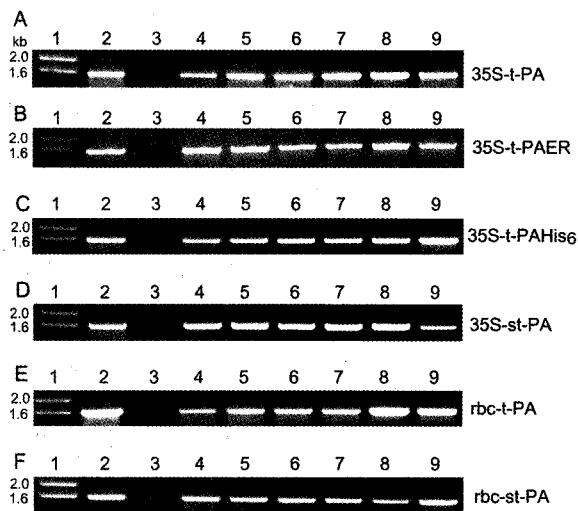


Figure 3. Detection of the t-PA and its derivatives genes in putative transgenic plants leaf tissues using PCR. Genomic DNA (500 ng) from transformed alfalfa plants was used to demonstrate the insertion of the t-PA and its derivatives genes into plant chromosomal DNA by PCR. Lane 1 is standard molecular marker. Lane 2 is the binary vectors used for transformation of young leaves. Lane 3 is untransformed plant genomic DNA used as a negative control. Lanes 4 to 9 are transformed plant genomic DNAs exhibiting the 1.6-kb t-PA genes in the transformed plant genomic DNA

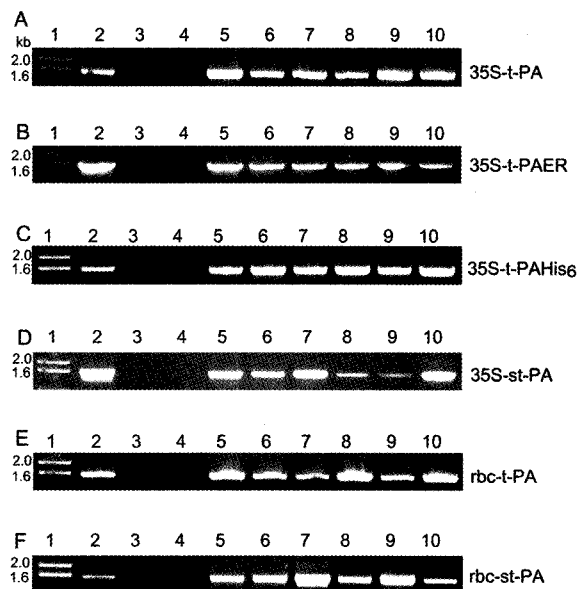


Figure 4. Detection of the transcriptions of the t-PA and its derivatives genes in putative transgenic plants using RT-PCR. Plant RNA was isolated from selected transgenic plant leaf tissues and RT-PCR was performed with a pair of primers that specifically amplified a DNA fragment of 1,6 kb of the t-PA and its derivatives genes (lanes 5 to 10). Lane 1 is standard molecular marker. lane 2 is the binary vectors served as the positive control for the PCR. Lane 3 shows the PCR directly performed on the extracted RNA, in order to demonstrate the absence of specific endogenous plant DNA and lane 4 corresponds to the RNA of non-transgenic plants used as a negative control

위해서 선발하였다. 모든 식물체는 대조군으로 사용된 야생종과 동등한 성장속도와 증자생성에 차이가 없었다. 또한 영양변식을 통한 세대 진전 후 제초제 저항성과 t-PA의 특성이 전달되는 것을 확인 할 수 있었다.

형질전환체 분자생물학적 분석

t-PA 및 파생 유전자 삽입 및 전사 확인

알팔파 형질전환체의 genomic DNA내에 t-PA 유전자들의 삽입 유무를 확인하기 위해서 PCR 증폭을 실시하였다. 실험방법에 명시된 t-PA 유전자 전반을 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 이용하였다. 잠정적인 형질전환체에서 기대했던 1.6 kb의 크기의 band를 확인할 수 있었고 (Fig. 3A-3F, lanes 4-9), 형질전환에 사용된 발현벡터들 (p221a-t-PA, p221a-t-PAER, p221a-t-PAHis₆, p221a-st-PA, p221a-rbc-t-PA, p221a-rbc-st-PA)을 주형으로 사용한 결과 형질전환체에서 확인된 것과 같은 크기의 1.6 kb의 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3A-3F, lane 2). 이러한 실험은 t-PA 유전자 삽입을 확인하기 위해서 2번의 반복 실험을 시행하였다. 음성 대조군으로 야생종 알팔파를 사용하여 RCR 증폭을 실시한 결과 t-PA 유전자에 상응하는 band를 확인할 수 없었다 (Fig. 3A-3F, lane 3). 확인된 알팔파 형질전환체들은 생화학적 분석을 위해서 온실에서 증식하였다.

알팔파 형질전환체내의 전체 RNA중에 t-PA 특이 RNA의 전사 유무를 측정하고자 RT-PCR을 실시한 결과, t-PA에 특이적인 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 4, lanes 5-10). 또한 각각의 발현 벡터를 이용하여 PCR실험 결과, 1.6 kb의 크기의 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 4A-4F, lane 2). 음성 대조군으로 야생종 알팔파를 사용하여 RT-PCR 증폭을 실시한 결과 t-PA 유전자에 상응하는 band를 확인할 수 없었다 (Fig. 4A-4F, lane 3). 또한 RNA 시료에 t-PA 특이 유전자가 오염되어 있는지 알아보기 위해서 DNase로 처리된 시료를 사용하여 PCR을 실시한 경우에서도 t-PA에 상응하는 band를 볼 수 없었다 (Fig. 4A-4F, lane 4).

재조합 t-PA 및 파생 단백질들의 생화학적 분석

재조합 단백질 발현량 측정

알팔파 형질전환체 잎의 추출물내에 재조합 t-PA 및 t-PA 파생 단백질들의 전체 수용성 단백질내의 재조합 t-PA 단백질의 항원력 및 발현량을 측정하기 위해서 ELISA를 실시하였다. 결론적으로 8-27개의 알팔파 형질전환체의 추출물은 측정 가능한 재조합 t-PA 단백질 발현량을 나타내었다. 알팔파 형질전환체별 평균 발현량은 39.5 (p221a-t-PA), 30.1 (p221a-t-PAER), 17.3 (p221a-t-PAHis₆), 23.1 (p221a-st-PA), 9.7 (p221a-rbc-t-PA), 11.8 (p221a-rbc-st-PA) µg/TSP (mg)로 측정되었다 (Fig. 5). 가장 높은 발현량은 p221a-t-PAER 유전자로 형질전환된 식물체 추출물에서 75.1 µg/TSP (mg)로 발현됨

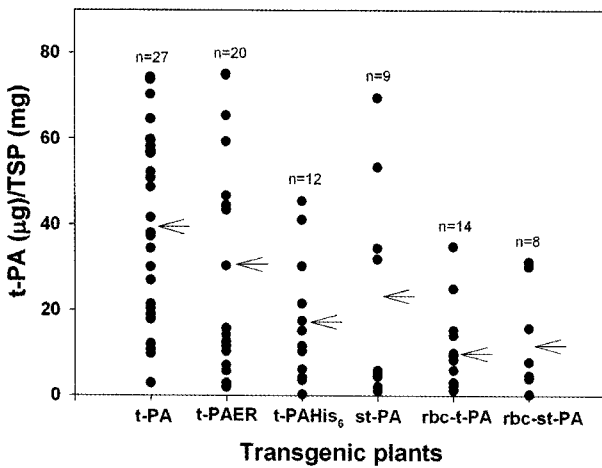


Figure 5. ELISA sandwich assay. Ten micrograms of total soluble protein from plant leaf tissues was used for ELISA. Vertical point plot shows the expression amount of t-PAs and the selected transgenic plants. The arrows point to the mean expression level of t-PA and its derivatives (t-PA, t-PAER, t-PAHis₆, st-PA, rbc-t-PA, and rbc-st-PA), respectively

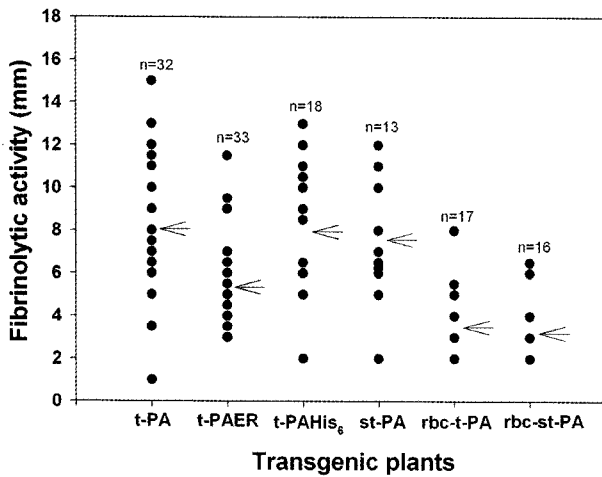


Figure 6. Fibrinolysis of recombinant t-PA and its derivatives in selected transgenic plants. Ten micrograms of total leaf proteins from transgenic alfalfa plants was spotted onto plate containing the fibrin polymerized by thrombin. Vertical point plot shows the fibrinolytic activity of crude extracts and the selected transgenic plants. The arrows point to the mean fibrinolytic activity of t-PA and its derivatives (t-PA, t-PAER, t-PAHis₆, st-PA, rbc-t-PA, and rbc-st-PA), respectively

을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 알팔파 형질전환체 앞에서 재조합 t-PA 단백질의 평균 발현량은 전체수용성 단백질 중 9.7-39.5 µg/TSP (mg)로 발현됨을 확인할 수 있었다. 35S 프로모터를 이용한 경우가 Rbcsk-1A를 이용한 경우보다 재조합 t-PA 발현량이 높게 나타났다. 그러나 기대하였던 합성 유전자를 이용했을 때는 합성전과 크게 차이를 보이지 않았다. 발현량의 순서는 p221a-t-PA > p221a-t-PAER > p221a-st-PA > p221a-t-PAHis₆ > p221a-rbc-st-PA > p221a-rbc-t-PA로 나타났다. 반면 대조군으로 야생형 알팔파 추출물에서

는 재조합 t-PA 단백질 발현량을 나타내는 흡광도를 관찰할 수 없었다. 이러한 재조합 t-PA 단백질 발현량은 식물시스템을 이용한 재조합 단백질 발현관련 문헌에 보고된 전체 수용성 단백질 중 0.002-7% 발현량과 비교하면 낮은 발현량의 경우와 유사한 결과를 나타내었다. 발현량이 상대적으로 낮게 나타난 이유는 식물체 내에 존재하는 프로테아제의 절단에 의한 t-PA 단백질의 분해에 의한 것으로 생각된다.

피브리린 용해 활성 측정

알팔파 형질전환체 추출물의 피브리린 클라트를 용해하는 피브리린 용해활성은 약간 변형된 피브리린 플레이트법 방법에 의해서 실시하였다. 피브리린 클라트의 용해능력은 6가지 발현벡터로 형질전환된 알팔파 형질전환체 추출물에서 각각 평균 8.1 (p221a-t-PA), 5.3 (p221a-t-PAER) 7.9 (p221a-st-PA), 7.5 (p221a-t-PAHis₆), 3.5 (p221a-rbc-st-PA), 3.2 (p221a-rbc-st-PA) cm를 얻을 수 있었다 (Fig. 6). 섬유소 분해활성 정도는 발현벡터에 따라 p221a-t-PA > p221a-t-PAHis₆ ≥ p221a-st-PA > p221a-t-PAER > p221a-rbc-t-PA ≥ p221a-rbc-st-PA로 확인되었으며, 35S 프로모터를 이용한 경우가 Rbcsk-1A를 이용한 경우보다 재조합 t-PA 섬유소 분해활성이 높게 나타났다. 그러나 기대하였던 합성 유전자를 이용했을 때는 합성전과 크게 차이를 보이지 않았다. 또한 p221a-t-PA, p221a-t-PAHis₆, p221a-st-PA로 형질전환된 세그룹의 섬유소 분해활성 능력은 오차 범위내에서 보면 유사하였다. 또한 p221a-rbc-t-PA과 p221a-rbc-st-PA로 형질전환된 형질전환체에서는 섬유소 분해활성에는 별 차이가 없었다. 특이한 점은 ELISA 결과와 다르게 p221a-t-PAER로 형질전환된 알팔파 형질전환체에서 섬유소 분해활성이 p221a-t-PAHis₆로 형질전환된 군보다 낮게 나타났다. 이유로는 ER내에서 재조합 단백질이 세포내질 내에 존재하는 프로테아제의해서 안정성을 갖아 양적으로는 높게 나타났으나 (Benchabane et al. 2008) 소포체 지연 서열로 인한 t-PA활성에는 영향을 미치는 것으로 생각된다. 대조군으로 사용된 야생형 알팔파 추출물에서는 하룻밤 배양 후에도 섬유소 분해활성을 나타내지 않았다. 이러한 재조합 t-PA 및 t-PA 파생 단백질들의 피브리린 분해 활성은 ELISA를 이용한 단백질 발현량과 유사한 결과를 나타내었다.

재조합 단백질 분자량 측정

알팔파 형질전환체로부터 추출된 전체 수용성 단백질 (TSP, 50 µg)을 분리하기 위해서 12% SDS-PAGE를 실시하였다. 그런 후에 정제된 t-PA에 대해서 양으로 부터 생성된 항체를 사용하여 immunoblot 분석을 실행하였다. 6가지 발현벡터로 형질전환된 알팔파으로부터 추출한 전체 수용성 단백질에서 기대하였던 65 kDa의 band를 확인하였다 (Fig. 7, lanes 3-8). 또한 상업적으로 판매되는 t-PA의 분자량도 위의 6가지 발현벡터에 의해서 발현된 재조합 t-PA 단백질들과 유사한 결과를 나타내었다. 반면 대조군으로 사

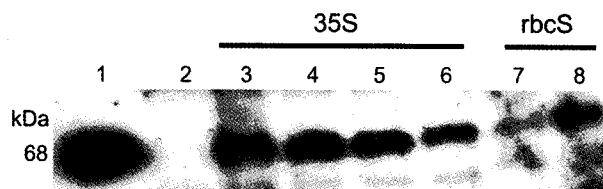


Figure 7. Western blot analysis of selected transgenic plant leaf tissues. Fifty micrograms of total soluble protein from plant leaf tissues was separated on an analytical discontinuous SDS-PAGE gel (12%), transferred to a 0.45- μ m PVDF membrane and incubated with sheep anti-t-PA serum and rabbit anti-sheep horseradish peroxidase conjugate as primary and secondary antibodies, respectively. Lane 1 is the recombinant protein from animal cells. Lane 2 is a negative control. Lanes 3-8 are selected transgenic plants (t-PA, t-PAER, t-PAHis₆, st-PA, rbc-t-PA, and rbc-st-PA)

용된 야생종 알팔파 추출물에서는 t-PA 단백질에 상응하는 어떠한 band도 관찰되지 않았다 (Fig. 7, lane 2). 또한 immunoblot 분석에서 21 and 31 kDa의 단백질 band들이 관찰되었으며, 이러한 결과는 식물 시스템을 이용한 효소와 항체 단백질 발현 실험들에서 흔히 나타나는 식물체 내에 존재하는 프로테아제의 의한 발현 단백질의 분해 결과 (Stevens et al. 2000; Outchkourov et al. 2003)와 유사함을 나타내었다.

적 요

의료용 단백질로 중요한 인체 혈관 내피세포 유래 t-PA를 알팔파 식물체를 이용하여 생산하는 기술을 개발하였다. 식물체에서 발현된 t-PA는 동물세포에서 생산된 t-PA와 동등한 시험관 내의 인공 혈전 용해 활성 및 생화학적 특성에서 유사함을 가지고 있었다. 본 연구에서는 식물체에서 발현되는 t-PA 단백질의 알팔파 코돈 이용에 최적화된 합성 유전자이용 양적 증대, 소포체에 표적에 따른 발현양 증대, 6개의 histidine의 부착에 따른 정제의 효율성을 고려하였고 두 종류의 프로모터 (CaMV 35S와 알팔파 Rbcsk-1A)를 이용하여 t-PA 및 파생 단백질들의 발현 효율을 비교 확인하고자 6가지의 식물발현 벡터를 제작하였다. 0.3%의 제조제 살포 후에 저장성을 갖는 알팔파 식물체들의 t-PA 유전자 및 파생 유전자의 genomic DNA내의 삽입 유무는 PCR법을 활용하여 t-PA, 파생 유전자 및 합성 유전자의 크기에 해당하는 1.6 kb의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 6가지 발현벡터로 형질전환된 알팔파 잎 추출물에서 전체 수용성 단백질내의 t-PA 및 파생 단백질의 평균 발현량은 9.7-39.5 μ g/TSP (mg)로 측정되었다. 이중 p221a-t-PAER 발현벡터로 형질전환된 알팔파의 잎 추출물에서 가장 높은 75.1 μ g/TSP (mg)의 발현량을 나타냈다. 알팔파 잎에 발현된 재조합 t-PA 분자량은 상업적으로 판매되는 t-PA와 동일한 68 kDa으로 확인되었다. 형질전환된 알팔파 잎 추출물들의 평균 피브리노 용해활성은 3.2-8.1 cm를 나타내었다. 또한 t-PA 및 그의 파생 단백질을 발현하는 알팔파 식물체는 야생종 알팔파와 비교했을 때 성장에 있어서 별 다른 차이를 보이지 않았다.

인용문헌

- Almquist KC, McLean MD, Niu Y, Byrne G, Olea-Popelka FC, Murrant C, Barclay J, Hall JC (2006) Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. *Vaccine* 24:2079-2086
- Astrup T, Mullertz S (1952) The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40:346-351
- Austin S, Bingham ET, Mathews DE, Shahan MN, Will J, Burgess RR (1995) Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese dependent lignin peroxidase. *Euphytica* 85(1-3):381-393
- Barta A, Sommengruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke M, Matzke A (1986) The expression of a napoline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol* 6:347-357
- Benchabane M, Goulet C, Rivard D, Faye L, Gomord V, Michaud D (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnology J* 6:633-648
- Brodzik R, Bandurska K, Deka D, Golovkin M, Koprowski H (2005) Advances in alfalfa mosaic virus-mediated expression of anthrax antigen in planta. *Biochem Biophys Res Commun* 338:717-722
- Christou P, Stoger E, Twyman RM (2004) Monocot expression systems for molecular farming. Fischer R, Schillberg S (eds), *In Molecular Farming: Plant-Made Pharmaceuticals and Technical Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp 55-67
- Collen D, Lijnen HR (2004) Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *J Thromb Haemost* 2:541-546
- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K (1991) Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)* 9: 835-838
- Einsiedel EF, Medlock J (2005) A public consultation on plant molecular farming. *AgBioForum* 8:26-32
- Hahn BS, Sim JS, Kim HM, Ahn MY, Pak HK, Kim NA, Kim YH (2009) Expression and characterization of human tissue-plasminogen activator in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol Rep* DOI 10.1007/s11105-008-0075-y.
- Hom ME, Woodard SL, Howard JA (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep* 22:711-720
- Howard JA, Hood E (2005) Bio-industrial and biopharmaceutical products produced in plants. *Adv Agron* 85:91-123
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniowski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13:1796-1799
- Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M (2005) Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* 23:1875-1880
- Keyt BA, Paoni NF, Refino CJ, Berleau L, Nguyen H, Chow A, Lai J, Pena L, Pater C, Ogez J, Etchevery T, Botstein D, Bennet

- WF (1994) A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3670-3674
- Khalsa G, Mason HS, Arntzen CJ (2004) Plant-derived vaccines: progress and constraints. Fischer R, Schillberg S (eds), In *Molecular Farming: Plant-Made Pharmaceuticals and Technical Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp 135-158
- Kim JY, Fogarty EA, Lu FJ, Zhu H, Wheelock GD, Henderson LA, DeLisa MP (2005) Twin-arginine translocation of active human tissue plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71:8451-8459
- Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268:716-719
- 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
- Manosroi J, Tayapiwatana C, Gotz F, Werner RG, Manosroi A (2001) Secretion of active recombinant human tissue plasminogen activator derivatives in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 67:2657-2664
- Matsuo O, Rijken DC, Collen D (1981) Thrombolysis by human tissue plasminogen activator and urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus. *Nature* 291(5816):590-591
- Outchkourov NS, Rogelj B, Strukelj B, Jongsma MA (2003) Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant Physiol* 133:379-390
- Pan L, Zhang Y, Wang Y, Wang B, Wang W, Fang Y, Jiang S, Lv J, Wang W, Sun Y, Xie Q (2008) Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 121:83-90
- Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301(5897):214-221
- Poirier Y, Dennis DE, Klomparens K, Somerville C (1992) Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* 256:520-523
- Pittius CW, Hennighausen L, Lee E, Westphal H, Nicols E, Vitale J, Gordon K (1998) A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5874-5878
- Pujol M, Ramirez NI, Ayala M, Gavilondo JV, Valdes R, Rodriguez M, Brito J, Padilla S, Gomez L, Reyes B, Peral R, Perez M, Marcelo JL, Mila L, Sanchez RF, Rolando P, Cremata JA, Enriquez G, Mendoza O, Ortega M, Borroto C (2005) An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine* 23:1833-1837
- Scheller J, Henggeler D, Viviani A, Conrad U (2004) Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res* 13:51-57
- Stevens LH, Stoopen GM, Elbers IJ, Molthoff JW, Bakker HA, Lommen A, Bosch D, Jordi W (2000) Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 124:173-182
- Tate KM, Higgins DL, Holmes WE, Winkler ME, Heyneker HL, Vehar GA (1987) Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 26:338-343
- Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh, SL (2006) Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine* 24:3538-3544
- Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, Barker DK, Love RT, Lane JR, Delaney DE, McComas-Wagner JM, Mallubhotla HD, Hood EE, Dangott LJ, Tichy SE, Howard JA (2003) Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol Appl Biochem* 38:123-130

(접수일자 2009년 2월 24일, 수리일자 2009년 3월 6일)