

엽록체 형질전환 유래 분자 농업의 연구 동향

민성란 · 정원중 · 김석원 · 이정희 · 정화지 · 유장렬

Current status on plant molecular farming via chloroplast transformation

Sung Ran Min · Won Joong Jeong · Suk Weon Kim · Jeong Hee Lee · Hwa-Jee Chung · Jang R. Liu

Received: 6 August 2010 / Accepted: 20 August 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Chloroplast transformation in higher plants offers many attractive advantages over nuclear transformation, including a high-level accumulation of foreign proteins, multi-gene expression in single transformation event via transgene stacking in operons and no position effect due to site-specific integration of transgenes by homologous recombination. Most importantly, chloroplast transgenic plants are eco-friendly because their transgenes are maternally inheritance in most crop plants. However, chloroplast transformation system has limited success in crops alike nuclear transformation. In the past two decades, great progress has been made to overcome the limitations of chloroplast transformation, thus expanding chloroplast bioreactor to several important crops including soybean, carrot, lettuce, and oilseed. Therefore, it has become possible that chloroplast transformation of crops can be used not only for the improvement of agronomic traits, but also for the production of vaccines and high valuable therapeutic proteins in pharmaceutical industry.

서론

식물이 의료용 및 산업용 단백질의 대규모 생산 시스템으로 특히 매력적인 이유는 기존의 확립되어 있는 전통적인 농업기반을 이용하여 쉽게 수확, 가공할 수 있으므로 원하는 바이오매스의 대량 확보가 가능하기 때문이다. 최근에 식물을 단순히 식량자원의 소재로 보는 농업적 응용보다는 식물이 가지는 다양한 산업 소재로서의 기능을 이용하여 고부가가치 유용 재조합 단백질의 생산을 위한 바이오리액터 (bioreactor)로서 관심이 집중되고 있다. 이와 같이 유전자 재조합 기술을 이용하여 재조합 치료용 단백질, 효소, growth factor 및 백신 등을 생산하는 공장으로서의 식물을 이용하는 산업을 식물 분자농업 (plant molecular farming) 또는 바이오파밍 (biopharming)이라고 한다.

식물형질전환을 통하여 백신, 항체, 항암제 등 유용 재조합 단백질 등 고부가성 의료용 단백질 생산 연구가 점차 확대되고 있다. 특히, 엽록체 형질전환 시스템을 이용한 분자농업이 빠른 속도로 발달하면서 식물 분자농업의 주축이 되고 있다. 고등식물의 엽록체 발현 시스템이 분자농업의 대안으로 떠오르는 이유는 도입유전자의 발현 수준을 획기적으로 높일 수 있는 엽록체 게놈의 배수성 (polyploidy)에 기인한다 (Verma and Daniell 2007). 하나의 엽록체에는 약 100 카피의 유전자를 가지므로, 일반적으로 1-2 카피 유전자를 가지는 핵 형질전환에 비해, 외래 유전자의 발현 수준을 획기적으로 증대시킬 수 있다 (De Cosa et al. 2001). 또한, 피자식물의 색소체는 대부분 모계 유전 (Hagemann 2004)을 하므로, 형질전환 작물을 포장재 배시 발생할 수 있는 꽃가루를 통한 외래유전자의 생태계 야생종으로의 수평 이동 가능성을 근원적으로 차단할 수 있어 환경 친화적이다 (Daniell 2002, 2007). 상동 재조합 (homologous recombination) 방식으로 엽록체 게놈에 유

S. R. Min · W. J. Jeong · J. H. Lee · J. R. Liu (✉)
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center)
e-mail: jrliu@kribb.re.kr

S. W. Kim
미생물자원센터
(Microbial Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

H.-J. Chung
(주) 젠닥스
(GenDocs Inc., 544-1 Bongmyung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-301, Korea)

전자가 도입되기 때문에 핵 형질전환시 자주 발생하는 위치효과 (position effect) (Daniell et al. 2002), 유전자 침묵 (gene silencing) (Lee et al. 2003; De Cosa et al. 2001)이 없어 외래유전자 발현이 용이하다. 더욱이 엽록체는 원핵세포 유래 소기관이므로 다수의 외래유전자를 오픈된 형태로 엽록체 게놈에 동시 발현이 가능하다.

식물의 세포내소기관인 색소체는 광합성을 수행하는 엽록체 (chloroplast), 전분 저장에 관여하는 전분체 (amyloplast), 카르티노이드계 색소를 나타내는 유색체 (chromoplast) 및, 색소를 함유하지 않은 백색체 (leucoplast) 등으로 구분되며 아미노산, 지방산, 색소의 생합성 장소 및 황, 질소대사 (Verma and Daniell 2007) 등의 기능을 가진다. 이러한 색소체는 원시 남세균의 사이에 내공생 (endosymbiosis)의 결과로 진핵세포에 갇힌 광합성 원핵생물 유래로 이해되고 있으며, 자신만의 genetic system과 게놈을 가지고 있다. 육상식물의 엽록체 게놈은 원형으로 된 120-150 kb 크기로 110-120개의 유전자를 가지며 엽육세포 하나에 많게는 100여개의 엽록체가 존재하여 엽육세포당 대략 1,000-10,000 카피의 엽록체 게놈이 존재한다 (Bendich 1987). 1988년, 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*의 엽록체 형질전환 연구 (Boynton et al. 1988)를 시작으로 담배를 이용한 고등식물의 엽록체 형질전환 시스템이 확립 (Svab et al. 1990)된 이래 애기장대 (Sikdar et al. 1998), 감자 (Sidorov et al. 1999), 벼 (Khan and Maliga 1999), 토마토 (Ruf et al. 2001), 페튜니아 (Zubko et al. 2004), 포플러 (Okumura et al. 2006), 양배추 (Liu et al. 2007), 가지 (Singh et al. 2010) 등과 같은 다양한 작물에서 엽록체 형질전환이 보고되었다. 최근 엽록체 형질전환의 모델식물인 담배이외에 경제적으로 중요 작물인 콩, 당근, 상추 및 유채 (Dufourmantel et al. 2004; Hou et al. 2003; Kumar et al. 2004; Ruhlman et al. 2007) 등에서 재조합 단백질 생산을 위한 바이오리액터로서 엽록체 형질전환이 활발히 이용되고 있다 (Wang et al. 2009).

저자들은 고등식물의 엽록체 형질전환 장점을 인식하면서 (Chung et al. 2006) 엽록체 형질전환 연구를 수행하여 왔다. GFP 단백질을 *Nicotiana tabacum*과 *Nicotiana benthamiana* (Jeong et al. 2004; Davarpanah et al. 2009), human serum albumin (HSA) 및 human β -site APP cleaving enzyme (BACE)을 담배에서 발현, 생산 하였다 (Ko et al. 2006; Youm et al. 2010). 또한, 이차 상동 재조합을 방지하는 색소체 형질전환 벡터 (Liu et al. 2006)를 개발하여, 현재 남세균 및 원핵생물 유래 광합성 관련 유전자 등의 여러 유용 유전자들을 담배 및 감자 엽록체에 도입하여 형질전환체의 특성분석을 수행하고 있다. 본 논문에서는 고등식물의 엽록체 발현 형질전환 시스템을 이용하여 현재까지 개발된 농업적 형질, 의약품 및 백신 연구 사례를 중심으로 서술하고자 한다.

고등식물의 엽록체 발현 시스템

엽록체 형질전환 방법

금 또는 텅스텐 입자에 코팅시킨 DNA를 유전자 총을 이용하여 직접 식물체내로 도입시키는 엽록체 형질전환 방법 (biolistic = biological + ballistic)이 1988년 *Chlamydomonas reinhardtii*에서 처음으로 성공 (Boynton et al. 1988)한 이래 높은 형질전환 효율과 간편한 사용법으로 인해 현재 고등식물의 엽록체 형질전환에 보편적으로 사용되고 있다.

엽록체 형질전환 벡터 시스템

핵 형질전환과 달리 엽록체 형질전환은 상동 재조합에 의해 외래 유전자가 위치 특이적으로 엽록체 게놈에 삽입되므로, 효율적인 상동 재조합을 위해서는 외래 유전자의 양측에 엽록체 게놈 서열과 동일한 약 1-2 kb 크기의 flanking sequence를 포함하도록 엽록체 발현 벡터를 제작한다. 현재까지 외래 유전자가 삽입된 엽록체 게놈의 intergenic region은 16곳이 보고되었고 (Maliga 2004), 특히 *trnV-3'rps12*, *trnI-trnA*, *trnM-trnG* 세가지 부위가 주로 이용되며, 다니엘 연구실에서 개발된 *trnI-trnA* 부위 (Daniell et al. 1998)가 재조합 단백질을 생산하는 연구에 가장 많이 이용되고 있다.

엽록체 게놈은 수많은 카피로 존재하므로 형질전환체를 얻기 위해서는 선발마커 유전자의 선택이 결정적으로 중요하다. 초기 엽록체 형질전환에 사용된 선발마커로는 항생제 스펙티노마이신에 내성을 부여하도록 point mutation이 있는 16S rRNA (*rrn16*)를 사용하였으나 선발 빈도가 매우 낮은 단점 (Svab et al. 1990)을 지녔다. 반면, *aadA* (aminoglycoside 3'-adenyltransferase) 유전자에 의한 스펙티노마이신 저항성은 현재 사용하는 엽록체 형질전환 선발마커 중 가장 효율적인 시스템으로 알려져 있다 (Svab and Maliga 1993). 그 외에 항생제 카나마이신 저항성 유전자인 *nptII* 유전자 (Carrer et al. 1993), 독성물질인 betaine aldehyde를 비독성 물질인 glycine betaine으로 전환시켜주는 효소인 BADH (betaine aldehyde dehydrogenase) 유전자 (Daniell et al. 2001b)가 사용되었으며, 항생제 저항성 유전자와 *gfp* (green fluorescent protein) 유전자를 동시에 사용하기도 하였다 (Maliga 2004; Jeong et al. 2004).

엽록체에서 유전자 발현수준을 결정짓는 필수적인 요건은 프로모터, 5'-UTR (untranslated region) 조절 부위 (Gruissem and Tonkyn 1993), 터미네이터가 포함된 3' 조절 부위 (Maliga 2004)이며, ribosomal binding site (RBS)가 포함된 5'-UTR 부분 또한 엽록체 형질전환 벡터의 중요한 요소이다 (Eibl et al. 1999). 고발현 단백질의 축적을 위해서는 강력한 프로모터가 요구되는데, 엽록체 게놈내의

rRNA 오페론 (rrn) 프로모터를 변형시킨 Prn 프로모터를 가장 널리 사용하며 5'-UTR과 3'-UTR 부위로는 psbA/TpsbA가 널리 사용되고 있다 (Fernandez-San Millan et al. 2003; Watson et al. 2004; Kittiwongwattana et al. 2007).

농업적 형질을 도입한 엽록체 형질전환 작물개발

곤충, 병 저항성, 내건성, 내염성, phytoremediation 및 세포질 융성불임과 같은 농업적 형질을 가진 유전자들이 엽록체 계놈에 도입되었다 (표 1, Verma et al. 2008). 1995년 담배 엽록체에 *Bacillus thuringiensis*(Bt) 독소 유전자 Cry1Ac를 도입하여 총 수용성 단백질의 3-5% 수준까지 발현 (McBride et al. 1995) 시킨 이래, 오페론 형태의 Cry2Aa2 유전자를 담배 엽록체 계놈에 도입한 형질전환체의 단백질 발현량은 총 수용성 단백질의 46.1%까지 축적 (De Cosa et al. 2001) 되었으며, 이 단백질은 엽록체내에서 단백질 결정체를 형성하였다. 이 Bt 독소 단백질이 발현된 담배 식물체 잎을 담배, 목화, 비트의 유충에게 먹인 결과, 100%로 강력한 살충 효과를 나타냈다 (De Cosa et al. 2001). 또한, 항균 펩타이드 MSI-99를 담배 엽록체에 발현시킨 경우 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*와 3 종류의 곰팡이 *Aspergillus*

flavus, *Fusarium moniliforme*, *Verticillium dahliae*에 대해 88-96% 저해 효과를 나타냈다 (DeGray et al. 2001). 이외에도 스트레스 조건에서 축적되는 트레할로스 유전자 TPS1 도입 담배 엽록체 형질전환 식물체는 핵형질전환체에 비해 15-25배 트레할로스를 축적하였음에도 핵 형질전환체에서 나타나는 생장 저해, 불임과 같은 다면발현성 (pleiotropic) 효과 없이 정상적인 생육과 건조내성을 보여주었다 (Lee et al. 2003). 한편, BADH (betaine aldehyde dehydrogenase) 유전자가 도입된 당근 엽록체 형질전환 식물체는 내염성을 나타냈고 (Kumar et al. 2004), 그 외 glyosate 제초제 저항성 (Daniell et al. 1998; Iamtham and Day 2000), 중금속 내성 (Ruiz et al. 2003), 세포질 융성불임 (Ruiz and Daniell 2005) 을 보이는 담배 엽록체 형질전환체가 개발되기도 하였다.

엽록체 형질전환 시스템을 이용한 분자농업

식물체에서 인체 치료용 유용 단백질의 생산은 많은 이점을 가진다. 첫째, 식물시스템은 동물 또는 미생물을 이용하는 시스템보다 훨씬 경제적이다. 둘째, 대규모 식물체 재배, 수확 및 식물체 재료 가공에 필요한 기본 시설과 기술이 이미 확립되어 있고 대량 생산을 위한 scale-

Table 1 Engineering of agronomic traits via the plastid genome (Verma et al. 2008)

Agromomic trait	Gene	Site of Integration	Promoter/ 5'/3' UTRs	References
Insect resistance	<i>cry1A(c)</i>	<i>trnV/rps12/7</i>	<i>Prrn/rbcL/rps16</i>	Mcbride et al. 1995
	<i>cry2Aa2</i>	<i>rbcL/accD</i>	<i>Prrn/ggagg (native)/psbA</i>	Kota et al. 1999
	<i>cry2Aa2 operon</i>	<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/native 5' UTR/psbA</i>	DeCosa et al. 2001
	<i>cry1Aa10</i>	<i>rps7/ndhB</i>	<i>Prrn/native 5' UTR/psbA</i>	Hou et al. 2003
	<i>cry1Ab</i>	<i>trnV/rps12/7</i>	<i>Prrn/T7 gene10/rbcL</i>	Dufourmantel et al. 2005
	<i>cry9Aa2</i>	<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/native 5' UTR/rbcL</i>	Chakrabarti et al. 2006
Herbicide resistance	<i>aroA (petunia)</i>	<i>rbcL/accD trnI/trnA</i>	<i>Prrn/ggagg/psbA</i>	Daniell et al. 1998
	<i>bar</i>	<i>rbcL/accD</i>	<i>Prrn/rbcL/psbA</i>	Iamtham and Day 2000
Disease resistance	<i>msi-99</i>	<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/ggagg/psbA</i>	DeGray et al. 2001
Drought resistance	<i>tps1 (yeast)</i>	<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/ggagg/psbA</i>	Lee et al. 2003
Phytoremediation	<i>merA/merB</i>	<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/ggagg/psbA</i>	Ruiz et al. 2003
Salt tolerance	<i>badh</i>	<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/ggagg/rps16</i>	Kumar et al. 2004
Cytoplasmic male sterility	<i>phaA</i>	<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/psbA/psbA</i>	Ruiz et al. 2005

Table 2 Biopharmaceutical proteins produced in chloroplasts

Biopharmaceutical proteins	Gene	Site of Integration	Promoter	5'/3' Regulatory elements	% TSP expression	References
Elastin-derived polymer	EG121	<i>trnI/trnA</i>	Prn	T7gene10/ <i>TpsbA</i>	ND	Guda et al. 2000
Human Somatotropin	<i>hST</i>	<i>trnV/rps12/7</i>	Prn ^a PpsbA ^b	T7gene10 ^a <i>psbA^b/Trps16</i>	7.0% ^a 1.0% ^b	Staub et al. 2000
Antimicrobial peptide	MSI-99v	<i>trnI/trnA</i>	Prn	ggagg/ <i>TpsbA</i>	21.5%-43%	DeGray et al. 2001
Insulin-like growth factor	<i>IGF-1n</i> <i>IGF-1s</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	33%	Daniell et al. 2005
Interferon-α 5	<i>INFα 5</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	ND	Daniell et al. 2004
Interferon-α 2b	<i>INF-α2b</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	18.8%	Arlen et al. 2007
Human serum albumin	<i>hsa</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn ^a PpsbA ^b	ggagg ^a <i>psbA^b/TpsbA</i>	0.02% ^a 11.1% ^b	Fernandez-San Millan et al. 2003
Interferon-γ	<i>IFN-γ</i>	<i>rbcL/accD</i>	<i>PpsbA</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	6%	Leelavathi and Reddy 2003
Monoclonal antibodies	<i>Guy's 13</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn	ggagg/ <i>TpsbA</i>	ND	Daniell et al. 2004
Human proinsulin	<i>CTB-Pins</i> (Pins-Proinsulin)	<i>trnI/trnA</i>	Prn ^{a,b}	<i>PpsbA/TpsbA^a</i> T7gene10 ^b / <i>Trps16</i>	16% ^a 2.5% ^b	Ruhlman et al. 2007

Table 3 Vaccine antigens produced in chloroplasts

Vaccine antigens	Gene	Site of integration	Promoter	5'/3' Regulatory elements	% TSP expression	References
Cholera toxin	<i>CtxB</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn	ggagg/ <i>TpsbA</i>	4%	Daniell et al. 2001a
Tetanus toxin	<i>TetC</i> (bacterial and synthetic)	<i>trnV/rps12/7</i>	Prn	T7 gene 10 ^a <i>atpB^b/TrbcL</i>	25% ^a 10% ^b	Tregoining et al. 2003
Canine Parvovirus (CPV)	CTB-2L21/ GFP-2L21	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	31.1%, 22.6%	Molina et al. 2004, 2005
Anthrax protective antigen	<i>Pag</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	14.2%	Koya et al. 2005; Watson et al. 2004
Amebiasis	<i>LecA</i>	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	6.3%	Chebolu and Daniell 2007
Plague	F1-V	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	14.8%	Arlen et al. 2008
Rotavirus	VP6	<i>rbcL/accD</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	3%	Birch-Machin et al. 2004
Hepatitis C	NS3	<i>trnI/trnA</i>	Prn	<i>PpsbA/TpsbA</i>	2%	Daniell et al. 2005

up이 상대적으로 쉽다. 셋째, 경구용 백신으로 이용되는 재조합 단백질을 가지는 식물체는 정제 과정이 필요 없고 상온에서 보관 및 수송이 가능하다. 넷째, 식물에서의 전사 후 수식 (posttranslational modification) 과정이 동물세포와 유사하고 잠재적인 인체 병원균, 독소 감염과 같은 2차 감염은 최소화 할 수 있으므로 식물체 이용 방법이 필요한 유용 외래 단백질의 생산을 위한 방법으로 주목받고 있다. 서론에서 언급한 것처럼 엽록체 발현 시스템은 핵 형질전환에 비해 여러 장점을 지닌다. 엽록체는 수많은 카피를 가지므로 고발현이 가능하고, 모계 유전을 하므로 환경 친화적이며, 한 번의 형질전환으로

다수 유전자 도입이 가능하다. 또한, 상동재조합 방식의 유전자 도입으로 위치효과 없으며, 핵 형질전환시 나타나는 고발현에 의한 유전자 침묵이 없다. 엽록체내에서는 또한 단백질 subunit의 정확한 접힘 (folding), disulfide bridge 형성이 가능하며, chaperon이 존재하기 때문에 단일 항체의 정확한 접힘과 집합 (assembly)이 가능하다 (Daniell et al. 2004). University Central Florida에 있는 다니엘 교수 연구실에서 가장 활발하게 치료용 유용 단백질 및 백신 생산 연구를 수행하고 있으며 유용 단백질 유전자, 백신을 엽록체 계층에 발현시킨 예는 표 2, 3에 나타내었다.

엽록체 형질전환을 이용한 치료용 단백질 생산

Human Somatotropin

수용성이며 생물학적인 활성을 가진 disulfide-bond 형태의 human somatotropin은 터너증후군, 만성신부전증 치료에 이용되는 단백질로 이 *hST* 유전자를 담배 엽록체 게놈에 도입된 결과 총 수용성 단백질의 7% 까지 축적되었는데, 이는 핵 형질전환에 비해 300배 높게 발현된 것이다. 엽록체에 발현된 somatotropin은 disulfide 결합을 형성하였고 본래 인체 hST와 동일한 기능을 하였다 (Staub et al. 2000).

Antimicrobial peptide

Anti-microbial peptides (AMPs)은 동물계의 고유 방어기작으로 병원균과 싸우거나 정상 미생물군을 통제하는데 도움을 주는 성분이다. 아프리카 clawed frog의 피부에서 분비되는 magainin은 항생제, 상처치료, 항암제 등과 같이 광범위에 이용된다 (DeGray et al. 2001). Magainin 유도체인 MSI-99를 담배 엽록체 게놈에 발현시켰을 때, 전체 수용성 단백질의 21.5%까지 발현되었으며, 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*와 3종류의 곰팡이 *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Verticillium dahliae*에 대해 약 88-96% 저해 효과 (DeGray et al. 2001), gram-negative 박테리아 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서도 96% 병원균의 성장 억제 효과가 있었다 (Chebolu and Daniell 2009).

Human Serum Albumin

정맥주사용으로 가장 널리 쓰이는 human serum albumin (HSA)은 혈액 내 총 단백질의 60%에 달하며 혈청으로부터 분획하여 얻는다. HSA는 다양한 미생물 시스템으로부터 생산되나 아직 상업용으로 이용할 수 있는 시스템은 개발되지 않았다. 엽록체의 5' *psbA* 부위는 빛에 의해 조절 받는데, 이 부위가 포함된 hsa 유전자를 담배 엽록체에 발현시킨 후 식물체를 50시간 동안 지속적인 광 조건하에 두었을 때 성숙한 잎에서 수용성 단백질의 11.1% 수준까지 발현되었으며, 이는 핵 형질전환에 비해 500배 많은 발현량을 나타낸 것이다 (Fernandez-San Millan et al. 2003).

Human insulin-like growth factor

근육과 다른 조직의 성장에 관여하며 현재 당뇨병에 치료 효과가 높은 것으로 알려진 human insulin-like growth factor(IGF-1)는 자연적으로 발생하는 세 개의 disulfide bond를 가진 약 7.65 kDa 크기의 single-chain 폴리펩타이드로 간에서 생성된다 (Torrado and Carrascosa 2003). 엽록체 코돈을 최적화하여 IGF-1을 담배 엽록체 게놈에 도입하였을 때 전체 수용성 단백질의 33%로 높은 발현 수준을 보여주었다 (Daniell et al. 2005).

Human Interferon Alpha

악성 암종의 치료제로 사용되는 인체 인터페론 (IFN α 2b)은 종양의 크기를 매우 효과적으로 감소시키며 바이러스 복제, 세포증식을 억제하며 면역반응을 증진시키는 효과를 가진다. 현재 상업용 IFN α 2b 단백질은 대장균으로부터 생산된 후 기내 정제과정을 거친다. 핵 형질전환 방법으로 발현시켰을 때는 매우 낮은 발현을 보였지만 (Elderbaum et al. 1992), 엽록체 게놈에 도입된 IFN α 2b는 총 수용성 단백질의 18.8%의 높은 발현을 보여주었다 (Arlen et al. 2007).

Human Interferon Gamma

IFN- γ 은 면역 시스템의 주된 cytokine으로 바이러스 복제를 방해하고, 세포증식을 억제하며, 병원성 박테리아나 바이러스에 대응하는 면역 조절 작용 역할을 한다. 많은 연구자들이 핵 또는 엽록체에 IFN- γ 를 도입하였는데 핵 형질전환의 경우 0.001% tsp로 발현하였지만 엽록체의 경우에는 6%이상 축적을 보이며 native human IFN- γ 로서 생물학적 활성이 있는 IFN- γ 를 생산하였다 (Leelavathi and Reddy 2003).

엽록체 형질전환 유래 백신 개발

Cholera toxin

백신 항원의 후보인 *Vibrio cholerae*의 Cholera toxin B subunit (CTB)가 담배 엽록체 게놈에 도입되었는데, 기능성 oligomer로서 총 수용성 단백질의 4.1%까지 축적되었고 (Daniell et al. 2001a), CTB-2L21 융합단백질로 담배 엽록체에 발현시켰을 때는 31.1%의 높은 발현 수준을 보여주었다 (Molina et al. 2004, 2005). 이들 CTB 유전자의 발현차이는 박테리 ribosome-binding site (GGAGG)만 가진 경우 4.1%, *psbA* 유전자의 5' UTR을 가진 경우 31.1%를 나타냈다.

Tetanus toxin

TetC는 파상풍 백신으로 사용 가능한 47 kDa 크기의 비독성 폴리펩타이드 절편으로 TetC를 전사하는 유전자를 담배 엽록체에서 발현시킨 결과, 최대 10-25% 수준의 TetC 단백질을 생산하였으며 형질전환 식물체의 추출물을 쥐에게 처리하여 면역력을 지닌 실험쥐를 획득하는데 성공하였다 (Tregoning et al. 2003).

Canine Parvovirus

Canine parvovirus (CPV)는 개 및 개과에 속하는 동물에 출혈성 위장염과 심근염을 일으킨다. 맹독의 CPV에 대하여 개를 보호하는 2L21 합성 펩타이드를 cholera toxin B (CTB)나 GFP와의 fusion protein 형태로 담배 엽록체에 발현시켰을 때, 총 수용성 단백질의 22.6% - 31.1%로 높은 발현 수준을 보였다 (Molina et al. 2004, 2005).

Anthrax protective antigen

현재 탄저병 치료를 위해 이용되고 있는 인체 백신은 *Bacillus anthracis*의 배양액으로부터 유도되는데, 추출물 내에는 protective antigen (PA) 이외에도 부작용을 나타내는 요소가 포함된다. 따라서 외부 박테리아 감염 없이 깨끗하고 안전하며 유효한 백신 생산을 위해 효과적인 발현 시스템이 필요하다. 담배 엽록체 계층에 *pagA* 유전자를 도입하여 PA를 발현시켰을 때 지속적인 광 조건에서 자란 성숙한 잎에서 총 수용성 단백질의 14.2% 이상 발현되었다 (Watson et al. 2004; Koya et al. 2005).

Plague vaccine antigen

그람 음성 박테리아인 *Yersinia pestis*는 역병 (plague)을 유발하는 병원균으로 이 병원균의 fusion protein F1-V를 담배 엽록체에 발현시켰을 때, 성숙한 잎의 경우 총 수용성 단백질의 14.8%의 항원 발현을 나타냈다 (Arlen et al. 2008).

결론

식물에서의 바이오 의약품 및 백신 등의 생산은 동물이나 미생물을 이용한 생산 시스템에 비해 편리성, 안전성 및 경제성 있는 대안으로서 큰 주목을 받고 있다. 특히, 고부가가치 유용 단백질 및 백신을 엽록체 유전공학을 통해 생산하는 접근 방식은 높은 발현율, 모계유전에 의한 생태계 안정성 및 유전자 침묵이나 위치효과가 생기지 않는 등의 많은 장점을 가지고 있으나, 현재까지도 엽록체 형질전환에 의한 생산은 대부분 담배에 국한되어 있으며, 정제 비용이 높은 점이 여전히 문제이다. 따라서 담배 이외의 다양한 식용 (edible) 식물종에서의 최적 발현시스템 개발, 백신 및 의료 단백질의 경구용 생산 또는 새로운 정제 시스템을 개발함으로써 극복될 수 있을 것이다. 고부가가치 유용 단백질을 대량 생산하는 공장으로서의 분자농업과 도심·건물 내에서 식물을 재배하는 개념인 식물공장이 융복합되면 미래의 농업 또는 생산 방식에 큰 혁신을 가져 올 것이므로 향후 10년 내에 유용 단백질 및 백신 생산 관련 산업이 수백억불 이상의 가치를 지닌 잠재력이 큰 시장으로 성장하게 될 것이다.

적요

고등식물의 엽록체 형질전환은 핵 형질전환에서 기대할 수 없는 여러 가지 이점을 가진다. 외래 단백질의 발현율을 획기적으로 높일 수 있고, 여러 유전자를 동시에 발현시킬 수 있으며, 상동재조합에 의한 부위-특이적 유

전자 삽입으로 인해 유전자 침묵 및 위치효과가 없다. 더욱이, 대부분 작물은 화분을 통한 도입된 유전자의 전이가 불가능한 모계 유전을 하기 때문에 엽록체 형질전환은 환경 친화적이다. 엽록체 형질전환 시스템은 핵 형질전환과 달리 작물에서의 성공에 제한적이었으나 지난 10년 동안 이런 한계가 극복되어 콩, 당근, 상추 및 유채 등의 작물에서도 성공하게 되었다. 그러므로 이제 작물의 엽록체 형질전환은 농업적 형질의 개선뿐 만 아니라, 고부가가치 백신과 의료용 단백질 생산을 통한 의약품 산업의 성장에 활용될 수 있을 것이다.

사사

본 논문은 교육과학기술부 프론티어 작물유전체기능 연구사업, 해양수산기술진흥원 해양극한생물 분자유전체 연구단사업, 한국생명공학연구원 기관고유사업의 지원으로 수행되었다.

인용문헌

- Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole Am, Oishi KK, Daniell H (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. *Plant Biotechnol J* 5:511-525
- Arlen PA, Singleton M, Adamovicz JJ, Ding Yi, Davoodi-Semiromi A, Daniell H (2008) Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect Immun* 76:3640-3650
- Bendich AJ (1987) Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *BioEssays* 6:279-282
- Birch-Machin I, Newell CA, Hibberd JM, Gray JC (2004) Accumulation of ritavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *Plant Biotechnol J* 2:261-270
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240:1534-1538
- Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P (1993) Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet* 241:49-56
- Chakrabarti S, Lutz K, Lertwiriyawong B, Svab Z, Maliga P (2006) Expression of the *cry2Aa2 B.t.* gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth. *Transgenic Res* 15:481-488
- Chebolu S, Daniell H (2009) Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: expression, folding, assembly and functionality. In: Karasev AV (ed) *Plant-produced microbial*

- vaccines. Current Topics in Microbiology and Immunology 332, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany, pp 33–54
- Chung HJ, Suh YB, Jeong WJ, Min SR, Liu JR (2006) Chloroplast genetic transformation in higher plants: an encounter between prokaryote and eukaryote. J Plant Biotechnol 33:185–194
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nat Biotechnol 20:581–586
- Daniell H (2007) Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive? Proc Natl Acad Sci USA 104:6879–6880
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. Nat Biotechnol 16:345–348
- Daniell H, Carmona-Sanchez O, Burns B (2004) Chloroplast derived antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines. In: Fisher R, Schillberg S (eds) Molecular Farming. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, pp 113–133
- Daniell H, Chebolu S, Kumar S, Singleton M, Falconer R (2005) Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. Vaccine 23:1779–1783
- Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001a) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. J Mol Biol 311:1001–1009
- Daniell H, Muthukumar B, Lee SB (2001b) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. Curr Genet 39:109–116
- Davarpanah SJ, Jung SH, Kim YJ, Park YI, Min SR, Liu JR, Jeong WJ (2009) Stable Plastid Transformation in *Nicotiana benthamiana*. J Plant Biol 52:244–250
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. Nat Biotechnol 19:71–74
- DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Physiol 127:852–862
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. Plant Mol Biol 55:479–489
- Eibl C, Zou Z, Beck A, Kim M, Mullet J, Koop HU (1999) In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: Tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. Plant J 19:333–345
- Elderbaum O, Stein D, Holland N, Gafni Y, Livneh O, Novick D, Rubinstein M, Sele I (1992) Expression of active human interferon beta in transgenic plants. J Interferon Res 12:449–453
- Fernandez-San Millan A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. Plant Biotechnol J 1:71–79
- Gruissem W, Tonkyn JC (1993) Control mechanisms of plastid gene expression. CRC Crit Rev Plant Sci 21:19–55
- Guda C, Lee SB, Daniell H (2000) Stable expression of biodegradable protein based polymer in tobacco chloroplasts. Plant Cell Rep 19:257–262
- Hagemann R (2004) The sexual inheritance of plant organelles. In Daniell H, Chase CD, eds, Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 93–113
- Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM (2003) Chloroplast transformation in oilseed rape. Transgenic Res 12:111–114
- Iamtham S, Day A (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. Nat Biotechnol 18:1172–1176
- Jeong SW, Jeong WJ, Woo JW, Choi DW, Park YI, Liu JR (2004) Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco. Plant Cell Rep 22:747–751
- Khan MS, Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. Nat Biotechnol 17:910–915
- Kittiwongwattana C, Lutz K, Clark M, Maliga P (2007) Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase. Plant Mol Biol 64:137–143
- Ko SM, Kim HC, Yoo BH, Woo JW, Chung HJ, Choi DW, Liu JR (2006) Production of human serum albumin in chloroplast-transformed tobacco plants. J Plant Biotechnol 33:233–236
- Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ (1999) Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. Proc Natl Acad Sci USA 96:1840–1845
- Koya V, Moayen M, Leppla SH, Daniell H (2005) Plant based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. Infect Immun 73:8266–8274
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. Plant Physiol 136:2843–2854
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Byun MO, Daniell H (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. Mol Breed 11:1–13
- Leelavathi S, Reddy VS (2003) Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. Mol Breed 11:49–58
- Liu CW, Lin CC, Chen J, Tseng MJ (2007) Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. Plant Cell Rep 26:1733–1744
- Liu JR, Jeong WJ, Chung HJ, Min SR, Park JY (2006) Plastid transformation system to prevent the intramolecular recombination of transgene. PCT/2006/004377
- Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. Annu Rev Plant Biol 55:289–313
- McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P (1995) Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloro-

- plasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (NY)* 13:362-365
- Molina S, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* 2:141-153
- Molina S, Veramendi J, Hervás-Stubbs S (2005) Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology* 342:266-275
- Okumura S, Sawada M, Park Y, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa KI (2006) Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res* 15:637-646
- Ruf S, Hermann M, Berger LJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19:870-875
- Ruhlman T, Ahangri R, Devine A, Samsam M, Daniell H (2007) Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplast-oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol J* 5:495-510
- Ruiz ON, Daniell H (2005) Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of β -ketothiolase. *Plant Physiol* 138:1232-1246
- Ruiz ON, Hussein HS, Terry N, Daniell H (2003) Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol* 132:1344-1352
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19:209-216
- Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18:20-24
- Singh AK, Verma SS, Bansal KC (2010) Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Transgenic Res* 19:113-119
- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18:333-338
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8526-8530
- 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
- Torrado J, Carrascosa C (2003) Pharmacological characteristics of parenteral IGF-1 administration. *Curr Pharm Biotechnol* 4: 123-140
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z (2003) Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 31:1174-1179
- Verma D, Daniell H (2007) Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol* 145:1129-1143
- Verma D, Samson NP, Koya V, Daniell H (2008) A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat Protocol* 3:739-758
- Wang HH, Yin WB, Hu ZM (2009) Advances in chloroplast engineering. *J Genet Genomics* 36:387-398
- Watson J, Koya V, Leppla SH, Daniell H (2004) Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine* 22:4374-4384
- Youm JW, Jeon JH, Kim H, Min SR, Kim MS, Joung H, Jeong WJ, Kim HS (2010) High-level expression of a human β -site APP cleaving enzyme in transgenic tobacco chloroplasts and its immunogenicity in mice. *Transgenic Res* DOI 10.1007/s112480-010-9383-8
- Zubko MK, Zubko EI, Zuilen KV, Meyer P, Day A (2004) Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res* 13:523-530