

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2024.16.1.026>

ISSN 2383-5400 (Online)

아그로박테리움 매개 클로렐라 형질전환을 이용하여 유용 단백질인 hGM-CSF와 hEGF의 효율적인 발현 시스템

Efficient Expression System of High Value Proteins, hGM-CSF and hEGF, using Agrobacterium-mediated Chlorella Transformation

정유정¹, 박미정², 이우정³, 김성천^{4*}Yu Jeong Jeong¹, Mi - Jung Park², Woo - Jeong Lee³, Sung Chun Kim^{4*}¹수석연구원, (주)바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국²선임연구원, (주)바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국³연구원, (주)바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국⁴대표이사, (주)바이오이즈 중앙연구소 서울, 08390, 대한민국

Central Research Institute, Biois. Co., Ltd., Seoul, 08390, Korea

(Received 2 Mar 2024, Revised 8 Mar 2024, Accepted 9 Mar 2024)

Abstract Chlorella has various biotechnological applications, including in the biomedical and pharmaceutical industries, because of its advantages, including rich nutrients, fast growth rate, easy cultivation, and high biomass. We used the Agrobacterium-mediated transformation method to express human GM-CSF and EGF proteins, which are widely used in regenerative medicine, cosmetics, and pharmaceutical materials in Chlorella. The codon-optimized *hGM-CSF* and *hEGF* genes were cloned into plant binary vectors and transformed into *Chlorella vulgaris* using the Agrobacterium-mediated coculture transformation method. After transformation, genomic DNA PCR was performed for each *C. vulgaris* line that was stably subcultured on an antibiotic-resistant solid medium to confirm the insertion of *hGM-CSF* and *hEGF* into the chromosome. Furthermore, PT-PCR and protein expression of *hGM-CSF* and *hEGF* in each transformed *C. vulgaris* were significantly increased compared to the untransformed Chlorella. This study suggests that high-value proteins, including hGM-CSF and hEGF, which are foreign genes of *C. vulgaris*, can be stably expressed through the Agrobacterium-mediated Chlorella transformation system.

Keywords : Chlorella vulgaris, Agrobacterium, Co-culture, hGM-CSF, hEGF

서 론

미세조류(microalgae)는 중요한 생물자원으로 쉬운 배양, 빠른 성장, 높은 단백질 함량과 지질 축적 능력, 저렴한 생산비용으로 인해 기초과학부터 바이오

에너지, 의약품과 식품 원료, 사료 첨가물, 화장품, 염료 등 다양한 산업 분야에서 활용되고 있다 [1, 2, 3]. 이를 활용한 고부가물질 생산 관련 연구가 세계적으로 활발하게 이루어지고 있으며, 바이오의약품에서도 많은 주목을 받고 있다 [4, 5, 6].

* Corresponding author Sung Chun Kim
Phone: ***-****-**** Fax: 02-864-9954
E-mail: kimgp@biois.co.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

바이오의약품은 포유동물과 대장균을 포함한 미생물에서 주로 생산되나, 포유류 세포배양은 세포주 불안정성, 기술개발 및 생산 비용이 많이 드는 반면, 미생물은 복잡한 구조를 갖는 재조합 단백질 생산에 한계가 있고, 인체에 해로운 생체독소(endotoxin)로 인한 안정성에 문제가 있을 수 있다. 이에 반해 미세조류는 동물 세포배양과 달리 복잡한 단백질의 생산 비용이 저렴하고 단백질 생산 축적 시간이 짧으며, 식물세포 생산시스템보다 경제적 생산이 가능하고 바이오의약품에서 대안적인 발현시스템이 될 수 있어 모델 미세조류 중심으로 유용 단백질 생산을 증대시키기 위한 연구개발이 활발히 진행 중이다 [7, 8, 9]. 유전공학 기술의 발전으로 *Agrobacterium-mediated co-culture*, *electroporation*, *PEG*, *microparticle bombardment*, *glass beads agitation* 등 다양한 형질전환 방법이 미세조류 개량 방법으로 적용되어 이를 활용한 소재 연구 및 개량 균주개발 연구가 활발히 진행되고 있다 [10, 11]. 특히, 아그로박테리움 매개 공동배양(*Agrobacterium-mediated co-culture*) 기술은 간단하고 가격이 저렴하며 길이가 긴 DNA를 핵내로 전달할 수 있는 높은 형질전환 효율과 미세조류 및 기타 비식물 유기체에 광범위하게 적용될 수 있는 장점이 있어, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Haematococcus lacustris*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella bardawil*, *Dunaliella salina*, *Symbiodinium sp.*, *Nannochloropsis sp.* 및 *Parachlorella kessleri* 등의 미세조류 종의 형질전환에 사용되어졌다 [12, 13]. *Chlorella vulgaris*의 경우, 막대한 경제적 잠재력을 가지고 있기에 아그로박테리움 매개 형질전환 시스템에 전달 효율 개선과 안정적이고 효율적인 단백질 발현의 최적화가 마련된다면 경제적 잠재력을 증대시킬 수 있을 것이다 [14].

안전성이 입증된 GRAS (generally recognized as a safe) 인증재료 중의 하나인 클로렐라에서도 의약품을 생산하기 위해 1990년대부터 사이토카인과 인간 성장 호르몬의 일시적 발현부터 최근까지 단백질 발현시스템 관련 연구가 지속적으로 보고되고 있다 [15, 16, 17, 18].

종양세포 성장과 생존을 조절하는 사이토카인과 성장인자는 대표적인 바이오의약품으로, 발현량, 단

백질 고순도, 높은 생물 활성을 가지는 제품을 개발하기 위해 이형발현시스템(heterologous expression system)을 적용하여 대량생산 하기 위한 연구가 진행되고 있다 [19, 20, 21]. 사이토카인은 면역세포에 의해 만들어지는 단백질로 세포 증식 분화 및 활성 변화를 유도하며 여러 가지 사이토카인과 복합적으로 작용하여 면역반응에 관여한다 [22].

다양한 기능을 가진 혈구생성인자인 Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)는 인체 성장인자에 속하는 당단백질로 골수전구세포의 분화와 증식을 조절하고, 성숙된 단핵구와 과립구의 강력한 활성인자로 작용하는 가장 중요한 사이토카인으로 항진 기능을 가지며, 항미생물 작용 및 호중구와 대식세포에 의한 식균 작용 조절한다 [23, 24, 25]. 다른 사이토카인들과 작용하여 그 효과가 증대되기도 하여 재조합 GM-CSF는 암화학 요법, 골수이식 후 골수 회복 등 종양 및 혈액 질환 관련 질병 치료에 이용이 증가하고 있다.

Epidermal Growth Factor (EGF)는 세포 표면에 존재하는 상피세포 성장인자 수용체와 결합하여 세포 분열 및 성장 촉진에 영향을 주는 상피세포 성장인자로 피부 표면 수용체와 결합하여 새로운 세포 생산을 촉진하는 단백질의 일종으로 표피세포 내에 세포분열과 증식 촉진, 기타 재생 촉진인자 분비에 관여한다 [26]. 또한, 손상된 조직세포의 기능 유지와 회복, 조직 재배열 등에 중요한 역할을 담당하여 각막, 피부, 혈관, 점막세포 등 의료용 치료제 및 화장품 원료 등으로 다양하게 사용된다 [27, 28].

본 연구진은 피부재생, 상처치유, 세포치료제, 조직공학 분야 등 재생 의료의학 분야를 비롯하여 화장품, 의료기기, 의약외품, 의약품 소재로 널리 활용되고 있는 hGM-CSF와 hEGF 단백질의 코돈을 최적화하여, 쉽고 빠르게 클로렐라 형질전환 발현 시스템으로 플랫폼 하여 클로렐라로부터 유용 단백질의 안정적인 발현 시스템 개선을 통하여 대량생산에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 미세조류 및 배지 배양 조건

본 연구에 사용한 *Chlorella vulgaris* AG10032는 한국생물자원센터(Korea Collection for Type Culture; KCTC)에서 분양받아서 최적 배양을 위해, 탄소원으로 0.5% glucose를 첨가한 BG (Blue-Green) 11 배지를 사용하였다 [29]. BG11 배지(pH 7.0) 조성은 다음과 같이 구성되며, NaNO₃ 1500 mg/L, K₂HPO₄ 40 mg/L, MgSO₄·7H₂O 75 mg/L, CaCl₂·2H₂O 36 mg/L, Citric acid 6 mg/L, FeC₆H₅O₇·NH₄OH 6 mg/L, Trace metal solution 1 ml/L (Na₂-EDTA 1 mg/L, MnCl₂·4H₂O 1.81 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.08 g/L, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.05 g/L, H₃BO₃ 2.86 g/L) 되게 제조, 121°C, 15분간 멸균 후 냉각하여 250 ml 세포배양 플라스크에 접종액(1×10⁵ cells/ml)을 넣어 전배양 하였다. 접종 후 교반 속도 150 rpm, 광주기 14 h:10 h (light:dark), 배양온도 25°C, 광도 3200 lux로 공급되는 진탕배양기(VS-8480SR-L, Vision Scientific, Korea)에서 계대배양 실시 후, UV/Vis 분광광도계 (Optizen pop, Mecacy, Korea)를 이용하여 흡광도 680 nm (Optical Density, 680 nm, O.D₆₈₀)에서 성장률을 측정하고 본 실험에 사용하였다.

2. 코돈 최적화된 hGM-CSF와 hEGF 벡터 제작

Cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) promoter binary vector pCAMBIA1302 (<http://www.cambia.org>; GenBank: AF234298.1)에 *human GM-CSF* (GenBank: AAA52578.1, 144 A.A)와 *human EGF* (GenBank: AFA26280.1, 53 A.A) 유전자를 클로렐라 기반으로 코돈 최적화하여 각각 연결하고 6xHis Tag으로 구성된 합성 서열을 바이오닉스에 의뢰하여 합성하였다. 합성 서열 양 끝은 각각 *SpeI*과 *BstEII* 제한효소를 가지고 있어, pCAMBIA1302 벡터의 *SpeI*-*BstEII* (Enzynomics, Korea) 부위에 녹색 형광 단백질 유전자(Green Fluorescence Protein, GFP)를 제거하고, 동일 위치에 합성된 서열인 hGM-CSF:6xHis Tag과 hEGF:6xHis Tag 서열을 T4 DNA ligase (M1801, Promega, USA)를 사용하여 삽입 후 클로닝 하였다 [30]. 50 µg/ml Kanamycin (Kan⁵⁰)에서 선별된 콜로니

들을 대상으로 colony PCR로 타겟 유전자 삽입 여부를 확인하고, 서열 분석(sequencing analysis)은 마크로젠(주)에 의뢰하여 삽입된 유전자 서열을 확인하였으며 이를 각각 GM-CSF:His와 EGF:His로 표기하였다.

3. 아그로박테리움 형질전환체 제작 및 선별

C. vulgaris 형질전환을 위해 제작된 hGM-CSF:His와 hEGF:His 벡터는 freeze-thaw 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 GV3101 (O.D₆₀₀=0.8)에 도입하였다 [31, 32]. 도입된 *A. tumefaciens*은 10 µg/ml Gentamycin (Gen¹⁰), 50 µg/ml Rifampicin (Rif⁶⁰)과 50 µg/ml Kanamycin (Kan⁵⁰)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) Agar (Difco, Laboratories, USA)에 도말하고, 28°C 2일 동안 진탕배양기 (ISF-7100, JeioTech, Korea)에서 암배양 하였다. 선별된 항생제(Gen¹⁰, Rif⁶⁰, Kan⁵⁰) 저항성 GV3101 균주는 hGM-CSF/*hptII*와 hEGF/*hptII* 특이적 primer를 이용하여 colony PCR 분석을 통해 유전자 도입을 확인하였다.

4. Colony PCR 및 제한효소 처리

hGM-CSF:His와 hEGF:His 벡터가 도입된 *E. coli*와 *A. tumefaciens* 콜로니는 증류수에 희석 후 3 µl의 현탁액을 주형으로 유전자 특이 primer (Table 1)를 사용하여 2xGS-Taq PCR Master Mix (#3308, BEAMSBIO, Korea) 제품으로 colony PCR을 수행하였다. PCR 증폭 조건은 98°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 30/60초간 30회 반복한 다음 72°C에서 5분간 반응시켰다. *SpeI*, *BstEII*, *SacII*와 *AclI* (Enzynomics, Korea) 제한효소는 제조사에서 제시한 방법에 따라 37°C에서 1시간 반응하고, agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

5. 아그로박테리움 매개 *C. vulgaris* 공동배양 형질 전환 및 형질전환체 선별

도입된 hGM-CSF:His와 hEGF:His 벡터가 각각 삽입된 *Agrobacterium* GV3101 균주는 항생제가 첨가된 LB 액체배지(Gen¹⁰, Rif⁶⁰, Kan⁵⁰)에 접종하고,

28°C에서, O.D₆₀₀ 0.7~0.8이 될 때까지 암배양 하였다. 증식된 균주는 subculture 하여, 100 rpm 조건으로 2시간 더 배양하여 접종액으로 사용하였다.

*C. vulgaris*는 0.5% glucose가 첨가된 BG11 액체 배지에서 25°C, 5일 동안 암조건에서 전배양 (O.D₆₈₀=1) 하였다. Cha 등(2012) 방법을 변형하여 *A. tumefaciens* 접종액과 *C. vulgaris* 전배양액은 각각 120 rpm과 200 rpm에서 고속원심분리기(1236R, LaboGene, Korea)를 사용하여 상등액을 제거하고, Induction 배지(100 µM acetosyringon이 포함된 BG11 액체배지(pH 5.6))로 세번 세척 후 Induction 배지로 각각 재현탁 하였다 [14]. 재현탁 된 *Agrobacterium*을 *C. vulgaris*에 1/50로 이식하고, 25°C 암조건에서 5일간 공동배양 후, 20 µg/ml Hygromycin (Hyg²⁰)와 150 µg/ml Cefotaxime (Cef¹⁵⁰)이 포함된 BG11 (0.5% glucose 첨가) 고체배지에 도말하였다. 이들 고체배지는 2일 동안 암배양한 다음, 양광저온배양기 (DS-53FPL, DASOL Science, Korea)로 옮겨 증식시키고 항생제 저항성과 PCR 검증으로 선별하였다.

6. 도입 유전자 확인 및 발현 유무 확인

Genomic DNA PCR과 RT-PCR을 통해 형질전환된 *C. vulgaris*에서 유전자 도입 유무와 발현을 각각 확인하기 위하여 항생제 저항성을 보이는 콜로니에 각각의 번호를 부여하고, genomic DNA (gDNA)를 SDS extraction buffer를 사용하여 분리하였다 [33]. 분리된 gDNA 100 ng을 주형으로 하여 유전자 특이 primer (Table 1)와 함께 EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (RR300A, Takara Bio, Korea)를 사용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행하였다. PCR 증폭 조건은 98°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 30/60초간 30회 반복한 다음 72°C에서 5분간 반응시켜 *C. vulgaris* 내 유전자 도입을 확인하였다.

*hGM-CSF*와 *hEGF*의 gDNA PCR을 통해 유전자 도입이 확인된 *C. vulgaris* 형질전환체에서 *hGM-CSF*와 *hEGF* 유전자 발현 여부 확인을 위하여 TRIzol Plus RNA Purification Kit (#12183555, Invitrogen, USA)로 total RNA를 추출하였으며 [34], M-MLV RT-Kit (BR122-10k, BioFACT, Korea)를 사

용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 1 µl를 주형으로 하여 Table 1에 표시된 프라이머와 EmeraldAmp® GT PCR Master Mix를 사용하여 SimpliAmp Thermal Cycler (A24811, Applied Biosystems, USA)에서 증폭하여 발현을 분석하였다.

Table 1. List of primers for this study

Gene Name	Primer	
	Name	Sequence (5' → 3')
<i>hGM-CSF</i>	<i>hGM-CSF_F</i>	ATGTGGCTCCAGTCGCTGCT
	<i>hGM-CSF_R</i>	CTCCTGGACAGGCTCCCAG
<i>hEGF</i>	<i>hEGF_F</i>	AACTCCGATAGCGAGTGCCTC
	<i>hEGF_R</i>	GCGCAGCTCCCACCCTTCA
<i>18S rRNA</i>	<i>18S rRNA_F</i>	TTCTATGGGTGGTGGTGCATG
	<i>18S rRNA_R</i>	GCGAACCAACCGTACTATT
<i>hptII</i>	<i>hyg_F</i>	TTCTTTGCCCTCGGACGAGTG
	<i>hyg_R</i>	ACAGCGTCTCCGACCTGATG

7. 형질전환된 *C. vulgaris* 단백질 추출 및 발현

유전자 도입이 확인된 *C. vulgaris* 형질전환체를 개체별로 같은 조건에서 배양한 다음 원심 분리 후, pellet은 액체질소를 이용하여 동결 건조한 뒤, Tissue Grinder Motor Pestle로 분쇄하여 단백질 추출 버퍼 (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1% Nonidet-P40, Protease inhibitor cocktail (GenDEPOT))를 첨가하였다. 얼음에서 10분간 반응시킨 후 원심분리하여 상층액만을 취해 His-tag ELISA detection kit (L00436, Genscript, USA)로 제조사에서 제시된 방법으로 3반복 실험하여 분석에 사용하였고 실험 결과는 평균값과 표준편차를 오차범위로 표기하였다.

8. 통계 분석

실험 결과의 유의성 분석을 위해 SAS 소프트웨어(버전 9.1)를 사용하였으며, Tukey 테스트로 검증하여 p<0.05 값을 유의한 값으로 처리하였다.

결과 및 고찰

미세조류는 영양소가 풍부하고 빠른 증식력과 배양이 쉬워서 간편 조작으로 배양환경을 제어할 수 있는 광생물배양기(photobioreactor system)에서 대량

배양할 수 있어 미래 식량자원으로 활용할 수 있다

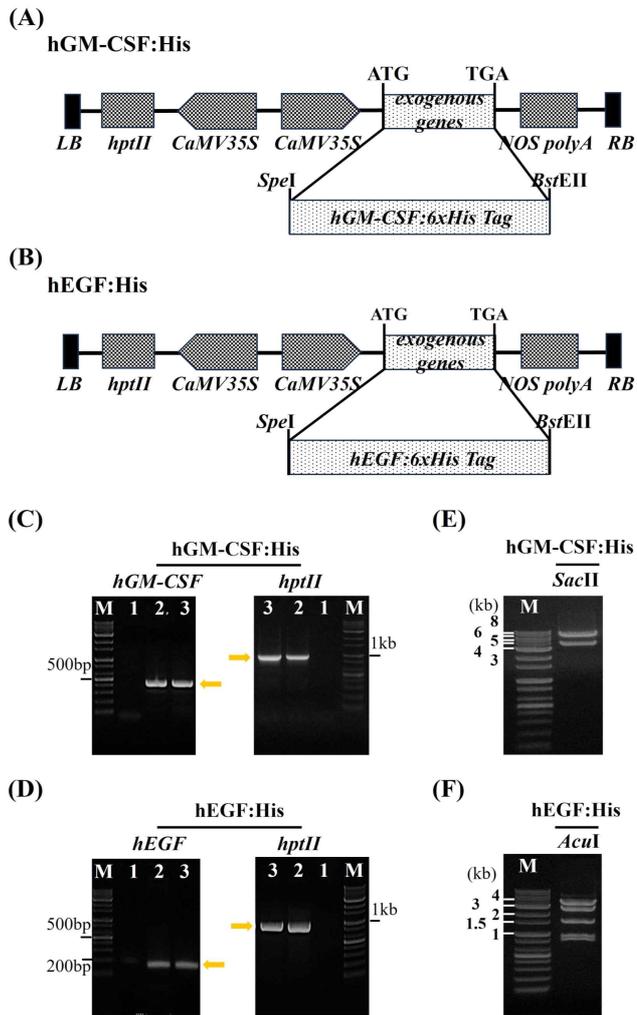


Figure 1. The binary vector used for *C. vulgaris* transformation in this study. Schematic representations of the binary vector constructs, hGM-CS:His (A) and hEGF:His (B). LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border; hptII, hygromycin resistant gene; CaMV 35S, Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter; His tag, 6xHistidine epitope tags; NOS polyA, NOS nopaline synthase terminator. (C-D) Colony PCR of the hGM-CSF:His (C) and hEGF:His (D). The orange arrow indicates the 432 bp, 159 bp, and 964 bp fragments of hGM-CSF, hEGF, and hpt II, respectively. Lanes M, the 1 kb Plus DNA Ladder; Lane 1, the negative control based on H₂O; Lanes 2, the *E. coli* liquid PCR products; Lanes 3, the *A. tumefaciens* liquid PCR products. (E) The SacII digestion product of the plasmid containing the hGM-CSF target gene, hGM-CSF:His. (F) The AcuI digestion product of the plasmid containing the hEGF target gene, hEGF:His.

[35, 36]. 클로렐라 등의 GRAS 미세조류를 활용하면 생체독소 문제로부터 자유롭게 의약품을 생산할 수 있어 형질전환으로 고부가 소재 생산을 위한 유전자 개량 연구가 필요하다.

본 연구에서는 *C. vulgaris*에서 이형 단백질 발현 효율을 증진 시키기 위해 타겟 유전자인 hGM-CSF와 hEGF에 대해 클로렐라 코돈 사용법(codon usage)에 맞게 번역 효율을 높이는 코돈 최적화(codon optimization) 방법을 적용하여, 각 타겟 유전자의 3' 말단에 6xHis Tag을 연결하여 서열을 합성하였다. 합성 서열 양 끝 5' 말단에 SpeI과 5' 말단에 BstEII 제한효소를 포함하였으며, 이들 효소 처리 후 pCAMBIA1302 벡터에 삽입하여 GM-CSF:His와 EGF:His 벡터를 제작하였다(Figure 1A, 1B). 식물 binary vector인 pCAMBIA1302 벡터는 모든 조직에서 유전자 발현을 유도하는 CaMV 35S 프로모터와 항생제 카나마이신 내성 유전자를 코딩하고 있으며, T-DNA에는 녹색 형광 단백질 유전자(GFP)와 항생제 하이그로마이신 내성 유전자(hygromycin phosphotransferase, hptII)가 코딩되어 있다 [37, 38]. 새로이 제작된 벡터인 hGM-CS:His와 hEGF:His의 플라스미드 DNA는 *E. coli* DH5α 내로 heat shock 방법[30]에 따라 도입 후, Kan⁵⁰이 포함된 LB 고체배지에서 GM-CSF:His와 EGF:His의 해당 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니를 대상으로 GM-CSF와 hptII 유전자 특이적 프라이머(Table 1)를 사용하여 colony PCR을 통해 Figure 1C와 같이 432 bp와 964 bp 산물을 1차적으로 확인하고, 삽입된 서열의 포함된 전체 벡터를 재확인하기 위하여 확인된 콜로니에서 DNA를 추출하여 SacII 제한효소를 처리하였다. 그 결과 0.8% agarose gel에서 6641 bp와 3683 bp 단편을 확인하고(Figure 1E), 2차적으로 서열 분석을 통해 정확하게 삽입된 hGM-CSF:His 서열로 재검증하였다. 또한, hEGF:His 배지에서 선별된 콜로니를 대상으로 hEGF와 hptII 유전자 특이적 프라이머(Table 1)를 사용하여 colony PCR을 통해 Figure 1D와 같이 159 bp와 964 bp 산물을 1차적으로 확인하고, 확인된 콜로니를 대상으로 DNA를 추출 후, AcuI 제한효소를 처리하였다. 그 결과 4049 bp, 2739 bp, 1543 bp, 909

bp와 811bp 단편을 확인하고(Figure 1F), 2차적으로 서열 분석을 통해 정확하게 삽입된 hEGF:His 서열을 확인할 수 있었다.

확인된 hGM-CSF:His와 hEGF:His 플라스미드 DNA는 Agrobacterium에 freeze-thaw 방법을 이용하여 도입하고, 항생제가 포함된 LB 고체배지(Gen¹⁰, Rif⁵⁰, Kan⁵⁰)에서 자란 콜로니를 대상으로 각각 *hptII/hGM-CSF*와 *hptII/hEGF* 특이적 프라이머(Table 1)를 사용하여 Agrobacterium GV3101 균주에서 colony PCR을 통해 증폭된 산물을 확인한 후, *C.*

vulgaris 형질전환에 사용하였다.

형질전환이 최종 확인된 Agrobacterium hGM-CSF:His와 hEGF:His 및 전배양으로 준비된 *C. vulgaris*는 재료 및 방법에 서술되어있는 아그로박테리움 매개 클로렐라 형질전환 방법에 따라 형질전환하고, 5일간 공동배양 후, 항생제(Hyg²⁰, Cef¹⁵⁰) 저항성 배지에서 저항성(Resistance, R)을 보이는 개체들을 선별하였다(Figure 2A). 선별된 Hyg^R 와 Cef^R 개체들을 2주 간격으로 5회에 걸쳐 항생제 저항성 고체배지에서 연속 계대배양을 통해 안정적인 형질전환체를 확보하고(Figure 2B), 확보된 개체별로 gDNA에 삽입된 *hGM-CSF*와 *hEGF* 유전자를 확인하기 위하여 *hGM-CSF*와 *EGF* 유전자 특이적 primer를 사용하여 PCR 분석을 수행하였다. 그 결과, 형질전환하지 않은 *C. vulgaris* gDNA의 경우 해당 유전자의 증폭이 일어나지 않았으며, hGM-CSF:His와 hEGF:His 형질전환된 각각의 *C. vulgaris*에서는 432 bp (*hGM-CSF*) 와 159 bp (*hEGF*)의 PCR 산물이 확인되었다. 이를 통해 hGM-CSF:His 형질전환된 *C. vulgaris*와 hEGF:His 형질전환된 *C. vulgaris* 염색체 내에 *hGM-CSF*와 *hEGF* 유전자가 도입되었다는 사실을 확인할 수 있었다(Figure 2C).

C. vulgaris 염색체내에 도입이 확인된 *hGM-CSF*와 *hEGF* 유전자와 단백질이 클로렐라에서 정상적으로 발현되는지를 알기 위하여 250 ml 세포배양 플라스크에 subculture 후(Figure 3C), 효소면역측정 방법(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) 원리를 적용한 키트를 사용하여 ELISA를 수행하였다. 그 결과, 음성대조군인 형질되지 않은 클로렐라와 차별되게, hGM-CSF:His와 hEGF:His가 형질전환된 클로렐라에서 *hGM-CSF*와 *hEGF*가 강하게 발현되었으며, 전체적으로 유의하게 증가되었다(Figure 3A, 3B). 최근에 동물이나 미생물에서만 얻을 수 있는 백혈병 등의 치료에 쓰이는 항암면역증강 단백질인 hG-CSF를 클로렐라에서 발현시킨 연구가 보고되었다 [18].

hGM-CSF와 hEGF 단백질 발현이 확인된 각각의 클로렐라에서 *hGM-CSF*와 *hEGF* 유전자의 안정적인 mRNA 발현 여부를 확인하였다. 형질전환 *C.*

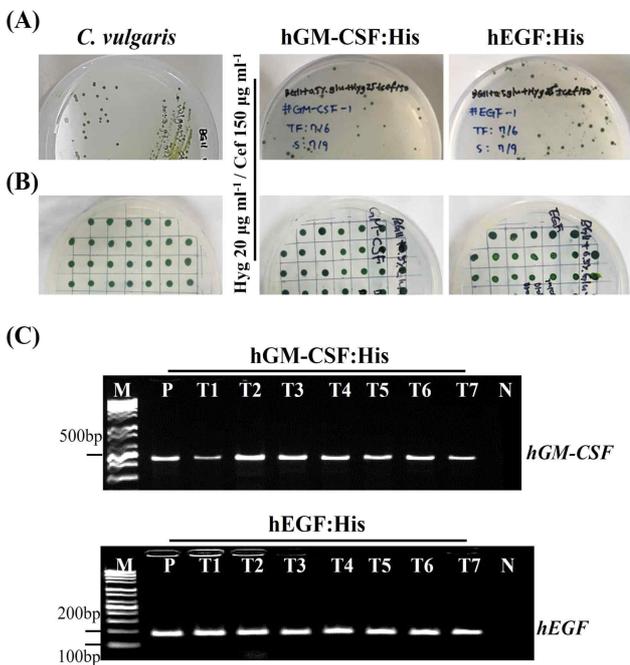


Figure 2. Screening of *C. vulgaris* transformants, hGM-CSF:His and hEGF:His. (A) Colony formation of Agrobacterium-mediated transformation *C. vulgaris* on the selection plates, 0.5% glucose plus BG11 plates supplemented with both 20 µg/ml Hygromycin and 150 µg/ml Cefotaxime. (B) Stable transformants obtained through serial subcultures at 2-week intervals on the selective medium containing Hyg²⁰ and Cef¹⁵⁰. (C-D) PCR analysis confirmation from gDNA of the hGM-CSF:His and hEGF:His transformants using the *hGM-CSF* (D) and *hEGF* (E) specific primers, respectively; Lanes M, the 1 kb Plus DNA Ladder; P, the positive control based on the plasmids containing hGM-CSF:His (upper) and hEGF:His (down); T1~T7, seven independent transformants; N, the negative control based on non-transformed *C. vulgaris*.

*vulgaris*와 형질되지 않은 *C. vulgaris*를 사용하여 TRIzol Plus RNA Purification Kit로 total RNA를 추출하고, RNA 1µg을 사용하여 cDNA 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 형질전환체에서 삽입된 유전자의 특이적 primer를 사용하여 해당 유전자의 mRNA 발현 분석 결과, *hGM-CSF*가 도입된 형질전환체(T1~T7)와 *hEGF*가 도입된 형질전환체(T1~T7)에서 모두 *hGM-CSF*와 *hEGF*가 안전하게 발현되었으며(결과 미제시), Figure 3D에서는 *hGM-CSF:His*

와 *hEGF:His*의 형질전환체 중 대표적으로 T1과 T2 형질전환체에서의 *hGM-CSF*와 *hEGF* mRNA 발현의 증가된 수준을 각각 보여주고 있다. 이들 결과를 바탕으로 GRAS 미세조류인 클로렐라에서 외래 유전자인 *hGM-CSF*와 *hEGF*를 대상으로 이형발현시스템을 적용하고 아그로박테리움 매개 형질전환 방법으로 안정적인 형질전환체 확보와 지속적인 탄소원 glucose를 첨가한 배양에서 도입 유전자의 안정적인 단백질 발현을 확인하였다.

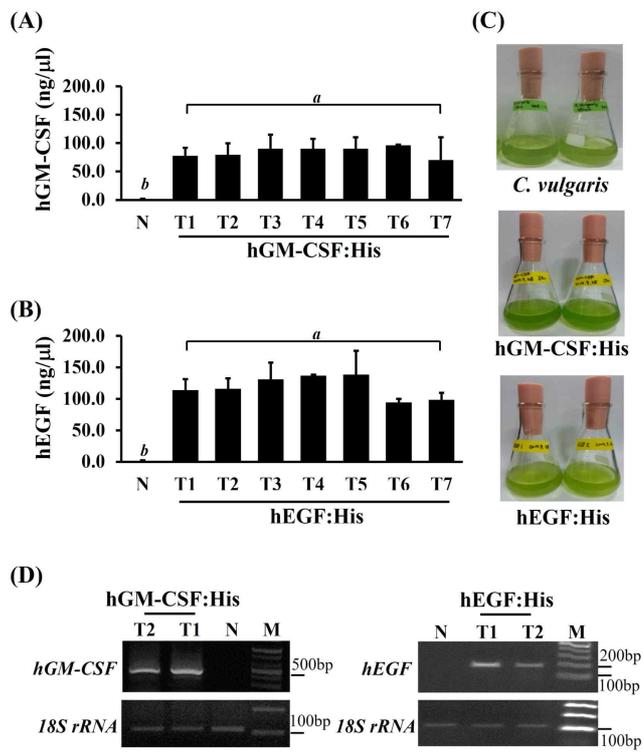


Figure 3. Characterization of transgenic *Chlorella* expressing *hGM-CSF:His* and *hEGF:His*. (A-B) ELISA analysis of the *hGM-CSF:His* and *hEGF:His* expression in *C. vulgaris* transformants, *hGM-CSF:His* and *hEGF:His*. N: the negative control based on non-transformed *C. vulgaris*. The data are averages of three independent experiments, and error bars indicate standard errors (S.E.). Different letters over columns indicate significant differences between groups ($p < 0.05$ when compared to control, N). (C) Flask liquid cultures used for ELISA and RT-PCR analysis in *C. vulgaris* non-transformants and transformants, *hGM-CSF:His* and *hEGF:His*. (D) Semiquantitative RT-PCR analysis of target genes, *hGM-CSF* and *hEGF*, in *C. vulgaris* transformants. The 18S rRNA gene was used as an internal control.

결론

클로렐라는 안전성이 입증된 GRAS 인증재료로, 필수 영양소를 다량 함유하고 있으며 항산화, 항암 및 면역 증진 효과가 있어 건강식품 소재로 널리 사용되고 있다. 포유동물 세포에 비해 훨씬 저렴한 비용으로 대량생산이 가능하고 상대적으로 단시간에 의약 단백질을 생산할 수 있으며, 미생물보다 복잡한 구조의 바이오의약품을 생산하는 데 유리한 점이 많아 산업적 이용 가치가 크다. 본 연구는 클로렐라에서 과립구생성에 중요한 사이토카인 *hGM-CSF*와 피부 세포 성장을 촉진하는 *hEGF* 유용 단백질의 발현이 증가된 형질전환 시스템을 개발하기 위하여 클로렐라 기반으로 *hGM-CSF*와 *hEGF* 염기서열의 코돈을 최적화하여 CaMV 35S 프로모터와 하이그로마이신 저항성을 가지고 있는 식물 바이너리 벡터 pCAMBIA에 클로닝 하였다. 제작된 벡터와 함께 아그로박테리움 매개 공동배양을 포함한 분자유전학적 기법을 적용하여 클로렐라에 형질전환하고 각각의 형질전환 클로렐라 내에서 *hGM-CSF*와 *hEGF*의 삽입을 확인하였다. 삽입된 형질전환 클로렐라에서 *hGM-CSF*와 *hEGF*의 단백질과 전사 수준에서의 전체적인 발현 증가를 ELISA와 RT-PCR로 검증하였다. 클로렐라 내에서 *hGM-CSF*와 *hEGF* 유전자의 전사가 클로렐라 내에서 이루어졌을 뿐만 아니라, 전반적으로 단백질 고효율 발현을 생성하는 형질전환체를 선별하였다. 재생 의료의학을 분야를 비롯하여 화장품과 의약품 소재로 널리 활용되고 있는 *GM-CSF*와 *EGF* 단백질 등의 유용 단백질을 아그로

박테리움 매개 클로렐라 형질전환 시스템을 통해 안정적으로 단백질을 발현시킬 수 있음을 제시하고 있으며, 유용 단백질의 효율적인 대량생산화 및 클로렐라 유래 의학·산업용 단백질 개발에 기여할 수 있을 것이다

References

- Khan, M. I., Shin, J. H. and Kim, J. D. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* 17(1), 36.
- Mehariya, S., Goswami, R. K., Karthikeyan, O. P. and Verma, P. 2021. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. *Chemosphere.* 280, 130553.
- Ummalyma, S. B., Sirohi, R., Udayan, A., Yadav, P., Raj, A., Sim, S. J. and Pandey, A. 2022. Sustainable microalgal biomass production in food industry wastewater for low-cost biorefinery products: a review. *Phytochem. Rev.* 13, 1-23.
- Khavari, F., Saidijam, M., Taheri, M. and Nouri, F. 2021. Microalgae: therapeutic potentials and applications. *Mol. Biol. Rep.* 48(5), 4757-4765.
- Kiran, B. R. and Venkata Mohan, S. 2021. Microalgal Cell Biofactory-Therapeutic, Nutraceutical and Functional Food Applications. *Plants (Basel).* 10(5), 836.
- Xia, D., Qiu, W., Wang, X. and Liu, J. 2021. Recent Advancements and Future Perspectives of Microalgae-Derived Pharmaceuticals. *Mar. Drugs.* 19(12), 70.
- Jareonsin, S. and Pumas, C. 2021. Advantages of Heterotrophic Microalgae as a Host for Phytochemicals Production. *Front Bioeng. Biotechnol.* 9, 628597.
- Siddiqui, A., Wei, Z., Boehm, M. and Ahmad, N. 2020. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 67(1), 30-40.
- Yan, N., Fan, C., Chen, Y. and Hu, Z. 2016. The Potential for Microalgae as Bioreactors to Produce Pharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.* 17(6), 962.
- Sreenikethanam, A., Raj, S., J. R. B., Gugulothu, P. and Bajhaiya, A. K. 2022. Genetic Engineering of Microalgae for Secondary Metabolite Production: Recent Developments, Challenges, and Future Prospects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 836056.
- Yang, B., Liu, J., Liu, B., Sun, P., Ma, X., Jiang, Y., Wei, D. and Chen, F. 2015. Development of a stable genetic system for *Chlorella vulgaris*: a promising green alga for CO₂ biomitigation. *Algal Res.* 12, 134-141.
- Ortiz-Matamoros, M. F., Villanueva M, A. and Islas-Flores, T. 2018. Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Brief. Funct. Genomics.* 17(1), 26-33.
- Ruiz-Ruiz, F., Torres-Acosta, M. A., Garcia-Echauri, S. A., Aguilar-Yanez, J. M., Rito-Palomares, M., and Ruiz-Ruiz, F. 2018. Genetic Manipulation of Microalgae for the Production of Bioproducts. *Front. Biosci.* 10, 254-275.
- Cha, T. S., Yee, W. and Aziz, A. 2012. Assessment of factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(4), 1771-1779.
- Siripornadulsil, S., Dabrowski, K. and Sayre, R. 2007. Microalgal vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 616, 122-128.
- Hawkins, R. L. and Nakamura, M. 1999. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Curr. Microbiol.* 38(6), 335-341.
- Kim, D. H., Kim, Y. T., Cho, J. J., Bae, J. H., Hur, S. B., Hwang, I. and Choi, T. J. 2002. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Mar. Biotechnol (NY).* 4(1), 63-73.
- Shin, J. H., Choi, J., Jeon, J., Kumar, M., Lee, J., Jeong, W. J. and Kim, S. R. 2020. The establishment of new protein expression system using N starvation inducible

- promoters in *Chlorella*. *Sci. Rep.* 10(1), 12713.
19. Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(2), 211-222.
 20. Fu, H., Liang, Y., Zhong, X., Pan, Z., Huang, L., Zhang, H., Xu, Y., Zhou, W. and Liu, Z. 2020. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression. *Sci. Rep.* 10(1), 17617.
 21. Schutz, A., Bernhard, F., Berrow, N., Buyel, J. F., Ferreira-da-Silva, F., Haustraete, J., van den Heuvel, J., Hoffmann J. E., de Marco A., Peleg Y., Suppmann, S., Unger, T., Vanhoucke, M., Witt, S. and Remans, K. 2023. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. *STAR Protoc.* 4(4), 102572.
 22. Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 783-836.
 23. Anderlini, P., Przepiorka, D., Champlin R. and Korbling M. 1996. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood.* 88, 2819-2825.
 24. Becher, B., Tugues, S. and Greter, M. 2016. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity.* 45(5), 963-973.
 25. Hamilton, J.A. 2020. GM-CSF in inflammation. *J. Exp. Med.* 217(1), e20190945.
 26. Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V. and Girolomoni, G. 2008. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 128(6), 1365-1374.
 27. Berlanga-Acosta, J., Gavilondo-Cowley, J., Lopez-Saura, P., Gonzalez-Lopez, T., Castro-Santana, M. D., Lopez-Mola, E., Guillen-Nieto, G. and Herrera-Martinez, L. 2009. Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int. Wound J.* 6(5), 331-346.
 28. Shin, S. H., Koh, Y. G., Lee, W. G., Seok, J. and Park, K. Y. 2023. The use of epidermal growth factor in dermatological practice. *Int. Wound J.* 20(6), 2414-2423.
 29. Fukuzawa, H., Fujiwara, S., Yamamoto, Y., Dionisio-Sese, M. L. and Miyachi, S. 1990. cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: regulation by environmental CO₂ concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 87(11), 4383-4387.
 30. Froger, A. and Hall, J. E. 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J. Vis. Exp.* 6, 253.
 31. Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M. and Schell, J. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163, 181-187.
 32. Hofgen, R. and Willmitzer, L. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16(20), 9877.
 33. Weeks, D. P., Beerman, N. and Griffith, O. M. 1986. A small-scale five-hour procedure for isolating multiple samples of CsCl-purified DNA: application to isolations from mammalian, insect, higher plant, algal, yeast, and bacterial sources. *Anal. Biochem.* 152(2), 376-385.
 34. Vennapusa, A. R., Somayanda1, C. J. and Jagadish, S. V. K. 2020. A universal method for highquality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. *Scientific Rep.* 10, 16887.
 35. Dasan, Y. K., Lam, M. K., Yusup, S., Lim, J. W., Show, P. L., Tan, I. S. and Lee, K. T. 2020. Cultivation of *Chlorella Vulgaris* Using Sequential-Flow Bubble Column Photobioreactor: A Stress-Inducing Strategy for Lipid Accumulation and Carbon Dioxide Fixation. *J. CO2 Util.* 41, 101226.
 36. Diaz C. J., Douglas, K. J., Kang, K., Kolarik, A. L., Malinowski, R., Torres-Tiji, Y., Molino, J. V., Badary, A. and Mayfield, S. P. 2023. Developing algae as a sustainable food source. *Front. Nutr.* 9, 1029841.
 37. Amack, S. C. and Antunes, M. S. 2020. CaMV35S promoter-a plant biology and biotechnology workhorse

in the era of synthetic biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 100-179.

38. Harmoko, R., Fanata, W. I., Yoo, J. Y., Ko, K. S., Rim, Y. G., Uddin, M. N., Siswoyo, T. A., Lee, S. S., Kim, D. Y., Lee, S. Y. and Lee, K. O. 2013. RNA-dependent RNA polymerase 6 is required for efficient hpRNA-induced gene silencing in plants. *Mol. Cells.* 35(3), 202-209.