



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0116072
(43) 공개일자 2010년10월29일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) C07K 14/475 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0034803

(22) 출원일자 2009년04월21일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

주식회사 캐러스

광주광역시 북구 오룡동 1 광주과학기술원 창업지원센터 213호

(72) 발명자

김성준

광주광역시 광산구 양동 187-16

전홍성

광주 북구 문흥1동 현대아파트 102-203

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최성용

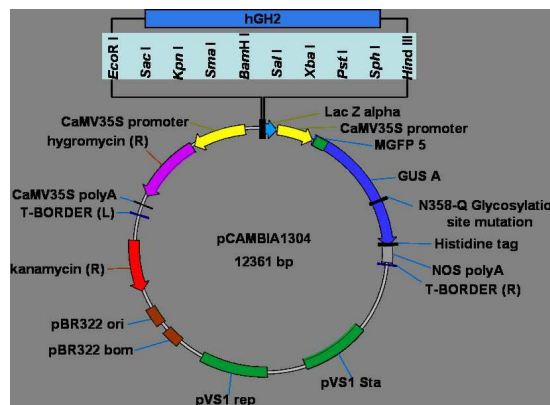
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 버섯형질전환을 이용한 재조합단백질 생산 방법 및 그의 산물

(57) 요약

본 발명은 버섯형질전환을 이용한 재조합단백질의 생산 방법 및 이 방법에 의해 제조된 재조합 단백질에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 형질전환 균사체의 대량생산체계 확립과 생산된 균사체의 단백질 정제 및 생물학적 활성연구가 병행되어지면 인간 재조합 단백질 생산을 위한 새로운 미생물 생산시스템으로의 활용이 가능할 것으로 사료되어진다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김승

광주광역시 서구 풍암동 1132 풍암우미아파트
102-309

최봉석

광주 북구 오치동 1033-1번지

박세은

광주 북구 두암3동 920-8번지

김봉수

광주광역시 북구 용봉동 현대아파트 302-108

정남준

대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 101-402

전민규

경상남도 진주시 신안동 평거현대아파트 101-1202

서현정

광주광역시 광산구 월계동 삼성아파트 106-101

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 기능성 단백질을 생산하는 발현백터를 구축하는 단계,
- b) 아그로박테리움 진공 침투(Agrobacterium vacuum infiltration) 방법 또는 입자 포격(particle bombardment) 방법을 이용하여 구축된 발현백터를 버섯에 형질전환시키는 단계,
- c) 얻어진 형질전환체의 유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 각각의 genomic DNA를 분리하여 프라이머(primer)를 이용한 PCR을 실시하여 기능성 단백질의 형질전환균사체를 확인하거나 또는 서던 블롯(southern blot) 과 노던 블롯(northern blot)을 실시하여 형질전환체의 유전자 발현여부를 확인하는 단계, 및
- d) 최종적으로 형질전환균사체로부터 기능성 단백질을 분리하는 단계
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 버섯류에서 기능성 단백질을 생산하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 버섯이 큰노타리버섯인 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 a)에서 E. coli DH5 α와 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 균주에 hGH2와 hIL32가 포함된 2개의 백터를 구축하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 따른 방법에 의해 생산된 것을 특징으로 하는 기능성 단백질

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 기능성 단백질이 인간 성장호르몬인 또는 인간 인터루킨32인 것인 단백질.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 버섯형질전환을 이용한 재조합단백질의 생산 방법 및 이 방법에 의해 제조된 재조합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이오 신소재로 각광받고 있는 유용단백질 소재는 학문 분야에서는 연구의 수단으로, 산업 분야에서는 기술 개발의 도구 및 최종 제품으로 점차 그 활용 폭을 확대해 나가고 있으며, 여러 산업들에 파급 효과가 매우 커서, 국가 산업 측면에서 중요성이 부각되고 있다.

[0003] 산업자원부의 산업기술개발 사업보고서에 의하면 단백질 제품의 세계 시장 규모는 1997년 188억 달러에서 2001년에 2 배에 달하는 363억 달러가 되었고, 이후 지속적인 성장을 거듭하여 2011년에는 1,100억 달러에 이를 것으로 추산되어진다. 이중 산업용 단백질에 비해 의약품 단백질이 차지하는 비중은 계속 커져서 2011년에는 4 배가 넘는 수준이 될 것으로 예상되어진다. 특히, 의약품 단백질은 바이오산업의 40% 이상을 차지하며 황금알을 낳는 고부가가치의 산업으로 전 세계적으로 100개 이상의 다국적기업이 참여하고 있는 것으로 보고 되어지고 있다.

[0004] 의약품 단백질 또는 산업용 효소의 경제적인 생산을 위해 이들 단백질을 효과적으로 생산할 수 있는 숙주 또는 재조합 시스템의 선정은 생산성, 생산된 단백질의 활성 여부 및 이후 모든 공정에 영향을 미친다는 측면에서 매우 신중히 고려되어야 한다. 현재 주로 이용되고 있는 외래 단백질 생산 숙주로는 대장균(*Escherichia coli*)을 비롯하여, 그람 양성 세균, 효모(yeast), 곰팡이, 곤충 세포(insect cell) 그리고 동·식물 또는 그들의 세포

등이 있다.

[0005] 대표적인 발현 시스템으로는 대장균이나 효모와 같은 미생물을 이용하거나 곤충세포, 동물세포를 이용하는 방법이 있는데 이들 발현 시스템은 각기 장단점을 가지고 있다. 미생물을 이용한 발현 시스템으로 널리 사용되어지고 있는 *E. coli*의 경우 다양한 발현 시스템이 개발되어 있고, 외래 단백질의 발현을 또한 매우 높으며 균체의 성장 속도가 빠른 점 등의 장점이 있다. 그러나 인체 cytokine 등과 같은 고등생물 유래의 단백질을 재조합 생산하고자 할 때 glycosylation 등과 같은 post-translational modification이 불가능하며 배양배지로의 단백질 완전 분비가 어렵고 disulfide bond가 많은 단백질의 경우 folding이 불가능하며 단백질 생산 형태에 있어서도 inclusion body와 같은 불용성 단백질 형태로 생산되어 활성을 갖지 못하는 점 등의 단점이 있다. Mammalian cell 이나 insect cell의 경우에는 복잡한 인체 단백질을 대부분 원형 생산이 가능하지만 단백질 생산 세포의 개발 기간이 길고 배양 시간이 오래 걸리며 전반적인 생산비용이 비싼 단점이 있다. 반면 진핵 미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로써 인체에 무해하며 유전자 조작이 편리하고 여타의 미생물과 마찬가지로 다양한 발현시스템이 개발되어 있으며 비교적 적은 비용으로 세포의 대량 배양 및 단백질 생산이 가능하다. 또한 인체 의약적으로 중요한 대부분의 단백질이 막단백질 혹은 당단백질이기 때문에 활성을 갖기 위해서는 분비 과정을 통한 folding 및 glycosylation이 필수적인데 효모 *S. cerevisiae*의 경우 발현된 단백질을 세포 밖으로 분비할 수 있는 능력이 뛰어나며 glycosylation과 같은 post-translation modification이 가능한 장점이 있다. 그러나 이러한 많은 장점에도 불구하고 효모를 이용한 인체단백질 분비시스템은 단백질의 종류에 따라 생산을 편차가 크다는 문제점을 가지고 있다. 예를 들어 HSA(Human Serum Albumin)의 경우 수 g/L 수준이 분비 생산되지만 hIL(Human Interleukin)의 경우 거의 분비 생산되지 않는 것으로 알려져 있다.

[0006] 바이오 의약품 개발 초기에 Amgen, Chiron, Genentech 등 다수의 제약 회사에서 효모를 숙주로 사용하기 위한 많은 연구가 진행되었으나, 단백질 종류에 따라 분비가 불가능하거나 분비 생산성이 매우 낮은 문제점 때문에 개발이 지연되고 왔고 결과적으로 미국과 유럽에서 효모를 이용한 단백질의약품의 생산 예는 다른 발현시스템에 비하여 상대적으로 적은 편이다. 이러한 여러가지 문제로 인하여 현재 새로운 생물 공장의 필요성이 대두 되고 있으며, 그 중에서 시도 되어지고 있는 미생물이 담자균류(Basidiomycetes) 즉, 버섯(Mushroom)을 이용하여 단백질을 생산하는 기술을 개발하는 것이다. 그러나 현재까지 버섯을 이용한 연구로는 양송이버섯을 이용한 hygromycin B phosphotransferase (hph) 유전자, EGFP(enhanced green fluorescent protein) 유전자의 형질전환연구 및 느타리버섯, 팽이버섯, 표고버섯, 재먹물버섯을 이용한 유전자 클로닝의 시도가 전부라 할 수 있을 만큼 연구범위가 한정적이고 상업적으로 이용 가능한 실용적인 단백질 생산에 관한 연구는 아직까지 이루어지지 않고 있다.

[0007] 전통적으로 버섯은 식용 및 약용식품으로 여겨져 왔으며, 그로 인해 분자생물학적 연구가 많이 진행되지 못한 것은 부정할 수 없는 현실이다. 버섯은 분류학상으로 고등균류 중 진균류(Eumycetes)에 속하며, 대부분은 담자균류에 속한다. 이러한 버섯은 독특한 맛과 향이 뛰어나 기호성이 높은 식품으로 이용되어져 왔고, 당질, 단백질, 비타민, 아미노산, 무기질 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양소를 골고루 함유하고 있으며, 광범위한 약리작용도 나타내므로 예로부터 전통식품 및 민간약의 제제로서 널리 이용되어져 왔을 뿐만 아니라 항암활성, 면역증강 등의 효능작용 때문에 최근에는 기능성 식품 및 의약품 소재로 많이 이용되고 있다. 생산량이 한정된 호르몬, 항체, 백신 및 생체기능성 단백질과 같은 유용 단백질을 미생물 숙주세포에서 대량 생산하여 의약품으로 개발하는 재조합 단백질 의약품 생산기술은 미생물을 세포공장(cell factory)으로 활용하는 대표적인 미생물 이용 기술로 부상되었다. 더욱이 인류의 보건 복지가 향상됨에 따라 난치성 질환의 치료를 위한 고순도의 단백질성 의약품에 대한 수요가 기하급수적으로 증가되고 있어서 저렴한 비용으로 대량생산이 가능한 미생물 발현시스템을 이용한 재조합 의약품 생산기술 개발은 미래 의약산업의 성장에 크게 기여할 것으로 예측되고 있다. 또한 인간 게놈 프로젝트의 완성 이후 신약 개발을 위한 신규 단백질 수요가 폭발적으로 증가하며 단백질 구조 및 기능 분석을 위한 초고속 발현 시스템에 대한 수요도 급증하고 있는 상황이다.

[0008] 그러나 많은 경우, 의약품으로 개발될 잠재성 높은 인체 유래의 단백질들은 기존 미생물 기반 발현 기술로는 발현 효율이 매우 저조하므로 이들 난 발현 단백질(difficult-to-express proteins) 관련 문제들을 해결하기 위한 혁신적인 기술 개발의 필요성이 대두되고 있으며, 의약품 단백질의 post-translational modification은 치료 효능, 체내 안정성 및 면역 부작용 등에 중요한 영향을 미친다는 사실이 알려지면서, 생산량(quantity) 보다 원형 단백질과 동일하거나 그 이상의 품질(quality)을 지닌 단백질을 생산할 수 있는 기술의 개발이 중요해지고 있는 실정이다. 또한, 미생물 활용 재조합 의약품 단백질 개발 분야의 경우 생산기술의 근간이 되는 신규 고발현 시스템 개발, 유전체 정보 기반의 고기능 숙주세포 재설계, 고성능 생산균주의 대량 배양에 관한 분자생물공정 기

술 개발 등이 국제시장 개방과 함께 국가 경쟁력 강화를 위한 중요한 분야로 대두되고 있다.

[0009] 현재까지 버섯류에서 유용한 물질을 생산하는 유전자를 도입하려는 형질전환시스템은 시도된 바가 매우 드물고 성공한 사례를 찾아보기가 어려웠다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 기존에 식물의 형질전환방법으로 주로 사용되어져 왔던 *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation 방법과 Particle bombardment 방법을 버섯에 접목하여 재조합단백질을 생산할 수 있는 새로운 버섯형질전환 기술을 개발하고자 예의 연구한 결과, 유용한 물질을 버섯 형질전환에 의해 생성할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제 해결수단

[0011] 따라서, 본 발명은 버섯형질전환을 이용한 재조합단백질의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명의 목적은, 추가의 일면에 있어서, 상기 방법에 의해 제조된 재조합 단백질을 제공하는 데 있다.

효 과

[0013] 본 발명에 따르면, 형질전환 균사체의 대량생산체계 확립과 생산된 균사체의 단백질 정제 및 생물학적 활성연구가 병행되어지면 인간 재조합 단백질 생산을 위한 새로운 미생물 생산시스템으로의 활용이 가능할 것으로 사료되어진다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 버섯형질전환을 이용한 재조합단백질의 생산 방법 및 이 방법에 의해 제조된 재조합 단백질을 제공한다.

[0015] 구체적으로 본 발명은

[0016] a) 기능성 단백질을 생산하는 발현백터를 구축하는 단계,

[0017] b) 아그로박테리움 진공 침투(*Agrobacterium vacuum infiltration*) 방법 또는 입자 포격(*particle bombardment*) 방법을 이용하여 구축된 발현백터를 버섯에 형질전환시키는 단계,

[0018] c) 얻어진 형질전환체의 유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 각각의 genomic DNA를 분리하여 프라이머(*primer*)를 이용한 PCR을 실시하여 기능성 단백질의 형질전환균사체를 확인하거나 또는 서던 블롯(*southern blot*)과 노던 블롯(*northern blot*)을 실시하여 형질전환체의 유전자 발현여부를 확인하는 단계, 및

[0019] d) 최종적으로 형질전환균사체로부터 기능성 단백질을 분리하는 단계

[0020] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 버섯류에서 기능성 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0021] 이를 위하여 먼저 본 발명에 따라 재조합 유전자 발현백터 제작하였다. 버섯 형질전환을 위해 hGH2 와 hIL32 유전자가 포함된 발현백터를 제작하여 *E. coli*와 *A. tumefaciens*에 형질전환시켜 최종적으로 두가지의 백터를 제작하였다. 제작된 발현백터를 유전자의 primer와 백터의 primer를 서로 엮갈려 사용하여 결과를 얻음으로 삽입된 유전자의 진위여부 및 recombinant strain을 최종적으로 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 도입하고자 했던 각각의 유전자의 형질전환이 정확하게 이루어졌음을 최종적으로 확인할 수 있었다. 얻어진 결과를 토대로 *Agrobacterium*으로 구축되어진 각각의 유전자백터가 최종 형질전환된 것을 확인하였으며, 버섯으로 형질전환시키기 위한 백터의 구축이 확립되었음을 확인할 수 있었다. 또한 기존에 식물의 형질전환에 이용되었던 pCambia 백터를 미생물에 접목하여 확인한 결과로써 식물에 이용되던 백터가 버섯에도 접목 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0022] 본 발명에 의하여 재조합 유전자 형질전환체를 분석하고, 재조합 단백질을 발현시켰다. *Agrobacterium vacuum infiltration* 및 *particle bombardment* 방법을 통한 형질전환 후 항생제 선별배지에서 분리한 각각의 형질전환 균사체들의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 균사체에서 genomic DNA를 분리하여 primer를 이용한 PCR을 실시한 결과 positive control로 쓰였던 각각의 유전자 증폭영역의 크기와 일치하는 결과를 보여주었다. 반면, 비형

질 전환 균사체의 경우에는 유전자의 증폭이 이루어지지 않음을 확인하였다. 위의 결과들로 비추어 볼 때 GUS의 조직화학적 분석에서 보여졌던 결과들이 단지 *Agrobacterium*에서 기인한 결과가 아닌 형질전환된 버섯에서 나타난 결과임을 재차 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 particle bombardment 방법으로 실시한 형질전환방법으로도 버섯의 형질전환이 가능할 것으로 판단되었다. 버섯으로의 유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 southern blot을 실시한 결과 형질전환된 균사체에서 genomic DNA에 삽입된 유전자의 위치에 따라 적게는 1개에서 많게는 3개 정도의 다양한 밴드가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 RNA의 발현 여부를 확인하기 위하여 northern blot을 실시한 결과 각각의 유전자의 해당부위에서 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 버섯으로 형질전환된 hGH2와 hIL32의 유전자가 버섯균사체내에서 전사과정이 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 재조합 단백질의 버섯내에서의 발현 가능성을 내포하는 결과로 확인할 수 있었다. 최종적으로 형질전환 버섯균사체에서 재조합 단백질의 발현유무를 확인하기 위하여 western blot 실시하여 확인한 결과 각각의 생산 단백질의 분자량인 22kDa(hGH2), 15kDa(hIL32)에서 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0023] 또한 western blot 결과에서 보여진 단백질의 발현수준은 northern blot을 통해 확인한 RNA의 발현수준에 비례하여 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0024] 향 후 형질전환 균사체의 대량생산체계 확립과 생산된 균사체의 단백질정제 및 생물학적 활성연구가 병행되어지면 인간 재조합 단백질 생산을 위한 새로운 미생물 생산시스템으로의 활용이 가능할 것으로 사료되어진다.

[0025] 최근 난치성 질환의 증가와 국민의료 수준의 향상에 따라 고순도 재조합 단백질성 의약품의 수요가 급증하면서 의약품 재조합 단백질이 건강관련 생명공학 분야에서 차지하는 비중이 매우 높아지고 있다. 재조합 단백질의 제조의 기술은 1970년대 중반부터 시작된 이래로 그 적용의 범위가 빠른 속도로 확대되어 이제 기초연구분야에서는 빈번히 쓰이는 기본적인 도구로, 생산 기술 분야에서는 인체용 의약품의 제조뿐만 아니라 농수산 관련의 범용성 단백질 제품의 생산에까지 그 사용범위가 넓어지고 있는 추세이다. 인체 치료용 재조합의약품 및 산업효소를 포함하는 단백질 소재 시장은 향 후 몇 년 이내에 수천억 달러에 달할 것으로 전망되나, 신약개발을 위한 신규단백질 수요가 폭발적 증가세를 보이고 있으나 현재 다양한 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 범용 발현시스템이 없는 현실이다. 현재 인체단백질 및 산업효소를 포함하는 단백질 소재는 대부분 유전자재조합 기술로 대장균 및 효모를 포함하는 미생물 또는 포유동물세포를 이용하여 제조되고 있다. 대량의 재조합단백질을 동시에 생산하기 위해서는 균주의 조작이 용이하고 대량 배양이 쉬운 대장균이나 효모 등의 미생물이 유리하지만 인체 유래의 복잡한 단백질을 원형(authentic form)으로 생산하기 힘든 문제를 안고 있다. 또한 동물세포나 식물세포를 이용하는 경우에는 복잡한 단백질의 원형생산이 가능하지만, 생산속도세포의 개발기간이 길고 배양시간이 오래 걸리며 배지비용이 고가이기 때문에 전반적인 비용이 비싸다는 단점이 있다. 따라서 현재 재조합단백질은 생산된 단백질이 얼마나 인체단백질에 가까운지(authenticity)와 생산된 단백질이 얼마나 순수하게 생산되는지가 가장 중요한 변수로 인식되고 있다. 따라서 고부가가치의 단백질을 고품질, 고효율로 대량 생산할 수 있는 시스템의 개발이 현재 절실히 요구 되어지고 있다.

[0026] 이에 본 발명에서는 이러한 시대적 추세에 따라 기존에 단백질 생산에 있어 여러가지 문제점을 내재한 미생물을 이용한 재조합 단백질 생산이 아닌 미생물과 식물의 장점을 두루 갖춘 버섯을 이용한 새로운 재조합 단백질 생산시스템을 개발하고자 하였다.

[0027] 본 실험에서 사용한 버섯인 큰느타리버섯에서 재조합 단백질을 생산하기 위하여 먼저 발현백터를 구축을 실시한 결과, 1차적으로 *E. coli* DH5α와 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 균주에 hGH2와 hIL32가 포함된 2개의 백터 구축을 완성하였다. 구축된 발현백터를 버섯에 형질전환 시키기 위하여 *Agrobacterium* vacuum infiltration 방법과 particle bombardment 방법을 이용하였다. *Agrobacterium* vacuum infiltration 방법을 이용한 버섯형질 전환을 실시하여 일차적으로 hygromycin 내성을 가진 형질전환체를 얻을 수 있었다. 얻어진 형질전환체의 유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 각각의 genomic DNA를 분리하여 primer를 이용한 PCR을 실시하여 각각 hGH2 3개와 hIL32 4개의 형질전환균사체를 확인하였다. 또한 southern blot과 northern blot을 실시하여 형질전환체의 유전자 발현여부를 확인할 수 있었다. 최종적으로 형질전환균사체의 단백질을 분리하여 균사체에서 인간단백질 발현여부를 확인하기 위해 western blot을 실시한 결과 인간 유래 재조합 단백질인 hGH2와 hIL32가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또 다른 형질전환방법으로 사용된 Gene Gun을 이용한 particle bombardment 방법을 사용하여 버섯의 형질전환을 실시한 결과 *Agrobacterium* vacuum infiltration 방법과 동일하게 형질전환체를 얻을 수 있었다. Particle bombardment 방법으로 얻어진 형질전환체 또한 같은 방법으로 형질전환 유무를 확인한 결과 최종적으로 형질전환체에서 단백질 발현을 확인할 수 있었다. 위의 두 가지 방법으로 형질전환을 실시하여 hGH2 5개, hIL32 8개의 형질전환버섯균사체를 얻을 수 있었다.

[0028] Agrobacterium vacuum infiltration 방법과 particle bombardment 방법을 이용한 버섯의 형질전환은 모두 사용 가능할 것으로 판단되어지나, 실험의 편리성 및 형질전환체의 선별기간 측면에서 볼 때 particle bombardment 방법이 좀더 효율적일 것으로 판단된다. 또한, 개발된 형질전환 방법을 통하여 생산되는 재조합 단백질을 기능성식품 원료에 응용하여 "Food as Medicine" 의 개념으로 개발한다면 높은 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 보여진다. 그리고 향 후 지속적인 연구를 통하여 버섯에서 보다 자연 원형상태에 가까우면서 생리활성이 유지된 상태로 재조합 단백질을 생산하며 그 생산성을 극대화 하기 위한 공동의 노력이 생리학자, 분자 유전학자, 그리고 발효기술자간의 연계적 연구를 통해 계속적으로 유지된다면, 우리의 전통적인 먹거리인 버섯이 재조합 의약품 생산을 위한 숙주 시스템으로서의 새로운 모델이 될 것으로 사료된다.

[0029] <실시예>

[0030] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의하여 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0031] 균주 및 유전자

[0032] 본 실험에 사용된 균주는 조선대학교 생명공학과 신경분자생물학실험실에서 분양받은 E. coli DH5 α 와 (주)넥스젠 중앙연구소로부터 분양받은 Agrobacterium tumefaciens GV3101를 사용하였으며, 균주의 증식을 위하여 사용된 배지로는 LB 배지(1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다. 또한 단백질발현 시스템개발을 위해 사용된 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)의 자실체는 전북 김제에 소재한 송이농산으로부터 제공받아 사용하였다. 형질전환을 위해 사용된 유전자인 hGH2 와 hIL32 는 한국생명공학연구원 21C Frontier Human Gene Bank 에서 구입하여 사용하였으며, pCambia1304 벡터는 BioForge로부터 구입하여 사용하였다.

[0033] 실시예 1: 벡터 제작(Vector construction)

[0034] (1) 재조합 hGH 유전자 발현벡터 제작

[0035] 버섯에서 인간단백질 유전자를 발현시키기 위하여 식물형질전환 벡터로 많이 사용되는 pCambia1304 벡터를 이용하였다. 구입한 pDNR-LIB vector에 삽입 되어있던 hGH2는 Hind III와 EcoRI 로 절단하여 준비하고 pCambia1304 벡터 또한 같은 제한효소로 처리하여 ligation 후, E.coli DH5 α 에 형질전환하여 50μg/ml kanamycin 함유 고체배지에서 성장시킨 다음 같은 농도의 kanamycin 함유 액체배지에서 배양하였다. 도 1은 본 발명에 따른 재조합 인간 성장 호르몬을 포함하는 발현벡터의 제작과정을 나타내는 도면이다.

[0036] 배양한 형질전환체의 DNA를 분리하여 Hind III, EcoRI 로 절단하여 1.1kb 사이즈 크기의 밴드 결과를 얻을 수 있었으며, 제한효소 처리결과 삽입된 유전자의 사이즈가 구입한 유전자와 일치하는 1.1kb 사이즈를 확인할 수 있었다. 또한 유전자의 도입여부를 정확하게 확인하기 위하여 제작된 프라이머(primer)를 사용하여 cross primer PCR을 수행한 결과 재조합 균주(recombinant strain)임을 확인할 수 있었다.

[0037] (2) 재조합 hIL32 유전자 발현벡터 제작

[0038] hIL32 유전자를 가지고 있는 pOTB7 vector를 Sma I, EcoRI 로 절단하여 얻은hIL32 유전자를 동일한 효소로 처리한 pCambia1304 vector에 ligation하여 kanamycin 함유 selection medium에서 배양시켜 E. coli 형질전환체를 선별하였다. 도 2는 본 발명에 따른 재조합 인간인터루킨32를 포함하는 발현벡터의 제작과정을 나타내는 도면이다.

[0039] 또한, 각 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여 kanamycin 50μg/ml 농도의 액체배지에서 배양한 뒤 선별된 형질전환체의 DNA를 분리하여 Sma I, EcoRI 로 절단하여 전기영동을 실시한 결과 구입 유전자를 처리했을 때와 동일한 1.2kb의 유전자를 확인할 수 있었다. 또한 유전자의 형질전환 여부를 최종 확인하기 위하여 제작된 primer를 사용하여 cross primer PCR을 수행하였다. 그 결과 예상한 사이즈인 1.2kb 크기에서 밴드가 증폭됨을 확인할 수 있었다.

[0040] 실시예 2: 아그로박테리움(Agrobacterium) 형질전환체 제작

- [0041] hGH2, hIL32 유전자를 버섯에 형질전환시켜 재조합 단백질생산 연구를 수행하고자 형질전환용 벡터인 pCambia1304를 사용하였다. E.coli DH5α에 도입된 재조합 균주의 plasmid DNA를 분리하여 Freeze-thaw법에 의하여 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 형질전환하였다.
- [0042] 50ml LB 배지에 *Agrobacterium*을 접종하여 28℃, 120rpm 조건으로 OD₆₀₀ 값이 0.5~1.0 이 될 때까지 진탕 배양한 후 얼음에 넣어 5분간 냉각시키고, 3,200 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 cell에 20Mm CaCl₂ 1ml을 가하여 현탁하고, 여기에 미리 Qiagen minipreps kit로 분리해 놓은 각각의 DNA를 첨가하고 액체 질소에 넣어 급냉시킨 다음 37℃ 배양기에서 5분간 반응하였다. 반응 후 400μl의 LB 배지를 첨가하여 28℃에서 4시간 배양하였다. 배양액을 100 μg/ml kanamycin이 함유된 LB 고체배지에 도말하여 28℃에서 배양하였다. 배양 후 48시간이 지난 뒤 LB 고체배지에 형성된 colony를 100 μg/ml kanamycin 함유 LB 액체 배지에서 증식시켜 버섯 형질전환의 매개체로 사용하였다. 한편, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 형질전환된 DNA의 도입여부를 확인하기 위하여 *Agrobacterium* plasmid quick screen법에 의하여 선별배지에서 증식한 GV3101의 DNA를 분리하여 각각의 primer를 사용한 cross primer PCR 을 실시하여 유전자 도입여부를 최종 확인하였다. 그 결과, hGH2, hIL32 유전자 제작 primer 사이지인 314bp(hGH2), 224bp(hIL32)의 크기에서 밴드가 증폭되어짐이 확인되었다.
- [0043] **실시예 3: 진공 침투(vacuum infiltration)에 의한 버섯 형질전환**
- [0044] 도 3은 아그로박테리아 감염을 이용한 버섯형질전환 방법 과정을 나타낸다. 이를 참조하여 형질전환 과정을 설명하자면, 재조합 DNA가 도입된 *Agrobacterium*을 LB배지에 접종하여 28℃, 120rpm 조건으로 48시간 배양하여 OD₆₀₀1.8~2.0까지 증식시킨 후 4600rpm에서 30분간 원심분리하여 *Agrobacterium* cell을 준비하였다. 상기 *Agrobacterium* cell에 동량의 10Mm MgCl₂를 가하여 현탁한 후 다시 4600 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심 분리된 cell에 적정량의 10Mm MgCl₂를 가하여 최종적으로 OD₆₀₀ 1.0으로 조정하였다.
- [0045] 송이농산으로부터 제공받은 큰느타리버섯은 자실체부분을 무균적으로 0.5 x 0.5cm의 크기로 절단하고, 절단한 버섯조직을 OD₆₀₀ 1.0으로 조정하여 상기 *Agrobacterium* 현탁액에 넣고 vacuum desiccator에서 서서히 진공상태로 만들어 주면서 *Agrobacterium* 현탁액이 버섯조직에 충분히 침투되도록 약 15분 동안 진공상태를 유지시켰다. 진공상태가 해제된 후 현탁액 상부에 떠 있던 버섯조직이 밑으로 가라앉는 것을 확인하였다.
- [0046] 버섯조직 표면에 남아있던 과잉의 수분을 whatman No.2 filter paper를 이용하여 최대한 제거하고 petridish에 담아 parafilm으로 밀봉한 후 10일 동안 25℃ 암 조건에서 subculture 하였다. 이때 petridish안에 수분이 과잉으로 발생하면 parafilm을 벗겨내어 무균적으로 수분을 제거해준다. 1차 배양이 끝난 버섯조직을 30μg/ml hygromycin과 40μg/ml cefotaxim 이 함유된 LB 고체배지에서 형질전환체 성장을 유도하였다.
- [0047] 형질 전환된 균사체를 유도한 결과 배양 10일 후 비형질전환 버섯조직은 균사체 성장이 이루어지지 않았으나, 형질전환된 버섯조직은 선별배지 표면에서 균사체 성장이 이루어짐을 확인 할 수 있었다. 또한, 대조군으로 사용된 일반 큰느타리버섯의 조직은 항생제가 함유된 배지에서 성장이 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다.
- [0048] **실시예 4: 입자 폭격(particle bombardment)에 의한 버섯 형질전환**
- [0049] 송이농산으로부터 제공받은 큰느타리버섯을 무균적으로 0.2 x 0.2cm 크기로 잘게 잘라 LB 고체배지 중앙부에 평균직경 2.5cm 내에 20 ~ 25개 치상하여 준비한 후 bombardment용 재료로 사용하였다. Bombardment 용 DNA 역시 *Agrobacterium* vacuum infiltration 때와 같은 DNA를 사용하였다. Particle bombardment 기기로는 Bio Rad 사의 'PDS-1000'을 사용하여 70cmHg의 진공상태에서 헬륨가스를 이용하여 bombarding 하였다. 60mg의 gold particle(직경 : 0.6μm)에 DNA를 5μg/μl 의 농도로 3.5M CaCl₂ 및 0.1M spermidine을 이용하여 코팅한 후, 6μl 입자 용액을 microcarrier 전면에 도말하여 건조한 후 1300psi 헬륨가스 압력으로 버섯조직과의 거리를 9cm로 조정한 후 bombarding 하였다.
- [0050] 형질전환체 선발유전자로 hygromycin resistance 유전자를 이용하기 위하여 50μg/ml hygromycin 이 함유되어 있는 LB고체배지에 bombarding 한 버섯조직을 치상하여 7일 동안 암 배양한 후 형질전환 균사체 형성을 확인하였다. 배양 6일 후부터 kanamycin에 내성을 보이는 형질전환체들은 버섯조직 위로 균사체를 형성하기 시작하였으나, *Agrobacterium*형질전환과 마찬가지로 형질전환이 이루어지지 못한 버섯조직에서는 hygromycin 항생제의 영

향으로 균사체 형성이 이루어지지 못하였음을 확인할 수 있었다. 1차 성장한 형질전환 균사체중 배지표면으로 균사체가 형성된 부분을 절단하여 다시 50 μ g/ml hygromycin 이 포함된 LB 배지로 계대배양하여 최종적으로 형질 전환균사체를 순수분리하였다.

[0051] **실시예 5: 형질전환체 선별**

[0052] Agrobacterium vacuum infiltration을 실시한 후 버섯조직 표면에 남아있는 Agrobacterium 현탁액을 제거하기 위하여 멸균된 3차 증류수로 3회 세척한 다음 멸균된 whatman No.2 filter paper 위에 15분간 방치하여 조직 표면에 남아있는 수분을 최대한 제거하였다. 수분이 제거된 버섯조직을 Petri dish에 parafilm으로 밀봉한 후 25℃에서 10일 동안 암 배양하였다. 10일간의 암 배양이 끝난 후 버섯조직을 hygromycin 30 μ g/ml 과 cefotaxim 40 μ g/ml 이 함유되어 있는 selection medium 에 옮겨 10일 동안 배양 한 후 배지 표면위로 균사체가 형성되어진 형질전환체를 선별하였다.

[0053] Particle bombardment 후 DNA가 bombarding 된 버섯조직을 멸균된 핀셋을 사용하여 hygromycin 50 μ g/ml 이 함유되어 있는 selection medium 에 옮겨 7일 동안 배양 한 후 균사체가 형성되어진 형질전환체를 선별하였다.

[0054] **실시예 6: 형질전환체의 재분화**

[0055] Agrobacterium vacuum infiltration 방법과 particle bombardment 방법으로 형질전환 실시 후 각각의 selection medium 에서 성장한 형질전환 균사체를 hygromycin 50 μ g/ml 이 함유된 LB 고체배지에 재접종하여 최종적으로 형질전환체를 선별하였으며, 순수분리한 형질전환체를 PDA(potato extract 20%, dextrose 2%, agar 1.5%) 배지에 보관하여 사용하였다.

[0056] **실시예 7: 형질전환 균사체 액체배양**

[0057] 각각의 형질전환 균사체 액체배양은 PDB(potato extract 20%, dextrose 2%)배지를 250ml 플라스크에 100ml씩 분주하여 121℃, 1.5기압에서 20분간 가압살균 후 배지를 조제하였다. 최종적으로 순수분리 선별된 균사체 선단을 백금이로 0.7cm x 0.7 cm씩 3부분을 절단하여 액체배지에 접종한 후, 진탕 배양기에서 25 $\pm$ 1℃, 120 rpm으로 10일간 배양을 실시하였다.

[0058] **실시예 8: 형질전환 균사체의 단백질 분리**

[0059] 회수된 버섯 균사체에 동량의 멸균수를 가하여 ultrasonicator을 사용하여 10분간 과쇄 후 4℃, 6,000rpm, 30분 동안 원심분리시켜 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70℃로 전처리한 100% 에탄올을 천천히 가하여 최종적으로 에탄올 농도를 50%로 조정한 후 1시간 동안 4℃에서 교반하여 12,000rpm, 30분 동안 원심분리 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70℃로 처리된 동량의 100% 에탄올을 천천히 가하여 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 조정하였고 1시간 동안 4℃에서 교반한 후 4℃, 12,000rpm, 30분 동안 원심분리 후 형성된 침전물을 10mM Citrate-NaOH (pH 6.0)완충용액에 현탁하였다. 또한 불순물을 제거하기 위하여 microcentrifuge를 이용하여 10,000rpm, 4℃, 10분간 원심분리하였고, 상층액을 회수한 후 시료로 사용하였다.

[0060] **실시예 9: 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)**

[0061] 단백질 수준에서의 hGH2, hIL32의 발현유무를 확인하기 위하여 각각의 antibody를 처리하여 분석하였다. 분리된 단백질을 12%의 separating gel과 stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 전기영동 하였다. SDS-PAGE에서 전기영동된 단백질을 polyacrylamide gel로부터 PVDF (Polyvinylidene difluoride) membrane으로 transfer하기 위하여 PVDF membrane을 methanol에 담가 shaker 위에 올려 놓고 30분 동안 흔들어 주었다. 30분간의 방치 후 transfer 완충용액(0.25 M Trizma base, 1.92 M glycine, 400ml methanol/L, pH 8.3)에서 15분간 반응 후 Bio-rad transfer kit를 이용하여 100V에서 90분간 transfer를 수행하였다. 또한 BSA를 농도가 3%가 되도록 TBST용액 (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 137mM NaCl, 0.1% Tween20)에 녹여 blocking solution을 제조하여 transferred PVDF membrane을 담그고 한 시간 동안 shaker 위에 올려 놓고 흔들어 주었다. 한 시간 후 TBST 용

액으로 15분씩 4회 세척한 후 1:1000 비율로 TBST 용액에 희석한 primary antibody로 4℃에서 12시간 처리 후 동일한 방법으로 15분씩 4회 세척한 후 1:1000의 비율로 TBST 용액에 희석한 secondary antibody 로 실온에서 3시간 처리하였다. Horseradish peroxidase conjugated (HRP) secondary antibody에 의한 반응을 확인하기 위하여 WEST-ZOL을 처리한 후 X-ray film에 감광하여 단백질 band를 확인하였다.

[0062] 최종적인 단백질 발현유무를 확인하기 위하여 형질전환된 각각의 균사체로부터 조단백질을 제조한 후 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 정량하여 SDS-PAGE 전기영동을 수행한 결과, 형질전환버섯균사체와 대조구로 쓰인 큰느타리버섯의 단백질 양상을 확인할 수 있었다. SDS-PAGE gel 상에서는 큰 차이를 발견하지 못하였고, 단지 버섯균사체의 단백질 전개 양상만을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 유도된 mRNA가 단백질로 정확하게 발현되었는지 확인하기 위해 Western blot을 수행한 결과 22kDa (hGH2), 15kDa (hIL32)의 예상 단백질 크기로 단백질이 발현됨을 확인하였다. 도 4는 아그로박테리아 감염을 통해 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간성장호르몬의 전기영동 사진이고, 도 5는 아그로박테리아 감염을 통해 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간인터루킨32의 전기영동 사진이며, 도 6은 전자총을 이용하여 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간성장호르몬을 나타내는 사진이고, 도7은 전자총을 이용하여 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간인터루킨32을 나타내는 사진이다.

산업이용 가능성

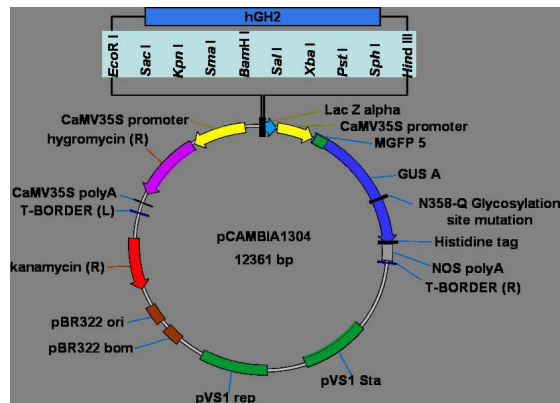
[0063] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 의하여 개발된 형질전환 방법을 통하여 생산되는 재조합 단백질을 기능성식품 원료에 응용하여 "Food as Medicine" 의 개념으로 개발한다면 높은 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 보여진다. 그리고 향 후 지속적인 연구를 통하여 버섯에서 보다 자연 원형상태에 가까우면서 생리활성이 유지된 상태로 재조합 단백질을 생산하며 그 생산성을 극대화 하기 위한 공동의 노력이 생리학자, 분자 유전학자, 그리고 발효기술자간의 연계적 연구를 통해 계속적으로 유지된다면, 우리의 전통적인 먹거리인 버섯이 재조합 의약품 생산을 위한 숙주 시스템으로서의 새로운 모델이 될 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

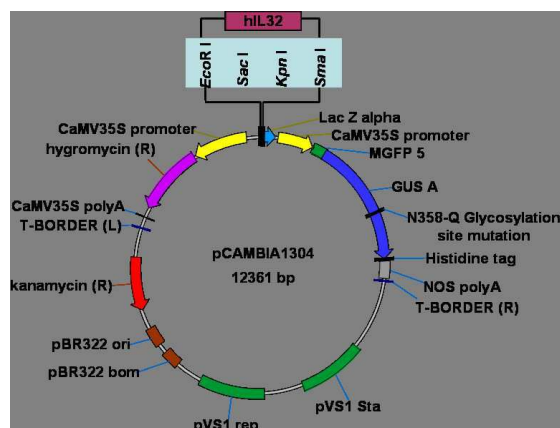
- [0064] 도 1은 본 발명에 따른 재조합 인간 성장 호르몬을 포함하는 발현 벡터의 제작과정을 나타내는 도면,
- [0065] 도 2는 본 발명에 따른 재조합 인간 인터루킨32 를 포함하는 발현벡터의 제작과정을 나타내는 도면,
- [0066] 도 3은 아그로박테리아 감염을 이용한 버섯형질전환 방법 과정을 나타내는 도면,
- [0067] 도 4는 아그로박테리아 감염을 통해 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간 성장호르몬의 전기영동 사진,
- [0068] 도 5는 아그로박테리아 감염을 통해 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간 인터루킨32의 전기영동 사진,
- [0069] 도 6은 전자총을 이용하여 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간 성장호르몬을 나타내는 사진,
- [0070] 도7은 전자총을 이용하여 형질전환된 버섯에서 생산된 재조합단백질인 인간 인터루킨32을 나타내는 사진.

도면

도면1



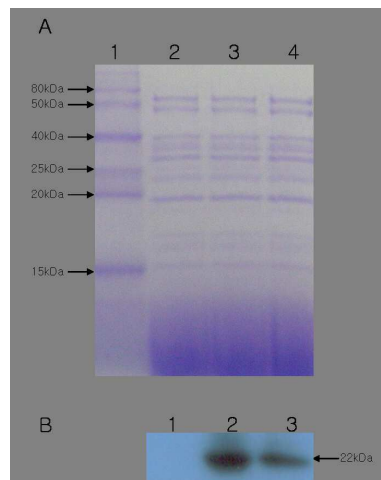
도면2



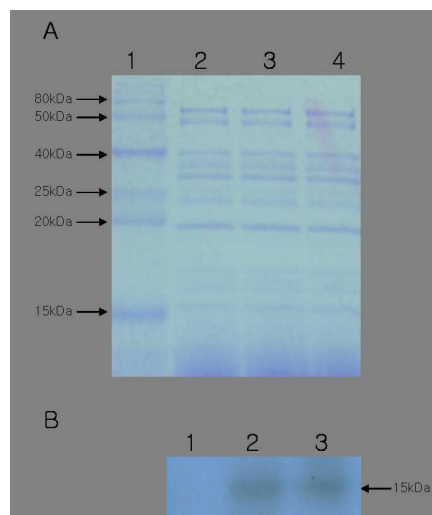
도면3



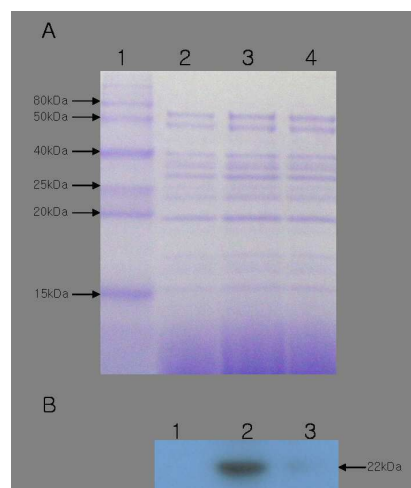
도면4



도면5



도면6



도면7

