



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0060229
(43) 공개일자 2012년06월11일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
A01H 4/00 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
A01H 5/12 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7009154
- (22) 출원일자(국제) 2010년08월12일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년04월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2010/001537
- (87) 국제공개번호 WO 2011/030083
국제공개일자 2011년03월17일
- (30) 우선권주장
61/241,613 2009년09월11일 미국(US)

- (71) 출원인
임페리얼 이노베이션스 리미티드
영국 런던 에스더블유7 2피지 사우스 켄싱턴 엑
서비션 로드 프린시즈 게이트 52
- (72) 발명자
미슈 프랑크
프랑스 에프-45200 아밀리 르 테 오뜨 바렌느
112
닉슨 페터
영국 런던 에스이24 9엔에이 루스킨 워크 27
맥카시 제임스 제라드
프랑스 에프-37210 누아자이 발레 드 보트뤼쇼
298
- (74) 대리인
리엔목특허법인

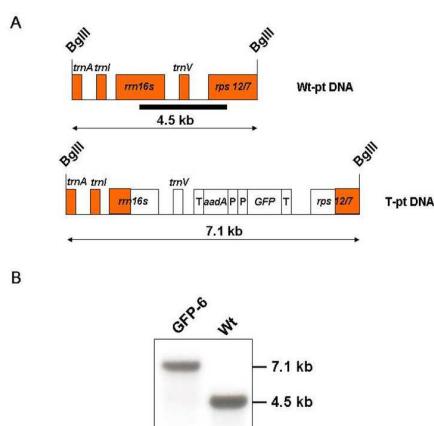
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 **방법**

(57) 요약

미분화 식물 세포로부터 리피 바이오매스를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 미분화 식물 세포를 제공하는 단계, 그것을 세포의 리피 조직으로의 분화를 촉진하는 작용제와 접촉시키는 단계 및 일시적 액체 침적 배양 시스템에서 세포를 성장시키는 단계를 포함하는 것인 방법. 본 발명의 이 방법은 폴리펩티드, 및 천연 의약품을 생산하는데 사용될 수 있고, 이산화탄소를 포획하는데 사용될 수 있다. 시험관 내 식물 세포에서 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서: 상기 폴리펩티드를 암호화하는 형질전환 핵산 분자를 운반하는 엽록체를 포함하는, 호모플라스토미 (homoplastomy)를 보여주는, 미분화 식물 세포를 제공하는 단계; 및 상기 방법에 따라서 세포를 번식시켜 상기 폴리펩티드를 포함하는 리피 바이오매스를 생산하는 단계를 포함하는 것인 방법.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

미분화 식물 세포로부터 리피 바이오매스 (leafy biomass)를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 미분화 식물 세포를 제공하는 단계, 그것을 세포의 리피 조직 (leafy tissue)으로의 분화를 촉진하는 작용제 (agent)와 접촉시키는 단계 및 일시적 액체 침적 배양 시스템 (temporary liquid immersion culture system)에서 세포를 성장시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 식물 세포는 단자엽식물 또는 쌍자엽식물로부터 얻어진 세포인 것인 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 쌍자엽식물은 담배, 토마토, 감자, 콩, 대두, 당근, 카사바 또는 애기장대 중 어느 것인 방법.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 단자엽식물은 옥수수 (corn), 호밀, 귀리, 기장, 사탕수수, 수수, 옥수수 (maize), 밀 또는 벼 중 어느 것인 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 식물 세포는 주된 의약품 (medicinal product)이 앞에서 생산되는 약용 식물 (medicinal plant)로부터 얻어진 것인 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 식물은 아트로파속 (*Atropa sp*), 히오스키아무스속 (*Hyoscyamus sp*), 다투라속 (*Datura sp*), 파파버속 (*Papaver sp*), 스코폴리아속 (*Scopolia sp*), 디기탈리스속 (*Digitalis sp*), 마쿠나속 (*Macuna sp*), 탁수스속 (*Taxus sp*), 캄프토데카속 (*Camptotheca sp*), 세팔로탁수스속 (*Cephaelotaxus sp*), 또는 카타란투스속 (*Catharanthus sp*), 개똥쑥 (*Artemisia annua*)과 같은 아르테미시아속 (*Artemisia sp*) 중 어느 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 식물은 에너지 작물 (energy crop)인 것인 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 식물은 미스칸투스속 (*Miscanthus sp*), 자트로파속 (*Jatropha sp*), 파니쿰속 (*Panicum sp*), 버드나무 (Willow), 야자나무 (Palm tree), 옥수수 (Maize), 카사바 (Cassava) 또는 포플러 (Poplar) 중 어느 것인 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 하나에 있어서, 세포의 리피 조직으로의 분화를 촉진하는 작용제는 식물 호르몬, 바람직하게는 사이토ки닌인 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 사이토키닌은 아데닌-형 또는 폐닐우-레아-형에 속하는 천연 또는 인공 사이토키닌 중 어느 것인 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 사이토키닌은 아데닌, 키네틴, 제아틴, 6-벤질아미노퓨린, 디페닐우레아, 티디아주

론 (TDZ) 및 사이토카닌 활성을 가지는 그들 각각의 유도체 중 어느 것인 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 사이토카닌은 티디아주론 (TDZ)인 것인 방법.

청구항 13

청구항 9 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 작용제는 옥신과 같은 다른 식물 호르몬과 조합하여 사용되는 것인 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 작용제는 배양 배지에 0.01 내지 100 μM , 바람직하게는 0.1 내지 10 μM 의 농도로 첨가되는 것인 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 작용제는 일시적 액체 침적 배양의 시작시에 또는 그 단계 동안에 첨가되는 것인 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 침적 시간은 2 내지 24시간마다 1 내지 30분, 바람직하게는 2 내지 6시간마다 1 내지 10분 변하는 것인 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 일시적 액체 침적 배양에서 액체의 부피는 1 내지 10,000리터, 바람직하게는 1 내지 5,000리터, 더 바람직하게는 1 내지 1,000리터, 가장 바람직하게는 1 내지 500리터인 것인 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 일시적 액체 침적 배양 시스템을 포함하는 용기는 1 내지 10,000리터, 바람직하게는 1 내지 5,000리터, 더 바람직하게는 1 내지 1,000리터, 가장 바람직하게는 1 내지 500리터인 것인 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 식물 세포는 유전적으로 조작되지 않은 것인 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 식물 세포는, 예를 들면 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 유전적으로 조작된 것인 방법.

청구항 21

시험관 내 식물 세포에서 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서:

상기 폴리펩티드를 암호화하는 형질전환 핵산 분자를 운반하는 엽록체를 포함하는, 호모플라스토미 (homoplastomy)를 보여주는, 미분화 식물 세포를 제공하는 단계; 및

청구항 1의 방법에 따라서 세포를 번식시켜 상기 폴리펩티드를 포함하는 리피 바이오매스를 생산하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 미분화 세포를 제공하는 단계는:

형질전환 핵산 분자를 식물 세포의 엽록체 내로 도입하는 단계;

형질전환 핵산 분자를 포함하는 식물 세포를 미분화 세포의 캘러스를 형성하도록 유도하는 단계; 및 호모플라스토미를 달성하기에 효과적인 조건 하에서 캘러스를 번식시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

청구항 21 또는 청구항 22에 있어서, 호모플라스토미는 항생제 선별, 예를 들면 스펙티노마이신, 스트렙토마이신 또는 카나마이신과 함께 선별, 을 사용하여 달성되는 것인 방법.

청구항 24

청구항 21 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 이용가능한 빛의 양 및/또는 이용가능한 수크로오스의 양은 상기 폴리펩티드의 생산을 최적화하도록 조절되는 것인 방법.

청구항 25

청구항 21 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 리피 바이오매스로부터 폴리펩티드를 얻는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 26

청구항 21 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드, 효소, 성장인자, 면역글로불린, 호르몬, 구조 단백질, 식물의 스트레스 반응에 관여하는 단백질, 생물 약제 또는 백신 항원 중 어느 하나인 것인 방법.

청구항 27

청구항 21 내지 26의 방법 중 어느 하나를 사용하여 얻어진 또는 청구항 1 내지 20 중 어느 하나의 방법에 의해서 얻어진 리피 바이오매스의 뒤이은 가공에 의해 얻어진 폴리펩티드.

청구항 28

청구항 1 내지 20 중 어느 하나의 방법에 의해서 얻어진 리피 바이오매스.

청구항 29

리피 바이오매스에 존재하는 성분을 얻는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 1 내지 20 중 어느 하나에 따라서 리피 바이오매스를 생산하는 단계, 및 상기 리피 바이오매스로부터 상기 성분을 얻는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 성분은 상기 리피 바이오매스에 의한 그 분비에 의해서 또는 리피 바이오매스로부터 추출에 의해서, 예를 들면 리피 바이오매스를 파쇄하여 (crushing) 성분을 방출시킴으로써 얻어지는 것인 방법.

청구항 31

청구항 29 또는 청구항 30에 있어서, 상기 성분은 의약품, 재조합으로 발현된 폴리펩티드, 탄수화물, 지질, 오일, 휘발성 방향족 화합물, 항산화제, 색소, 향미 또는 향미 전구체; 및 상기 성분은 내인성 또는 외인성일 수 있는 것인 방법.

청구항 32

청구항 29 내지 31에 있어서, 상기 성분은 추가의 산물, 예를 들면 바이오연료, 식품 또는 의약품으로 가공되는 것인 방법.

청구항 33

시험관 내 식물 세포에서 폴리펩티드를 생산하는 시스템으로서:

미분화 세포의 리피 조직으로의 분화를 촉진시키는 작용제; 및

엽록체 내로의 도입 및 내에서의 발현에 적당한, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 것인 시스템.

청구항 34

이산화탄소를 포획하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 1 내지 20의 방법을 수행하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 20의 방법으로부터 유래된 리피 바이오매스로 정제되도록 시료를 노출시키는 단계를 포함하는 시료를 정제하는 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 정제 공정은 하나 또는 그 이상의 독소를 제거하기 위한 것인 방법.

청구항 37

청구항 29 내지 31의 방법에 의해 얻어진 성분 및 약학적으로 허용가능한 담체 희석액 (carrier diluent), 부형제 또는 담체 (carrier)를 제제화하는 단계를 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 방법.

청구항 38

청구항 30 내지 32의 방법에 의해 얻어진 성분 및 약학적으로 허용가능한 담체 희석액, 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 산물.

청구항 39

청구항 29 내지 31의 방법에 의해 얻어진 성분의 발효 또는 에스테르교환시키는 단계를 포함하는 바이오연료를 제조하는 방법.

청구항 40

청구항 39의 방법에 의해 얻어진 바이오연료.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 배양액에서 리피 바이오매스 (leafy biomass)를 생산하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

본 명세서에서 의견상 종래에 공개된 문헌들을 열거하거나 개시하였다고 해서 이 문헌들이 선행기술의 일부이거나 일반적 공지사실이라고 인정하는 것은 아니다.

[0003]

배양액에서 바이오매스의 생산은 유전적으로 조작된 폴리펩티드의 생산, 의약품 (medicinal products), 다당체 (polysaccharides), 리그닌 및 지질을 포함하는, 내인성 식물 산물 (endogenous plant products)의 생산, 다당체, 리그닌, 당 (sugars), 방향족 및 지방족 화합물의 새로운 형태를 포함하는, 대사 공학 (metabolite engineering)을 통한, 식물에서 자연적으로 발견되지 않는 신규한 단순 및 복합 화학물질의 생산, 및 이산화탄소를 포획하는 데 유용하다. 바이오매스는 또한 어떤 환경에서는 연료를 위해서 사용될 수 있다.

[0004]

WO 00/57690은 분화된 식물 조각으로부터 마이크로증식 (micropropagation) 및 식물약학적 식물체 (phytopharmaceutical plants)의 생산에 관한 것이다. 특히 WO 00/57690은 전형적인 식물 성장 배지 (예를 들면 흙, 퇴비)에서 정상적인 식물 성장을 할 수 있는, 완전히-형성된 식물약제를-생산하는 식물체 (fully-formed phytopharmaceutical-producing plants)로 성장될 수 있는 새로운 유식물체 (plantlet)를 생산하기 위하여 성체 식물체로부터 취하여진 분화된 세포의 작은 조각의 자극에 관한 것이다.

[0005]

WO 01/94602는 식물체를 재생하기 위한 방법 및 고체 성장 배지를 사용하여 식물체를 증식 및/또는 형질전환하기 위한 그 용도에 관한 것이다. WO 01/94602에 기술된 방법의 결과로 얻어진 식물체는 전형적인 식물 성장

배지 (예를 들면 흙, 퇴비) 내에서 정상적인 성장 하에 자랄 수 있는 생존 가능한 (viable) 식물체이다.

[0006] WO 2008/028115는 형질전환을 위한 단일 컨테이너 시스템 (a single container system for transgenesis)을 사용함으로써 짧은 시간 내에 많은 형질전환 옥수수 식물체를 생산하기 위한, 및 생존 가능한 식물체로 성장시키기 위한 고산출 방법 (high-throughput methods)에 관한 것이다. 생산된 옥수수 식물체는 뿌리, 줄기 및 잎 구조를 가지고, 전형적인 식물 성장 배지 (예를 들면, 흙, 퇴비) 내에서 정상적인 식물 성장을 할 수 있는 생존 가능한 식물이다.

[0007] 일시적 액체 침적 배양 시스템 (예를 들면, 일시적 침적 생물반응기 (temporary immersion bioreactors) 또는 TIBs)의 용도가, 예를 들면 Etienne & Berthouly (2002) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 215-231, Hanhineva & Karenlampi (2007) *BMC Biotechnology* 7, 11-23로부터, 그리고 또한 Ducos et al (2007) *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43: 652-659로부터 알려져 있다. 예를 들면, Hanhineva & Karenlampi (2007)은 결과로 얻은 식물체가 외인성 유전자를 포함하고 뿌리 및 쟈 형성을 모두 포함하여, 예를 들면, 흙 또는 퇴비 내에서 정상적인 식물 성장을 할 수 있게 되는, 형질전환 딸기 식물체의 생산을 위한 TIB의 용도를 기술하고 있다.

[0008] 연구자들이 생물 약제 (biopharmaceuticals) 및 다른 고가치 (high-value) 단백질을 발현하기 위해 식물을 선택해 왔던 주된 이유 중 하나는 가공할 만한 스케일업 (scale-up) 가능성 및 식물 성장과 연관된 매우 낮은 유지 비용이다. 그러나, 형질전환 식물체의 사용은 문제점을 가지고 있는데, 공중은 형질전이 유전자 (transgenes)의 주변의 비형질전환 작물 (non-transgenic crops)로의 전달 및 먹이 사슬 오염의 가능성을 우려하고 있다 (Fox, 2003).

[0009] 오랫동안, 대부분의 종에서 색소체 게놈은 화분 내에 결여되어 있고 모계로 유전된다고 추정되었다 (Hagemann, 2004; Zhang et al, 2003; Scott and Wilkinson, 1999). 결과적으로, 엽록체 게놈, 또는 색소체 게놈 (plastome)으로의, 색소체 형질전환 (transplastomic) 식물체를 발생시키기 위한, 유전자의 삽입은, 화분-매개된 (pollen-mediated) 형질전이 유전자의 흐름에 대해 내재적인 자연적 장벽을 제공하는 것으로 고려되었다. 그러나, 몇몇의 최근 공개문헌은 엽록체 DNA 억제 (containment)에서의 유출은 본래 생각했던 것보다 더 자주 그리고 광범위하게 이루어진다는 것을 보여주었다. 예를 들면, 엽록체 DNA의 화분으로의 전달은 세타리아 이탈리카 (*Setaria italica*) (foxtail)에서 0.03% (Wang et al, 2004), 담배에서 0.01 내지 0.00029% (Ruf et al, 2007; Svab and Maliga, 2007), 그리고 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 0.0039% (Azhagiri and Maliga, 2007)에 이르는 것으로 추정되었다.

[0010] 또 다른 우려는 엽록체 DNA가 시간이 흐르면서 핵 게놈으로 전달될 가능성 (Sheppard et al, 2008)으로, 그곳으로부터 근처의 비형질전환 종으로, 고전적인 핵 형질전환체와 동일한 방법으로, 넘어갈 수 있다는 점이다. 매 16,000 화분립 (pollen grains) 중 핵 DNA로의 하나의 엽록체 DNA 전달 빈도가 담배에서 검출되었다 (Huang et al, 2003). 5,000 내지 16,000의 담배 식물체가 매 에이커 (acre)마다 재배될 수 있다는 사실을 고려해볼 때, 담배의 종에 따라, 엽록체 DNA의 핵으로의 전달의 위험성은 무시할 수 없다.

[0011] *aadA* 유전자와 같은, 엽록체 형질전환체를 선별하는데 사용되는, 항생제-저항성 카세트가, 토양의 박테리아 (Monier et al, 2007) 및 섭취하는 곤충 (feeding insects)의 내장에서 발견되는 박테리아 (Brinkmann and Tebbe, 2007)로 전달될 수 있다는 우려가 또한 제기되어 왔다.

[0012] 경작지에 색소체 형질전환 종자를 심음으로써 유발될 수 있는 어떤 환경적인 문제를 피하기 위하여, 한가지 해결책은 억제된 조건 하에서 성장되는 식물 세포 혼탁 배양 (plant cell suspension cultures)에서 재조합 단백질을 생산하는 것이다. 실제로, 식물 세포 혼탁액은 많은 이종단백질을 발현하기 위해 변형되어 왔다 (Hellwig et al, 2004에서 검토됨). 식물 세포 혼탁액 (plant cell suspensions)은 수확 전의 짧아진 기간, 완전히 조절된 성장 및 기상 조건 또는 병으로부터의 독립성과 같은, 재조합 단백질의 생산을 위한, 전체 식물체를 뛰어넘는 몇몇의 이점들을 보여준다. 박테리아 생산 시스템에 기초한, 현재의 제조 품질 관리 기준 (good manufacturing practices), cGMP는 또한 용이하게 적용될 수 있고, 미국식품의약품청 (FDA)에 의한 또는 유럽의약품평가청 (EMEA)에 의한 더 빠른 규제 승인으로 이어진다 (Ma et al, 2003; Fischer et al, 2004; Twyman et al, 2003에서 검토됨).

[0013] 박테리아와 같이, 식물 세포 혼탁 배양은 성장 및 유지가 저렴하다. 그들은 또한 본질적으로 안전한데, 왜냐하면 그들은 사람의 병원균을 보유하지도 않고 내독소를 생산하지도 않기 때문이다. 식물 세포 혼탁액은 단순한, 합성 배지 내에서 유지될 수 있으나, 마치 동물 세포와 같은 복잡한 다양체 단백질을 합성할 수 있다. 경작지에서 재배한 (field-grown) 식물체와는 대조적으로, 배양된 식물 세포의 수행능력 (performance)은 기후,

토양의 질, 계절 및 일장과 무관하다. 마이코톡신, 제초제 또는 살충제로 오염될 위험이 없고 (Doran, 2000) 부산물이 보다 적다 (예를 들면 섬유, 오일, 왁스, 페놀 화합물). 아마도 전체 식물체를 뛰어넘는 식물 세포 혼탁 배양의 가장 중요한 이점은 생산물의 분리 및 정제를 위한 훨씬 단순한 절차이다 (Fischer *et al*, 1999).

[0014] 그러나, 식물 세포 혼탁 배양의 주된 불리한 점은 느린 성장 및 핵 형질전환에 의해 생산된 재조합 단백질의 보통의 낮은 수율이다 (Hellwig *et al*, 2004). 또 다른 약점은 식물 세포 배양의 생산성이 상당히 변할 수 있다는 사실로, 재조합 단백질의 수준은, 예외적인 경우에서 TSP의 20% 까지 달성될 수 있긴 하지만, 보통의 전체 가용성 단백질 (TSP)의 0.0064% 내지 4%의 범위를 갖는다 (Huang *et al*, 2001).

[0015] 일반적으로, 염록체 형질전환은 고전적인 핵 형질전환보다 재조합 단백질의 수율이 더 낮다. 예를 들면, *E. coli*의 열에 불안정한 장독소 (heat-labile enterotoxin)의 B-소단위 (LTB)는 담배에서 핵 및 색소체 형질전환 모두를 통해서 발현되었다. 결과적인 수율은 장독소 유전자가 색소체 계놈 내에 삽입되었을 때 250배 더 높았다 (Kang *et al*, 2003). 유사하게, 콜레라 독소 B 항원 (CTB)이 핵 및 색소체 DNA로부터 발현되었을 때, 담배 염록체에서 항원의 생산은 핵으로부터에 비해 410배 더 높았다 (Daniell *et al*, 2001). 염록체 형질전환이 어떤 단백질의 과발현을 위해 우수한 듯 보임에도 불구하고, 색소체 형질전환 고등 식물 세포 혼탁액 내에서 재조합 GFP의 가능한 생산에 관하여 단지 하나의 보고가 발행되었다 (Langbecker *et al*, 2004). 이 연구는 어둠 속에서 성장된 담배 식물 세포 배양의 색소체 형질전환을 기술했지만, 발현 가능성의 평가는 수행되지 않았다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0016] 실시예에 기술된 실험 (work)에서, 색소체-암호화된 (plastid-encoded) 재조합 단백질의 발현 수준이 조사되었는데, 이 경우 여러 조건하에서 성장시킨 잎 조직, 캘러스 및 세포 혼탁액 내에서 녹색 형광 단백질 GFP+ (Scholz *et al*, 2000)의 변종이었다. 결과는, 발현 수준이 식물 잎에서의 그것보다 훨씬 적긴 하지만, 세포 혼탁 배양에서의 발현이, 염록체 내 외래 단백질의 높은 수준의 그리고 억제된 발현을 위한 실현 가능한 경로임을 나타낸다. 세포 혼탁 배양으로부터 출발하여 극도로 높은 수준의 재조합 단백질을 생산할 수 있고, 미분화 식물 세포로부터 높은 수준의 리피 바이오매스를 생산할 수 있는, 일시적 침적 생물반응기에 기초하여, 새로운 발현 시스템의 개발 또한 기술되어 있다.

[0017] 본 발명의 첫번째 측면은 미분화 식물 세포로부터 리피 바이오매스를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 미분화 식물 세포를 제공하는 단계, 그것을 세포의 리피 조직 (leafy tissue)으로의 분화를 촉진하는 작용제 (agent)와 접촉시키는 단계 및 일시적 액체 침적 배양 시스템에서 세포를 성장시키는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0018] "미분화 식물 세포 (undifferentiated plant cells)"에 의하여 우리는 세포가 실질적으로 꽂 (shoot) 또는 잎과 같은 어느 특정 식물 조직으로 분화되는 중이라는 어떠한 표시가 없음을 보여준다는 의미, 그리고 그들이 미분화 세포의 분화를 유도하는 어떠한 작용제도 없는, 특히 미분화 세포의 꽂으로의 분화를 유도하는 어떠한 작용제도 없는 조건 하에서 적어도 한 달 동안 그 상태로 남아 있을 것이라는 의미를 포함한다. 미분화 세포는 형질전환된 것 (transgenic) 또는 비형질전환된 것 (non-transgenic)일 수 있다.

[0019] 전형적으로, 미분화 세포는 영구적 캘러스 (permanent callus) 또는 캘러스 재료 (callus material)로부터 유래될 수 있다. 영구적 캘러스는 미분화 식물 세포 배양물 (cell culture)이다. 그러한 영구적 캘러스는 적어도 한 달 동안 미분화 형태로 남아있다.

[0020] 미분화 세포는 또한, 절단되고 옥신과 같은 어떤 식물 호르몬과 접촉하여 둔, 잎, 줄기, 꽃, 종자 또는 뿌리와 같은, 시험관 내 미분화 식물 재료로부터 유래될 수 있다.

[0021] 이 식물 재료가 상기 호르몬과 접촉되어 있을 때, 식물 재료의 어떤 영역 내에 복수의 캘러스 (calli)가 형성될 것이다. 미분화 식물 재료상에서 호르몬에 의해 유도된 복수의 캘러스는 영구적 캘러스인 것으로 고려되지 않는다.

[0022] 식물체가 형질전환 식물체가 아닌 경우에 미분화 세포를 제공하는 단계는 다음을 포함한다:

[0023] 식물체 (식물 재료)의 절단된 조각을 식물 호르몬과 접촉하도록 두어, 상기 식물 호르몬은 그 후 그 절단된

조각의 가장자리에서 복수의 캘러스를 발생시키는 단계;

[0024] 상기 캘러스는 그 후 캘러스로서 계대배양되고 (subcultured) 어떠한 선별 없이 유지된다.

[0025] 상기 절단된 식물 재료는 뿌리, 잎, 줄기, 꽃 또는 종자의 전체 또는 부분일 수 있다.

[0026] 식물체가 색소체 형질전환 식물체인 경우에 미분화 세포를 제공하는 단계는 다음을 포함한다:

[0027] 형질전환 핵산 분자 (transgenic nucleic acid molecule)를 엽록체 DNA로 표적화된 상동 재조합 방법에 의해 식물 세포의 엽록체 내로 도입하는 단계;

[0028] 형질전환 핵산 분자를 포함하는 식물 세포를 미분화 세포의 캘러스를 형성하도록 유도하는 단계; 및

[0029] 호모플라스토미 (homoplastomy)를 달성하는데 효과적인 조건 하에서 캘러스를 번식시키는 단계.

[0030] 본 발명 실험의 캘러스는 영구적 캘러스로서, 미분화 세포로서 적어도 한 달 동안 배양되고 (cultivated) 유지되어 온 것이다.

[0031] 바람직하게는, 상기 작용제와 접촉할 때 존재하는 유일한 세포는 미분화 세포이다. 전형적으로, 상기 작용제와 접촉할 때 존재하는 세포의 적어도 90%, 또는 95%, 또는 99%, 또는 99.9% 또는 99.99%가 미분화 세포이다.

[0032] 바람직하게는, 실질적으로 모든 리피 (leafy) 및 잎 같은 (leaf like) 바이오매스 재료는 상기 작용제와의 접촉 후에 미분화 세포의 분화를 기반으로 생산된다. 전형적으로, 상기 작용제로 미분화 세포를 처리함에 기반하여 생산된 식물 재료는 적어도 50% 리피 바이오매스, 바람직하게는 70%, 그리고 더 바람직하게는 80%보다 커야 한다.

[0033] "리피 (leafy)" 및 "잎 같은 (leaf like)" 바이오매스"에 의하여 우리는 식물 재료가 잎 또는 "잎 같은 (leaf like)" 조직의 형태로 있다는 의미를 포함한다. 이들 리피 조직 (leafy tissues)은 조직 조각 (tissue pieces)의 모양, 엽록체의 수 및 의미 있는 광합성 활성에 의해 다른 식물 조직으로부터 구별된다. 예를 들면, 어느 주어진 식물에 관하여, 식물 조직의 공초점 현미경 분석에 의해 계산될 경우, 잎 재료는 더 많은 수의 엽록체 및 발달중인 엽록체를 갖고 있고, 식물 조직에 의한 이산화탄소의 흡수에 의해 검출될 경우, 이 엽록체는 잎이 아닌 재료 (non-leaf material)에서의 엽록체보다 더 높은 광합성 활성 (형광계로 Fv/Fm의 결정) 및 더 높은 클로로필 함량 (흡수 분광법에 의한 추출된 색소의 분석에 의해)을 갖는다. 이러한 결정 방법은 예를 들면 (Baker (2008) *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 89-113)에서 기술된 바와 같이 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0034] 일시적 액체 침적 배양 시스템 (temporary liquid immersion culture system)은 기술 분야에서 알려진 것과 같은 어떤 그러한 시스템이 될 수 있다 (예를 들면 Etienne & Berthouly (2002) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 215-231, Hanhineva & Karenlampi (2007) *BMC Biotechnology* 7, 11-23, 그리고 또한 Ducos et al (2007) *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43: 652-659로부터, 이 모두는 여기에 참조로써 편입된다. 전형적으로, 상기 시스템은 세포가 속해 있고 아래에 더 논의된 바와 같이 짧은 기간 동안 액체 성장 배지에 침적된 다공성의 고체 기질 (예를 들면 그물 또는 스판지 또는 거품)을 포함한다.

[0035] 상기 식물 세포는 단자엽식물 또는 쌍자엽식물로부터 얻어진 세포일 수 있다.

[0036] 적합한 쌍자엽식물은 담배, 감자, 토마토, 콩 (bean), 대두 (soybean), 당근, 카사바 또는 애기장대 중 어느 것을 포함한다.

[0037] 적합한 단자엽식물은 옥수수 (corn), 호밀, 귀리, 기장, 사탕수수, 수수, 옥수수 (maize), 밀 또는 벼 중 어느 것을 포함한다.

[0038] 바람직한 구체예에서, 상기 식물 세포는 주된 의약품이 잎에서 생산되는 약용 식물 (medicinal plant)로부터 얻어진다. 상기 방법은 리피 바이오매스로부터 그것을 추출함으로써 그러한 의약품을 얻는 이로운 접근법을 나타낸다고 인식될 것이다.

[0039] 적합한 약용 식물은 아트로파속 (*Atropa sp*), 히오스키아무스속 (*Hyoscyamus sp*), 다투라속 (*Datura sp*), 파파비속 (*Papaver sp*), 스코폴리아속 (*Scopolia sp*), 디기탈리스속 (*Digitalis sp*), 마쿠나속 (*Macuna sp*), 탁수스속 (*Taxus sp*), 캄프토데카속 (*Camptotheca sp*), 세팔로탁수스속 (*Cephalotaxus sp*), 또는 카타란투스속 (*Catharanthus sp*), 개똥쑥 (*Artemisia annua*)과 같은 아르테미시아속 (*Artemisia sp*) 중 어느 것을 포함한다. 그러한 약용 식물로부터 유래될 수 있는 약물 (medicines)은, 아트로핀, 스코폴라민, 및 히오스키아민 (*hyoscyamine*)과 같은 트로판 알칼로이드 (Tropane Alkaloids) 및 그 전구체와 유도체; 코데인, 모르핀,

더바인 (thebaine), 노르산귀나린, 산귀나린, 및 크립토핀과 같은 모르피난 알칼로이드 (Morphinan Alkaloids) 및 그 전구체와 유도체; 디옥시제닌, 디기톡시제닌, 기톡시제닌, 디기나티제닌, 기탈록시제닌 (Gitaloxigenin)과 같은 카데놀리드 (Cardenolides) 및 그 전구체와 유도체; L-DOPA (L-3,4-디히드록시페닐알라닌) 및 그 전구체와 유도체; 탁솔과 같은 항종양 화합물 및 그 전구체와 유도체, 캄프토테신 및 그 유도체, 호모하링토닌, 하링토닌, 이소하링토닌 및 세팔로탁신 (cephalotaxin) 및 그 전구체와 유도체; 그리고 빈블라스틴, 빙크리스틴, 빈돌린, 카타란틴과 같은 빈카 알칼로이드 (Vinca Alkaloids), 그 전구체와 유도체; 아르테미시닌과 같은 말라리아 약 (malaria drugs), 그 전구체와 유도체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 리피 바이오매스에 의해 생산된 의료용 화합물 (medicinal compounds)은 약학적으로 허용가능한 부형제, 희석액 (diluents) 또는 담체 (carriers)와의 결합에 의하여 약학적 조성물로 혼입될 수 있다.

[0041] 더 바람직한 구체예에서, 상기 식물은 에너지 작물 (energy crop)일 수 있다. 에너지 식물에 의하여, 우리는 에탄올 또는 바이오디젤을 포함하는 바이오연료의 생산에 사용되는 식물 종을 의미한다. 본 발명은 계절 및 식물 종에 무관하게, 바이오연료의 지속적인 생산을 위해 이용될 수 있는 바이오매스의 지속적인 생산을 가능하게 한다. 발생된 바이오매스는 발효에 기초한 에탄올 생산 공정에서의 사용을 위해, 상대적으로 증가된 수준의 다당체, 또는 바이오디젤의 생산을 위해 더 가공될 수 있는 상대적으로 높은 수준의 하나 또는 그 이상의 지질을 내인적으로 (endogenously) 포함할 수 있다. 이 증가된 수준의 이로운 화합물은 또한 유전 공학에 의해 바이오매스 내에서 발생될 수 있다. 적합하게는, 상기 식물은 미스칸투스속 (*Miscanthus sp*), 자트로파속 (*Jatropha sp*), 파니쿰속 (*Panicum sp*), 버드나무 (Willow), 야자나무 (Palm tree), 옥수수 (Maize), 카사바 (Cassava) 또는 포플러 (Poplar) 중 어느 것이다.

[0042] 세포의 리피 조직으로의 분화를 촉진하는 작용제는 전형적으로 식물 호르몬 (파이토호르몬 또는 식물 성장 물질), 및 바람직하게는 사이토키닌이다. 사이토키닌은 주로 세포 분열 및 쪽 형성에 영향을 미치는 화합물 군이나, 또한 세포 노화를 지연시키는 역할도 하며, 식물체 전체를 통한 옥신 수송을 매개하는 것에 책임이 있고, 마디 사이의 길이 (internodal length) 및 잎 성장에 영향을 미친다. 옥신은 세포 확장 (cell enlargement), 눈 형성 (bud formation) 및 뿌리 개시 (root initiation)에 긍정적으로 영향을 미치는 화합물이다. 그들은 또한 다른 호르몬의 생산을 촉진시키고 사이토키닌과 결합하여, 그들은 줄기, 뿌리, 과실의 성장을 조절하고 줄기를 꽃으로 전환시킨다.

[0043] 상기 사이토키닌은 아데닌-형 (adenine-type) 또는 폐닐우레아-형 (phenylurea-type)에 속하는 어느 천연 또는 인공 사이토키닌일 수 있다. 바람직하게는, 상기 사이토키닌은 아데닌, 키네틴, 제아틴, 6-벤질아미노퓨린, 디페닐우레아, 티디아주론 (TDZ) 및 사이토키닌 활성을 가지는 그들 각각의 유도체 중 어느 것이다.

[0044] 상기 작용제는 분화를 촉진, 유도, 및 유발시킴으로써 쪽이, 바람직하게는 지수적 방식으로, 본 발명의 캘러스/세포 혼탁액으로부터 유래된 어느 하나의 미분화 식물 세포로부터 빠르게 성장하도록 한다. 그러한 쪽은 리피 또는 잎 같은 바이오매스로 발달한다.

[0045] 바람직하게는 세포의 리피 조직으로의 분화를 촉진하는 작용제는 티디아주론 (TDZ)이다.

[0046] 편리하게는, 상기 작용제는, 4-클로로-인돌아세트산, 폐닐아세트산 (phenylacetic acid:PAA), 인돌-3-뷰티릭산 및 인돌-3-아세트산과 같은 자연적으로 발생하는 옥신; 또는 합성 옥신 유사체 1-나프탈렌아세트산 (1-naphthaleneacetic acid:NAA), 2,4-디클로로페녹시아세트산과 같은, 옥신과 같은, 또 다른 식물 호르몬과 조합하여 사용될 수 있다.

[0047] 전형적으로, 상기 작용제는 배양 배지에 0.01 내지 100 μM 의 농도로 첨가된다. 바람직하게는 상기 농도는 0.1 내지 10 μM 이다.

[0048] 상기 작용제는 일시적 액체 침적 배양 단계의 시작시에 또는 그 단계 동안에 첨가될 수 있다.

[0049] 어느 적합한 침적 체제 (regime)라도, 예를 들면 리피 바이오매스의 생산을 최적화하거나 폴리펩티드 또는 관심 있는 의약품과 같은, 리피 바이오매스에서의 특정한 산물의 농도를 최적화하기 위해 선택될 수 있다. 전형적으로, 상기 침적 시간은 2 내지 24시간의 배양마다 1 내지 30분 변한다. 바람직하게는, 상기 침적 시간은 2 내지 6시간마다 1 내지 10분이다.

[0050] 통상의 기술자는 특정한 목적을 위한 특정한 바이오매스를 가장 효과적인 방법으로 즉, 가장 적절한 속도, 양 및 질로써 발생시키기 위하여 식물 종 및 기원에 기초하여 시간, 온도 및 성장 배지와 같은 가장 적절한 침적

배양 파라미터를 용이하게 선택할 수 있을 것이다.

[0051] 상기 일시적 액체 침적 배양에서 액체의 부피는 어느 편리한 부피라도 될 수 있으나 전형적으로 1 내지 10,000리터이다. 대안적으로, 상기 부피는 1 내지 5,000리터, 1 내지 1,000리터, 또는 1 내지 500리터가 될 수 있다.

[0052] 상기 일시적 액체 침적 배양 시스템을 포함하는 용기는 어느 편리한 크기라도 될 수 있고, 전형적으로 1 내지 10,000리터이다. 대안적으로, 상기 부피는 1 내지 5,000리터, 1 내지 1,000리터, 또는 1 내지 500리터가 될 수 있다.

[0053] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 식물 세포는 유전적으로 조작되지 않은 것이다. 잘 알려진 대로, 식물은 위에서 기술한 바와 같은 의약품뿐만 아니라, 오일, 색소, 항산화제, 당 (탄수화물), 지질, 아미노산, 휘발성 방향족 화합물, 및 향료/향료 전구체 (flavours/flavour precursors)와 같은 단순 및 복잡한 생화학물질과 같이 그들의 앞에서 많은 중요한 산물을 내인적으로 생산한다.

[0054] 관심 있는 식물 재료는 또한 급수원 (feed water source)에서와 같은, 시료 내의 독성 오염물질 (toxic pollutants)을, 농축하고, 포획하고, 또는 분해할 능력이 있다 (식물에 기반한 시험관 내 오염 제거/정제).

[0055] 식물 재료는 또한 일시적 반응 용액 내에 포함된 하나의 화합물을 하나 또는 그 이상의 다른 화합물로 변형시키는데 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 식물 세포는, 예를 들면 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 유전적으로 조작된다. 상기 폴리펩티드는 관심 있는 어느 폴리펩티드라도 될 수 있으나, 바람직하게는 치료용 폴리펩티드, 효소, 성장인자, 면역글로불린, 호르몬, 구조 단백질, 식물의 스트레스 반응에 관여하는 단백질, 생물 약제, 웹티드 또는 백신 항원 중 어느 하나이다. 상기 폴리펩티드가 효소일 때 그것은 리피 재료의 대사를 변화시키는데 사용될 수 있고, 따라서 신규한 고분자 및 대사 산물의 발생을 허용한다. 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드는 또한 수원 (water source)과 같은, 시료 내에서 발견되는 오염물질을 정제 또는 분해하는 리피 조직의 능력을 증폭시키기 위해 리피 재료 내에서 발현될 수 있다.

[0057] 유전적으로 조작된 식물 세포 (재조합 또는 형질전환 식물 세포)는 (i) 외인성 핵산 (형질전이 유전자 (transgene))이 핵 내에 속해 있는 핵 형질전환 식물 세포; (ii) 외인성 핵산 (형질전이 유전자)이 염록체와 같은, 색소체 내에 속해 있는 색소체 형질전환 식물 세포; 또는 (iii) 핵 형질전환 및 색소체 형질전환된 식물 세포일 수 있다.

[0058] 핵 형질전환 식물 및 색소체 형질전환 식물을 만드는 방법은 기술 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 핵산 분자는 입자충격 (particle bombardment), 미세주입 (micro-injection), PEG-전기충격법 (PEG-electroporation), 아그로박테리움 매개 형질전환 (agrobacterium mediated transformation), 식물 바이러스 기타 등을 사용하여 식물 세포 내로 도입될 수 있다 (예를 들면 Birch 1997, Maliga 2004, Gleba et al., 2008을 보라).

[0059] 상기 식물이 색소체 형질전환 식물이라면 바람직하다.

[0060] 식물은 기술분야에서 인지된 많은 방법으로 형질전환될 수 있다. 통상의 기술자는 방법의 선택이 형질전환을 위한 표적 식물형에 의존할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 식물 세포를 형질전환하는 적합한 방법의 예는 미세주입 (microinjection) (Crossway et al., *BioTechniques* 4:320-334 (1986)), 전기충격법 (electroporation) (Riggs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606 (1986)), 아그로박테리움-매개 형질전환 (*Agrobacterium*-mediated transformation) (Hinchee et al., *Biotechnology* 6:915-921 (1988));, 직접 이입법 (direct gene transfer) (Paszkowski et al., *EMBO J.* 3:2717-2722 (1984));, 그리고 Agracetus, Inc., Madison, Wisconsin 및 Dupont, Inc., Wilmington, Delaware로부터 이용 가능한 장치를 사용한 탄도 입자 가속 (ballistic particle acceleration)을 포함한다 (예를 들면, Sanford et al., U.S. Patent 4,945,050를 보라). 아그로박테리움-매개 형질전환은 위에 언급된 다른 방법이 바람직한 단자엽식물을 위해서는 일반적으로 비효과적이다.

[0061] 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본 발명의 DNA 구조체를 포함하는 세포,는 잘 알려진 기술에 의해 확인될 수 있다. 예를 들면, 한 가지 선별 기술은 발현 벡터 내로 형질전환된 세포에서 선별가능한 형질을 암호화하는 DNA 서열 (표지 (marker))을 도입시키는 것을 포함한다. 이 표지는 진핵 세포 배양을 위한 디히드로폴레이트 (dihydrofolate) 리덕타제, G418 또는 네오마이신 저항성, 및 *E.coli* 및 다른 박테리아 내 배양을 위한 테트라사이클린, 카나마이신 또는 암페실린 저항성 유전자를 포함한다. 대안적으로, 그러한 선별가능한 형질을

위한 유전자는 희망하는 숙주 세포를 공동형질전환시키는데 (co-transform) 사용되는, 또 다른 벡터 상에 존재할 수 있다.

[0062] 상기 표지 유전자는 형질전환체를 확인하는데 사용될 수 있으나 어느 세포가 재조합 DNA 분자를 포함하고 어느 것이 스스로 연결된 (self-ligated) 벡터 분자를 포함하는지 결정하는 것이 희망된다. 이것은 DNA 절편의 삽입이 분자 상에 존재하는 유전자 중 하나의 완전한 상태 (integrity)를 파괴하는 클로닝 벡터를 사용함으로써 달성될 수 있다. 재조합체 (recombinants)는 그러므로 그 유전자 기능의 상실 때문에 확인될 수 있다.

[0063] 성공적으로 형질전환된 세포를 확인하는 또 다른 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위해 본 발명의 발현 구조체 (expression construct) 도입의 결과로 얻어진 세포를 성장시키는 것을 포함한다. 세포는 수확되고 용해되고 그들의 DNA 내용물을 Southern (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503 또는 Berent *et al* (1985) *Biotech.* **3**, 208에 의해 기술된 것과 같은 방법을 사용하여 DNA의 존재가 조사될 수 있다. 대안적으로, 상충액 내 단백질의 존재는 아래에 기술된 바와 같이 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0064] 재조합 DNA의 존재를 직접적으로 분석하는 것 (assaying) 이외에도, 성공적인 형질전환은 재조합 DNA가 단백질의 발현을 지시 (directing)할 능력이 있을 때 잘 알려진 면역학적 방법에 의해 확인될 수 있다. 예를 들면, 발현 벡터로 성공적으로 형질전환된 세포는 적절한 항원성 (antigenicity)을 보여주는 단백질을 생산한다. 형질전환된 것이 의심스러운 세포 시료는 수확되고 적합한 항원을 사용하여 단백질을 분석한다.

[0065] 통상의 기술자는 안정 및 불안정한 (일시적인) 형질전환체가 식물 형질전환 기술에 의해 생산될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일시적인 형질전환체 (transient transformants)는 DNA 구조체에 의해 암호화된 본 발명의 화합물을 포함하는 산물을 단지 일시적으로 발현한다. 일시적 발현 시스템 (transient expression systems)은 가치있는 단백질의 생산에 책임이 있는 형질전환된 세포가 형질전환 후 즉시 수확됨으로써 분자 유전학 연구를 위해서뿐만 아니라 어떤 특정의 상업적인 응용을 위해서도 유용할 수 있다.

[0066] 안정한 형질전환체 (stable transformants)는 외인성 DNA 서열이 숙주의 게놈 내로 통합될 때 생산될 수 있다. 식물에 관해서 외인성 DNA는 염색체 중 하나로 또는 기관의 게놈 내로 (미토콘드리아, 엽록체) 삽입될 수 있다.

[0067] 통상의 기술자는 *E.coli*가 중간 숙주 (intermediate host)로서 사용되고 표준의 또는 변형된 플라스미드 벡터를 사용하여 암호화 서열을 포함하는 다양한 플라스미드의 구성에 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 식물 형질전환은 이 중간 숙주로부터 회수된 플라스미드 DNA를 사용하여 달성될 수 있고 예를 들면 입자투사 장치 (biostatic device)를 통한, 세포의 직접적인 형질전환을 위해 사용될 수 있다. 대안적으로 암호화 서열을 포함하는 키메릭 (chimeric) DNA 구조체는 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 라이조진스 (*Agrobacterium rhizogenes*) 내에서 번식 및 아그로박테리움 매개 유전자 전이를 통한 식물 세포 내로의 계속적인 형질전환을 위해서 Ti 또는 Ri 플라스미드 기반 벡터 내로 연결될 수 있다.

[0068] 벡터의 예는 클로닝 벡터, 발현 벡터 및 운반 (shuttle) 벡터를 포함한다. 클로닝 벡터는 하나의 DNA 서열 이상을 생산하는 목적을 위해 수용체 내로 DNA의 절편을 운반하는데 사용되는 작용제를 포함한다. 발현 벡터는 DNA 서열을 숙주 내로 운반하고 그 안에서 단백질 또는 안티센스 전사체와 같은, 특정한 산물의 합성을 지시하는 작용제를 포함한다. 발현 벡터는 벡터 내에 삽입 부위를 포함하는 발현 카세트 내로 암호화 DNA 서열의 삽입에 의해 생산될 수 있다. 운반 벡터는 두 개의 숙주를 위한 복제 원점을 가지도록 구성된 유전적 요소를 포함하여 외래 서열을 하나의 숙주 이상으로 운반하는 데 사용될 수 있게 한다. 예를 들면, 운반 벡터는 *E. coli* 및 *A. tumefaciens*를 위한 복제 원점을 가질 수 있다.

[0069] 일반적으로, DNA는 발현을 위해 제대로 된 방향 및 올바른 리딩 프레임 (reading frame)으로 벡터 내로 삽입된다. 만일 필요하다면, 그러한 조절은 일반적으로 벡터 내에서 이용할 수 있음에도 불구하고, DNA는 원하는 숙주에 의해 인지되는 적절한 전사 및 번역 조절 (regulatory control) 뉴클레오티드 서열에 연결될 수 있다. 조절 인자는 식물로부터 또는 식물 바이러스 또는 아그로박테리움의 Ti/Ri 플라스미드를 포함하는, 대체 자원으로부터 유래될 수 있다.

[0070] DNA 삽입 서열은 적절한 프로모터, 예를 들면 식물 바이러스의 프로모터 또는 식물의 프로모터에 작동적으로 (operatively) 연결될 수 있다. 바람직한 프로모터는 항구적 (constitutive), 유도성 (inducible), 일시적으로 조절되는 (temporally regulated), 발달 조절되는 (developmentally regulated), 세포-선후의 (cell-preferred) 및/또는 세포-특이적 프로모터, 조직-선후의 (tissue-preferred) 및/또는 조직-특이적 프로모터, 및 화학적으로 조절되는 (chemically regulated) 프로모터를 포함한다. 상기 프로모터는 또한 전사 인자 결합

부위의 인공적인 조합으로부터 구성된 합성의 또는 인공의 프로모터일 수 있다.

[0071] 항구적 프로모터 (constitutive promoters)는 CaMV 35S 및 19S 프로모터를 포함한다 (Fraley *et al.*, US Patent No. 5,352,605). McElroy *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* **231**, 150-160 (1991)에 의해 기술된 프로모터 발현 카세트는 암호화하는 서열의 발현을 위해 용이하게 수정될 수 있고 단자엽식물 숙주에서의 사용을 위해 특별히 적합하다.

[0072] 또 다른 바람직한 항구적 프로모터는 많은 세포 형태에서 축적된다고 알려진 또 다른 유전자 산물인, 유비퀴틴으로부터 유래된다. 상기 유비퀴틴 프로모터는 형질전환 식물에서의 사용을 위해 몇몇 종으로부터 클로닝되어왔다 (예를 들면 Binet *et al.*, *Plant Science* **79**, 87-94 (1991)).

[0073] 유도성 프로모터 (inducible promoters)는 비생물 및 생물적 환경 자극에 반응하는 프로모터를 포함한다. 비생물적 환경 자극은 빛, 온도 및 물 이용성을 포함한다. 생물적 환경 자극은 병원균, (바이러스 유도의, 박테리아 유도의, 곰팡이 유도의, 곤충 유도의, 및 선충 유도의 프로모터를 포함하는), 공생자 및 초식 동물과의 상호작용을 포함한다. 프로모터는 또한 움직임, 만짐, 조직 손상 및 식물 호르몬 (아브시스산 (abscisic acid), 사이토키닌, 옥신, 지베렐린, 에틸렌, 브라시노스테로이드 (brassinosteroids) 및 시스테민 (systemin) 및 근류형성 인자와 같은 펩티드를 포함하는)에 반응할 수 있다.

[0074] 일시적으로 조절되는 프로모터 (temporally regulated promoters)는 생체시계에 의해 조절되는 프로모터뿐만 아니라 비생체시계 시간-기록 (non-circadian time-keeping) 메카니즘에 반응하는 것을 포함한다. 발달 조절되는 프로모터 (developmentally regulated promoters)는 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 종자, 배, 화분 및 배주를 포함하는, 기관 및 다른 구조를 위한 조직 특이적 및 세포 형태 특이적 프로모터를 포함한다.

[0075] 조직-특이적 또는 조직-선호의 (tissue-preferential) 프로모터는 식물, 특별히 옥수수 및 사탕무에서 암호화 서열의 발현을 위해 유용하고, 뿌리, 중과피 (pith), 잎 또는 화분에서 발현을 지시하는 것들이다. 예로는 애기장대의 b1-tubulin (bi-tubulin) 유전자로부터의 TUB1 프로모터 (Snustad *et al.*, *Plant Cell* **4**, 549, 1992), 완두콩의 메탈로시오닌-유사 (methallothione-like) 유전자로부터의 PsMT_A 프로모터 (Evans *et al.*, *FEBS Letters* **262**, 29, 1990), 애기장대로부터의 RPL16A 및 ARSK1 프로모터 및 WO 97/20057 및 WO 93/07278에서 개시된 추가의 프로모터가 있다. 게다가, 화학적으로 유도되는 프로모터 (chemically inducible promoters)는 발현을 지시하는데 유용하고 또한 바람직하다 (WO 95/19443를 보라).

[0076] 특별히 바람직한 것은 16S rRNA, psbA 및 rbcL 프로모터이다.

[0077] 프로모터 이외에, 여러 가지 전사 종결자가 본 발명의 DNA 구조체 내로 도입될 수 있다. 전사 종결자는 형질 전이 유전자 너머의 전사의 종결 및 그것의 정확한 아데닐산중합반응 (polyadenylation)을 책임진다. 전사 종결자는 프로모터와 동일한 유전자로부터 유래될 수 있거나 다른 유전자로부터 유래될 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 암호화 서열은 그것의 자연적으로 발생한 아데닐산중합반응 신호 서열에 작동적으로 (operably) 연결된다. 적당한 전사 종결자 및 식물에서 기능한다고 알려진 것들은 CaMV 35S 종결자, tml 종결자, pea rbcS E9 종결자 및 기술 분야에 알려진 다른 것을 포함한다. 편리한 종결 지역은 옥토피ne (octopine) 합성효소 및 노팔린 (nopaline) 합성효소 종결 지역과 같은, 애기장대의 Ti-플라스미드로부터 또한 이용할 수 있다. 예를 들면, Rosenberg *et al.*, *Gene*, **56**, 125 (1987); Guerineau *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 141-144 (1991); Proudfoot, *Cell*, **64**, 671-674 (1991)를 보라.

[0078] 상기 이외에, 본 발명의 DNA 구조체는 발현 수준을 조절할 수 있는 어느 다른 서열이라도 포함할 수 있다. 많은 서열들이 전사 단위 내로부터 유전자 발현을 향상시킨다고 밝혀졌고 이 서열은 형질전환 식물 내에서 발현을 증가시키기 위해 암호화 서열과 협력하여 사용될 수 있다. 여러 가지 인트론 서열은 특별히 단자엽식물의 세포에서 발현을 향상시키는 것을 보여주었다. 예를 들면, 옥수수 Adh1 유전자의 인트론은 옥수수 세포 내로 도입되었을 때 그것의 관련 있는 프로모터 하에서 야생형 유전자의 발현을 의미 있게 향상시킨다는 것이 밝혀졌다 (Callis *et al.*, *Genes Develop.* **1**, 1183-1200 (1987)). 인트론 서열은 일상적으로 식물 형질전환 벡터 내로, 전형적으로 번역되지 않는 리더 (non-translated leader) 내로 도입된다.

[0079] 상기 구조체는 또한 엽록체 이동 신호, 엽록체 특이적 프로모터, 상동 재조합을 만들기 위한 엽록체 특이적 서열 상동체, 핵 이동 신호와 같은 조절자 (Lassner *et al.*, *Plant Molecular Biology* **17**, 229-234 (1991)), 식물 변역 공통 서열 (Joshi, C.P., *Nucleic Acids Research* **15**, 6643-6653 (1987)), 인트론 (Luehrs and Walbot, *Mol. Gen. Genet.* **225**, 81-93 (1991)), 및 그와 같은 것을 포함하고, 적절한 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연관될 수 있다.

- [0080] 보통 사용되는 식물 형질전환 벡터는 감염에 의해서 DNA를 운반하는, 아그로박테리움 벡터이다. 다른 벡터는 탄도 (ballistic) 벡터 및 DNA-매개 형질전환에 적합한 벡터이다. 이 방법은 통상의 기술자에게 알려져 있다. 예를 들면, C.P. Lichtenstein 및 S. L. Fuller에 의한 리뷰, "식물 유전 공학을 위한 벡터 (Vectors for the genetic engineering of plants)", *Genetic Engineering*, ed. P. W. J. Rigby, vol. 6, 104-171 (Academic Press Ltd. 1987)를 보라.
- [0081] 본 발명의 첫 번째 측면의 방법은 이산화탄소를 포획하는데 사용될 수 있다. 공기가 이산화탄소로 풍부하다면, 예를 들면 10%까지 이산화탄소를 포함한다면, 바람직하긴 하지만, 공기가 이것을 위해 사용될 수 있다. 게다가, 보다 효율적인 이산화탄소 포획을 허용하기 위하여, 식물 세포에 이용할 수 있도록 만들어진 추가의 탄소 덕분에 바이오매스의 추가적인 생산을 허용할 것이다.
- [0082] 이산화탄소 포획은 이산화탄소를 포함하는 공기를 일시적 침적 생물반응기에 제공함으로써 달성될 수 있다. 이산화탄소원은 대기의 이산화탄소, 이산화탄소 용기 (a carbon dioxide canister), 발전소의 배기 가스 또는 연소 및/또는 발효실의 배기 가스를 포함하는 어떤 소스로부터도 될 수 있다.
- [0083] 이산화탄소 농도는 성장 배지의 pH 및 일시적 침적 생물반응기 내 리피 바이오매스 성장을 조절하기 위해 유리하게 제어될 수 있다.
- [0084] 바이오연료는 다음의 단계를 포함하는 방법에 의해 생산될 수 있다: 상기 기술된 일시적 침적 생물반응기 내, 예를 들면 하나 또는 그 이상의 폐쇄된 일시적 침적 생물반응기인 생물반응기,에서 리피 바이오매스를 재배하는 단계; 상기 리피 바이오매스를 지속적인, 반-지속적인 또는 배치 모드 (batch mode) 공정에서 수확하는 단계; 및 지질 또는 탄수화물을 리피 바이오매스로부터 바이오연료로 전환하는 단계. 상기 지질 또는 탄수화물은 바이오연료로의 전환 공정의 전 또는 일부로서 리피 바이오매스로부터 추출될 수 있다. 대안적으로 상기 지질 또는 탄수화물은 리피 바이오매스에 의해 배양 배지 내로 분비되고 바이오연료로의 전환을 위해 배양 배지로부터 수확될 수 있다.
- [0085] 리피 바이오매스에 의해 바이오연료의 생산을 향상시키기 위해서, 바이오매스는, 지질 및 또는 탄수화물 생산을 증가시키기 위해, 환경적인 스트레스, 또는 몇몇의 스트레스 조합의 대상이 될 수 있다. 리피 바이오매스는 또한 바이오연료로 전환될 지질 또는 탄수화물의 생산 및 접근성 (예를 들면, 배양 배지 내로의 분비를 촉진함으로써)을 향상시키기 위해 유전적으로 조작될 수 있다.
- [0086] 바이오디젤은 트렌스에스테르화 공정에 의해 오일/지질로부터 생산될 수 있고 구성에 있어서 화석/미네랄 (fossil/mineral) 디젤과 유사한 액체이다. 그 화학적 명칭은 지방산 메틸 (fatty acid methyl) (또는 에틸 (ethyl)) 에스테르 (FAME)이다. 오일은 소듐 히드록시드 및 메탄올 (또는 에탄올)과 함께 혼합되고 상기 화학적 반응은 바이오디젤 (FAME) 및 글리세롤을 생산한다.
- [0087] 바이오알코올 화합물은 생물학적으로 생산된 알코올, 가장 흔하게는 에탄올 (바이오에탄올), 및 덜 흔하게는 프로판올 및 부탄올이고, 당, 전분, 또는 셀룰로오스의 발효를 통해 미생물 및 효소의 작용에 의해서 생산된다.
- [0088] 본 발명의 두 번째 측면은 시험관 내 식물 세포 내에서 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서:
- [0089] 상기 폴리펩티드를 암호화하는 형질전환 핵산 분자를 운반하는 엽록체를 포함하는, 호모플라스토미 (homoplastomy)를 보여주는, 미분화 식물 세포를 제공하는 단계; 및
- [0090] 본 발명의 첫 번째 측면의 방법에 따라서 세포를 번식시켜 상기 폴리펩티드를 포함하는 리피 바이오매스를 생산하는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0091] 다시 말해서, 세포는 미분화 식물 세포를 제공하는 단계, 그것을 세포의 리피 조직으로의 분화를 촉진하는 작용제와 접촉시키는 단계 및 일시적 액체 침적 배양 시스템에서 세포를 성장시키는 단계를 포함하는 것인 방법에 의해 번식된다.
- [0092] 형질전환 핵산 분자는 상기 및 실시예에 기재된 방법을 사용하여 엽록체 내로 도입될 수 있다.
- [0093] 호모플라스토미 (homoplastomy)에 의해 우리는 식물 세포의 각 엽록체 내에서 엽록체 DNA의 다수의 복사본의 대부분 또는 전부가 형질전환된 상태를 의미한다. 호모플라스토미는 선택적 작용제를 포함하는 배지 상에서, 색소체 형질전환 재료를 여러 번 계대배양함으로써 달성될 수 있다. 상기 선택적 작용제는 형질전환 구조체 내에서 사용되는 선별 표지와 연관되어 있고, 어느 적절한 선별 표지, 예를 들면 스펙티노마이신 또는 카나마

이신과 같은, 항생제 저항성 유전자, 라도 될 수 있다.

[0094] 호모플라스토미의 달성을 표준적으로 서던 블로팅 (Southern blotting)을 사용하여 확인된다.

[0095] 식물체가 형질전환 식물체가 아닌 경우에 미분화 세포를 제공하는 단계는 다음을 포함한다:

[0096] 식물체 (식물 재료)의 절단된 조각을 식물 호르몬과 접촉하도록 두어, 상기 식물 호르몬은 그 후 그 절단된 조각의 가장자리에서 복수의 캘러스를 발생시키는 단계;

[0097] 상기 캘러스는 그 후 캘러스로서 계대배양되고 어떠한 선별 없이 유지된다.

[0098] 상기 절단된 식물 재료는 뿌리, 잎, 줄기, 꽃 또는 종자의 전체 또는 부분일 수 있다.

[0099] 식물체가 색소체 형질전환 식물체인 경우에 미분화 세포를 제공하는 단계는 다음을 포함한다:

[0100] 형질전환 핵산 분자를 엽록체 DNA로 표적화된 상동 재조합 방법에 의해 식물 세포의 엽록체 내로 도입하는 단계;

[0101] 형질전환 핵산 분자를 포함하는 식물 세포를 미분화 세포의 캘러스를 형성하도록 유도하는 단계; 및

[0102] 호모플라스토미를 달성하는데 효과적인 조건 하에서 캘러스를 번식시키는 단계.

[0103] 형질전환 구조체는 상동 재조합을 달성하기 위하여 표적의 엽록체 DNA와 유사한 (예를 들면 85% 동일성보다 높은) 적어도 두 개의 핵산 서열 (이른바 right 및 left borders); 선별 표지 유전자 및 웨티드 또는 폴리웨티드 서열을 암호화한 것, 을 포함해야 한다;

[0104] 색소체 형질전환 미분화 세포의 사용에 관하여, 호모플라스토미는 항생제 선별, 예를 들면 스트렙토마이신, 스페티노마이신 또는 카나마이신으로 선별, 을 사용하여 달성된다.

[0105] 캘러스 호모플라스토미는 다음을 포함하나, 이에 한정되지는 않는, 통상의 기술자에게 잘 알려진 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다:

[0106] (i) 핵산은 잎의 엽록체 DNA 내로 도입되고, 식물은 재생 (성장)되고, 이 식물은 호모플라스토미에 도달하도록 적어도 2회 계대배양 (절단되고, 잎 부분으로부터 싹을 재생시키기 위해 선택 배지 상에 두어) 될 것이다. 예를 들면 서던 블로팅에 의해서, 호모플라스토미가 검출되었을 때, 선별된 식물은 뿌리를 생산하기 위해 새로운 배지로, 및 마지막으로 꽃 및 종자를 생산할 때까지 토양으로 옮겨진다. 종자는 그 후 선택 배지 상에 심어지고, 발생한 싹은 복수의 캘러스를 발생시키는데 사용된다.

[0107] (ii) 식물을 토양으로 옮기고 개화시키는 것이 없는 상기 (i)의 방법. 호모플라스토미에 도달되자마자, 식물의 잎은 복수의 캘러스를 발생시키는데 사용된다.

[0108] (iii) 핵산이 잎의 엽록체 DNA 내로 도입되고, 첫 번째 잎이 나타났을 때, 캘러스는 선택 배지 위에서 유도되고 (이 식물 재료는 혜테로플라스토믹 (heteroplasomic)이다, 왜냐하면 그것은 서던 블로팅에 의해 확인될 수 있는, 형질전환 및 비형질전환된 엽록체 DNA의 혼합물을 포함하기 때문이다), 캘러스는 그 후에 호모플라스토미에 도달할 때까지 선택 배지 상에서 캘러스 (a callus)로서 계대배양된다.

[0109] (iv) 핵산이 미분화 세포의 엽록체 DNA 내로 도입되고, 색소체 형질전환된 복수의 캘러스는 호모플라스토미에 도달할 때까지 선택 배지 상으로 캘러스 (a callus)로서 계대배양 된다.

[0110] 바람직하게는, 핵산 분자는 선별 표지 유전자를 포함한다. 전형적으로, 상기 선별 표지 유전자는 aadA, nptII, AphVI와 같은 항생제 저항성 유전자이다.

[0111] 전형적으로, 핵산 분자는 벡터 또는 PCR 절편 내로 삽입된다.

[0112] 전형적으로, 상기 벡터는 플라스미드이고, 전형적으로 *Escherichia coli*, 효모, 곤충 또는 포유류 세포 내에서 증식될 수 있다. 바람직하게는, 상기 플라스미드는 엽록체 형질전환 플라스미드이다.

[0113] 폴리웨티드의 발현이 강력한 엽록체 특이적 프로모터에 의해 주도된다면 바람직하다. 적합한 프로모터는 16S rRNA 프로모터, psbA 프로모터 및 rbcL 프로모터를 포함한다.

[0114] 식물 세포 및 엽록체 형질전환 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고 상기에 논의된 바와 같은 그리고 Sambrook 및 Russell (2001), Molecular Cloning, A laboratory manual; Grierson 및 Covey (1988) Plant molecular biology 및 Watson *et al.* (1997) Recombinant DNA에서 기술된 바와 같은 형질전환 방법을 포함한다.

- [0115] 성장 배지에서 이용할 수 있는 빛의 양 및/또는 이용할 수 있는 수크로오스의 양은 상기 폴리펩티드의 생산에 영향을 미칠 수 있다. 성장 배지 및 가스 혼합물 (예를 들면 이산화탄소 농도)을 포함하는 조건은 사용되는 식물 재료 및 생산될 것이 요구되는 바이오매스에 기초하여 각 특정한 폴리펩티드의 생산을 위해 통상의 기술자에 의하여 용이하게 최적화될 수 있다.
- [0116] 본 발명의 두 번째 측면의 방법은 리피 바이오매스로부터 폴리펩티드를 얻는 추가의 단계를 포함한다. 그렇게 얻어진 폴리펩티드는 또한 본 발명 내에 포함된다. 편리하게는, 상기 폴리펩티드는 조직 추출물을 생산하기 위해 리피 조직을 파쇄하고 (crushing) 그 조직 추출물로부터 폴리펩티드를 분리함으로써 얻어진다.
- [0117] 편리하게는, 상기 폴리펩티드는 여과, HPLC, 이온 교환 수지 추출 (ion exchange resin extraction), 소수성 상호작용 수지 추출 (hydrophobic interaction resin extraction), 친화성 크로마토그래피 또는 오일-물 상 분리 (oil-water phase separation) 중 적어도 어느 하나를 사용하여 조직 추출물로부터 정제된다.
- [0118] 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 정제하는데 사용하기 위해 태그 (tag)를 포함할 수 있다. 상기 태그는 GST, 비오틴, 6His, 스트렙, HA 또는 myc 태그와 같은, 절단될 수 있는 또는 절단될 수 없는 태그일 수 있다.
- [0119] 본 발명은 또한 본 발명의 첫 번째 측면의 방법에 의해 얻어진 리피 바이오매스를 포함한다.
- [0120] 상기 방법으로부터 얻어진 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드, 효소, 성장인자, 면역글로불린, 호르몬, 구조 단백질, 식물의 스트레스 반응에 관여하는 단백질, 생물 약제 또는 백신 항원 중 어느 하나일 수 있다.
- [0121] 본 발명의 세 번째 측면은 리피 바이오매스에 존재하는 성분을 얻는 방법으로서, 본 발명의 첫 번째 측면에 따라서 리피 바이오매스를 생산하는 단계 및 상기 리피 바이오매스로부터 성분을 얻는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다. 전형적으로, 상기 성분은 실질적으로 순수한 형태로 얻어지고, 그래서 상기 방법은 성분을 정제하는 추가의 단계를 포함할 수 있다. 실질적으로 순수한 형태는 전형적으로 성분의 >90%, 또는 >95% 또는 >99%를 포함한다.
- [0122] 상기 성분은 상기 리피 바이오매스로부터 그 분비에 의해서 또는 리피 바이오매스로부터 추출에 의해서, 예를 들면 리피 바이오매스를 파쇄하여 성분을 방출시킴으로써 얻어질 수 있다.
- [0123] 얻어진 성분은 의약품, 재조합으로 발현된 폴리펩티드, 탄수화물, 지질, 오일, 휘발성 방향족 화합물, 항산화제, 색소, 향미 또는 향미 전구체; 및 상기 성분은 내인성 또는 외인성일 수 있다.
- [0124] 본 발명은 추가로 추가의 산물, 예를 들면 바이오연료, 식품 또는 의약품으로 상기 얻어진 성분을 가공하는 것인 방법을 제공한다.
- [0125] 본 발명은 또한 시험관 내 식물 세포에서 폴리펩티드를 생산하는 시스템으로서:
- [0126] 미분화 세포의 리피 조직으로의 분화를 촉진시키는 작용제; 및
- [0127] 엽록체 내로의 도입 및 내에서의 발현에 적당한, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 것인 시스템을 제공한다.
- [0128] 본 발명의 추가의 측면에서 이산화탄소를 포획하는 방법으로서, 상기 방법은 본 발명의 첫번째 측면의 방법을 수행하는 단계를 포함하는 것인 방법이 제공된다.
- [0129] 본 발명의 첫 번째 측면의 방법으로부터 유래된 리피 바이오매스로 정제되도록 시료를 노출시키는 단계를 포함하는 시료를 정제하는 방법.
- [0130] 상기 정제 공정은 하나 또는 그 이상의 독소를 제거하기 위한 것일 수 있다.
- [0131] 다음 성분을 제제화하는 단계를 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 방법이 또한 제공된다:
- [0132] 본 발명의 다른 측면의 방법에 의해 얻어진 성분 및 약학적으로 허용가능한 담체 희석액, 부형제 또는 담체.
- [0133] 게다가, 본 발명의 다른 측면의 방법에 의해 얻어진 성분 및 약학적으로 허용가능한 담체 희석액, 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 산물이 제공된다.
- [0134] 본 발명의 추가의 측면에서 본 발명의 다른 측면의 방법에 의해 얻어진 성분의 발효 또는 에스테르교환시키는 단계를 포함하는 바이오연료를 제조하는 방법이 제공된다. 이 제조 방법에 의해 얻어진 바이오연료가 또한 제공된다.

[0135]

본 발명은 다음의 실시예 및 도면을 참조하나 이에 한정되지 않고 더 상세하게 지금 기술될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0136]

도 1. 색소체 형질전환된 GFP-6 계통의 서던 블롯 분석.

(A) 표적 엽록체 부위에서 야생형 니코티아나 타바쿰 뽐티 하바나 (*Nicotiana tabacum* Petit Havana) (Wt-pt DNA) 및 형질전환된 (T-pt DNA) 담배 색소체 게놈의 물리 지도. 각 지도 아래의 화살표는 각 게놈 DNA의 BglIII 절단 후 예상되는 DNA 절편의 크기를 나타낸다. 담배 색소체 게놈의 서열은 오렌지 색으로 나타낸 반면, 베터 서열은 흰색으로 나타낸다. (B) 형질전환 계통 GFP-6 (GFP-6) 및 야생형 담배에서 BglIII로 전체 게놈 DNA의 절단 후 서던 블롯 분석. 절단된 게놈 DNA는 0.7% (w/v) 아가로오스 젤 상에서 전기영동되고, 나일론 막 위로 이동되고 프라이머 PHK40-F 및 rps12-out-R (검은색 바)로 표적 부위의 중폭에 상응하는 Dig-표지된 PCR 절편으로 탐지되었다.

도 2. 색소체 형질전환된 GFP-6 담배 계통에서 GFP+ 검출.

GFP 발현이 (A) GFP-6 호모플라스토믹 (homoplasmic) 계통 (GFP-6)에서 UV 및 가시광선 하에서 대조군인 야생형 (wt) 담배 식물체와 함께 시각화되었다. (B) GFP-6 및 야생형 계통으로부터 얻은 가용성 단백질의 단백질 전기영동. 각 식물의 5 µg의 전체 가용성 단백질 추출물이 12.5% (w/v) SDS-PAGE 젤 상으로 미리 염색된 (prestained) 단백질 표지 (New England Biolabs, UK)와 함께 로드되었고 (loaded) 단백질 분리는 실버 염색 (silver staining)에 의해 가시화되었다. GFP는 웨스턴 블로팅에 의해 특이적 항-GFP 항체를 사용하여 특이적으로 검출되었다. 미리 염색된 표지의 이동이 또한 나타난다.

도 3. 서로 다른 색소체 형질전환된 담배 조직에서 GFP+ 발현.

GFP-6 및 야생형 담배로부터 얻은 복수의 캘러스, 세포 혼탁액 및 잎으로부터 전체 가용성 단백질 추출물이 발생되었다. 잎 추출물은 단지 1 µg가 로드된 반면 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액은, 5 µg 전체 가용성 단백질이 12.5% (w/v) SDS-PAGE 젤 위로 각 레인 (lane)마다 로드되었다. (A)는 실버-염색된 젤에 해당하는 반면, (B)는 GFP 항체를 사용한 상응하는 웨스턴 블롯을 대표한다. GFP 표준시약은 Roche Life Science, UK로부터, 미리 염색된 단백질 표지 (Prestained Protein Marker)는 New England Biolabs, UK로부터 구입되었다. 표지 단백질의 ladder size는 kDa이다. Wt는 니코티아나 타바쿰 뽐티 하바나 (*Nicotiana tabacum* Petit Havana)를 나타내고, *E. coli*는 pFMGFP로 형질전환된 *E. coli* KRX 스트레인으로부터의 단백질 추출물에 해당한다.

도 4. 서로 다른 조건하에서 GFP-6 색소체 형질전환된 복수의 캘러스의 성장.

호모플라스토믹 (homoplasmic) 복수의 캘러스 GFP-6의 사진은 25°C에서 4주의 성장 후에 찍혔다. 플레이트 (A, B, C 및 D)는 담배의 묘와 유사한 강도로 16/8h 빛과 함께 성장되었고 (E, F, G 및 H)는 어둠 속에서 성장되었다. 단지 A, B, E 및 F가 배지 내에서 3%(w/v) 수크로오스를 포함하였다. 모든 배지는 500 mg/L 스펙티노마이신 및 500 mg/L 스트렙토마이신을 포함하였다. 형광 발광 (fluorescence emission)은 Axiovision software (Version 3.0)와 함께 Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss, Goettingen, Germany)을 사용하여 490 nm에서 여기 (excitation)된 후 520 nm에서 검출되었다. 형광 노출은 A, D 및 E, H에서 각각 30 ms, 100 ms 및 600 ms였다. 현미경 배율은 A, D, E 및 H에서 40X로 동일하였다.

도 5. 서로 다른 조건하에서 성장된 GFP-6 복수의 캘러스에서 GFP+의 검출.

전체 가용성 단백질이 빛 (L) 또는 어둠 (D)에서 성장한 복수의 캘러스 뿐만 아니라 빛과 당 (sugar) 하에서 성장한 야생형 (Wt)으로부터 추출되었다. 배지 내 수크로오스의 존재는 (+)로 나타낸 반면 수크로오스가 없는 (sucrose-free) 배지는 (-)로 기술되었다. 각각의 복수의 캘러스의 5 µg의 전체 가용성 단백질이 12.5% (w/v) SDS-PAGE 젤 (L-, L+, D+, D-, wt) 위로 로드되었고 전체 단백질 함량 (A)이 실버 염색에 의해 검출되었다. M은 Prestained Protein Marker (New England Biolabs, UK)를 나타내고 상응하는 크기가 kDa으로 왼쪽에 나타나있다. (B) GFP+ 존재는 항-GFP 항체로 특이적으로 검출되었다. GFP 표준시약 (Upstate, USA)은 나노그램으로 나타낸 양으로 첨가되었다.

도 6. 일시적 침적 생물반응기로부터 새롭게 형성된 녹색 바이오매스 내 GFP+ 발현.

6주 배양 기간 후, GFP-6 계통의 담배 바이오매스 (A)가 일시적 침적 생물반응기로부터 제거되었다. 아세톤 추출 프로토콜을 사용하여 새롭게 형성된 잎으로부터 전체 단백질이 추출되었고 미리 염색된 SDS-PAGE standard low range (Bio-Rad Laboratories, UK)와 함께 10% (w/v) SDS-PAGE 젤 위로 로드되었다 (B). 야생형

(wt) 및 GFP-6 계통 (GFP-6)로부터 얻은 단백질이 Coomassie Blue 염색으로 시작화되었다. 아세톤 분말의 서로 다른 희석물 (dilutions)이 항-GFP 항체로 면역블로팅 (C)에 의해 분석되었고 GFP 단백질 (Upstate, USA)의 알려진 양과 비교되었다.

도 7. 아세톤 침전 프로토콜 동안 GFP 검출.

아세톤 침전 프로토콜의 서로 다른 단계로부터 얻은 몇몇의 시료에서 GFP의 존재를 나타내는 웨스턴 블롯. 펠렛은 로딩 버퍼에 직접적으로 재현탁된 반면 세정 (washes)은 로딩 버퍼의 첨가 전에 speedvac (Savant, NY, USA) 내에서 하룻밤 동안 건조되었다. 세정 (W) 1 내지 4로부터 얻어진 모든 상층액이 첨가된 동안 단자 5 μ l의 펠렛 (P) 시료가 로드되었다.

도 8. 니코티아나 타바쿰 뽐티 하바나 (*Nicotiana tabacum* Petit Havana) 세포 혼탁액의 건조 및 생체 중량.

담배 야생형 세포의 생체 및 건조 중량이 18일-성장 기간동안 매 2일마다 결정되었다. 건조중은 신선한 담배 세포를 24 h, 80°C에 놓아둔 후 측정되었다. 측정은 세 차례 행해졌다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0137]

실시예 1: 일시적 침적 생물반응기를 사용하여 식물 엽록체에서 재조합 단백질의 억제된 그리고 높은 수준의 생산

[0138]

요약

[0139]

엽록체 형질전환은 식물에서 재조합 단백질의 상업적 생산을 위한 유망한 접근법이다. 그러나, 유전자 억제 (gene containment)는 경작지에서 색소체 형질전환 식물의 대규모의 경작을 위한 논의를 아직도 남겨 놓고 있다. 여기서 우리는 모델 단백질, 즉 녹색 형광 단백질 (GFP+)의 변형된 형태의 완전히 억제된 생산을 위한 담배의 색소체 형질전환 세포 혼탁액 사용의 잠재력을 평가했다. 색소체 형질전환 일에서 GFP+ 발현은 전체 가용성 단백질 (TSP)의 대략 60%에 도달했다. 세포 혼탁 배양 (및 복수의 캘러스)에서의 발현은 훨씬 더 적었으나 (TSP의 1.5%) 그럼에도 액체 배지의 리터당 약 7.2 mg을 여전히 생산했다. 우리는 추가로 복수의 캘러스 내에서 GFP+ 생산에 영향을 미치는 서로 다른 요인을 조사했고 투입으로서 빛의 중요성을 강조하였다. 마지막으로 우리는 형질전환 세포 혼탁 배양조직이 짙 형성을 개시하기 위해 티디아주론 (thidiazuron)의 존재하에 일시적 침적 생물반응기안에 위치한 신규 단백질 생산 플랫폼의 개발을 기술한다. GFP+ 수율은 생물반응기의 L당 인상깊은 660 mg에 도달하였다. 이 신규한 생산 플랫폼은, 신속한 색소체 형질전환 세포 혼탁 배양조직의 발생과 일시적 침적 생물반응기의 사용을 결합시켜, 재조합 단백질의 완전히-억제된 저비용 생산을 위한 유망한 경로이다.

[0140]

결과

[0141]

GFP+를 발현하는 호모플라스토믹 (homoplasticomic) 담배 짹의 발생

[0142]

담배 엽록체에서 GFP+를 발현하도록 제작된 벡터는 담배 엽록체에서 TetC 항원을 발현하는데 사용되었던, pJST10로부터 유래된다 (Tregoning *et al*, 2003). 플라스미드 pJST10는 담배 엽록체 유전자 *rrn16S* 및 *rps12/7* 사이에 발현 및 선별 카세트의 삽입을 목표로 한다 (도 1A). 충격 (bombardment) 후, 몇몇의 스펙티노마이신-저항성 짹이 10개의 독립한 충격으로부터 생산되었고 분석된 6개 중 4개의 짹에서 *gfp+* 삽입이 PCR 분석에 의해 검출되었다 (데이터는 보여지지 않음). GFP-6는 추가의 실험을 위해 선별되었고 MS 선별 배지 상에서 4 회의 계대 배양의 대상이 되었다.

[0143]

GFP-6 계통의 모든 엽록체가 형질전환되었는지를 확인하기 위하여, 이 식물의 잎으로부터 전체 게놈 DNA를 추출하고, BglII로 절단하고 서던 블롯의 대상이 되었다 (도 1). 예상했던 대로 삽입 부위에 일치하는 탐침이 야생형 담배 DNA에서 4.5 kb의 단일 밴드에 혼성화되었다. 반면에 7.1-kb 밴드는 *gfp+* 유전자 및 선별 표지의 삽입과 일치하여 GFP-6 계통에서 검출되었다. GFP-6에서 4.5 kb의 결여는 또한 GFP-6이 호모플라스토믹

(homoplastomic)이라는 것을 나타내었다 (도 1B).

[0144] GFP-6 계통에서 GFP+ 발현

담배의 GFP-6 계통은 토양에서 재배되고 GFP+의 발현은 식물을 UV/청색 광원 (blue light source)에 노출시킴으로써 검사되었다 (도 2A). 강한 녹색 형광이 GFP-6에서 GFP+ 발현을 나타내면서, 야생형에서가 아니라 GFP-6에서 관찰될 수 있었다. GFP의 축적을 확인하기 위해, 전체 가용성 단백질이 GFP-6 및 야생형 계통으로부터 추출되었고 SDS-PAGE 젤 상에서 분리되었다 (도 2B). 특이적 항-GFP 항체를 사용한 면역블로팅 분석은 GFP+의 축적 및 의미 있는 파괴 (break-down) 산물의 결여를 확인하였다. 실버 염색 (도 2B) 및 Coomassie-blue 염색된 젤 (데이터는 보여지지 않음) 분석은 27 kDa에서 이동하는, GFP+가 높게 발현되고 가용성 추출물 내에서 지배적인 단백질임을 드러내었다.

[0146] GFP-6 담배 계통의 잎, 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액에서 발현 수준의 비교

GFP-6 계통으로부터 얻어진 T0 종자는 시험관 내 MS 접시 상에서 발아되었고 결과로 얻은 어린 잎은 상응하는 형질전환 캘러스 및 세포 혼탁액을 발생시키는데 사용되었다. GFP+ 발현은 캘러스 상태, 세포 혼탁 배양조직 및 부모 식물 GFP-6의 잎에서 알려진 양의 상업적으로 이용가능한 GFP를 표준시약으로 사용하여 SDS-PAGE (도 3A) 및 반-정량적 면역블로팅 분석 (semi-quantitative immunoblotting analysis) (도 3B)에 의해 평가되었다.

[0148] 이 비교의 가장 두드러진 결과는 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액과 비교하여 담배 잎 내에 극도의 높은 GFP+ 발현 (도 3A)이었다. 면역블롯은 캘러스 및 세포 혼탁액 내 발현이 TSP의 약 1.5%인 반면, 잎에서 GFP+ 발현이 약 5 mg/g 생체중과 같은, TSP의 약 60%임을 나타냈다 (도 3B). 세포 혼탁액의 성장을 고려한 후 (보충 도 8), 색소체 형질전환 세포 혼탁액 내 GFP+ 생산의 비율은 대략 0.4 mg/L/day인 것으로 추정되었다.

[0149] 복수의 캘러스 내 GFP 발현에 대한 빛과 당 (sugar)의 영향

GFP+ 발현에 대한 빛과 외인성 수크로오스의 중요성을 평가하기 위하여, GFP-6 계통으로부터 얻은 색소체 형질전환된 복수의 캘러스가 한 달 동안 빛과 함께 또는 빛이 없이 그리고 수크로오스와 함께 또는 수크로오스가 없이 (도 4), 그러나 선별을 유지하기 위해 500 mg/L의 스팩티노마이신의 존재 하에서, 캘러스 유도 배지 (Callus Induction Media, CIM) 상에서 성장되었다. 도 4에서 보여지듯이, 복수의 캘러스의 성장은 빛의 세기와는 관계없이, 수크로오스의 첨가에 의해 의미 있게 촉진되었다. 빛과 당 모두가 색소체 형질전환된 복수의 캘러스에 이용가능할 때, GFP+를 발현하는 많은 수의 작은 엽록체/색소체가 시토솔 (cytosol) 내로 흘어진 것으로, 확인될 수 있었다 (도 4A). 만일 빛이나 당이 복수의 캘러스에 공급되지 않는다면, GFP 형광은 감소하고 엽록체/색소체의 수는 감소하며 세포의 중앙에 위치할 것이다 (도 4D 및 4E). 빛과 당의 부재하에서 성장된 복수의 캘러스에서는 GFP 발현이 검출되지 않았다 (도 4H).

[0151] 면역블로팅 실험은 빛에서는, 수크로오즈의 존재 또는 부재와 무관하게, 발현이 올라가는 반면, 완전한 어둠 속에서 성장된 세포는 GFP를 거의 또는 전혀 발현하지 않음을 확인해 주었다 (도 5).

[0152] 빛과 수크로오스 (L+)의 존재 하에서 성장될 때, GFP+ 발현 수준은 면역블로팅에 의해 TSP의 약 4%인 것으로 추정되었다 (도 5). 복수의 캘러스의 생체 및 건조 중량으로 정상화될 때, 이것은 각각, 48 µg/g f.w. (생체 중) 또는 약 1 mg/g d.w. (건조중)까지의 GFP+ 발현 수준에 상응하였다.

[0153] 색소체 형질전환 바이오매스의 생산을 위한 일시적 침적 생물반응기의 사용

색소체 형질전환 유전자 발현이 잎 조직에서 가장 높은 것으로 보이는 것을 고려하여 우리는 캘러스/세포 혼탁액으로부터 잎 조직의 신속한 성장을 위한 방법을 개발하려고 시도하였다. 예비 실험에서, 우리는 담배에서 채세포 배 성장을 촉진시키는 것으로 알려진 (Gill and Saxena, 1993), 티디아주론 (TDZ)의 첨가가, 고체 MS 배지 상에서 성장된 GFP-6 복수의 캘러스로부터 짹 형성을 유도할 수 있다는 것을 발견하였다 (데이터는 보여지지 않음). 생산 능력을 확대하기 위하여, 담배 GFP-6 계통으로부터 얻은 색소체 형질전환 세포 혼탁액이 2-L 생물반응기 내로 실리고 0.1 µM TMZ가 첨가된 MS 배지 내에 일시적으로 잡기었다. 약 6주 후, 많은 수의

싹이 생산되었다 (도 6A). 첫 14일 동안, 어떤 성장도 검출될 수 없었고 싹은 이 기간 후에야 비로소 성장하기 시작하였다. 아마도 이 지체된 기간 (lag period)은 애기장대에서 복수의 캘러스 및 분열 조직 사이에서 관찰된 전환과 유사한 방법으로 세포가 캘러스 조직으로부터 리피 조직으로 재분화하는데 필요한 시간과 관련되어 있다 (Gordon *et al*, 2007).

[0155] 40일 후, 전체 바이오매스가 분석을 위해 생물반응기로부터 제거되었다. 식물 재료의 조사는 최소의 유리화 (vitrification)를 갖는 주로 건강한 잎의 존재를 드러내었다.

[0156] 전체 약 470 g의 생체중량의 바이오매스가 2-L 생물반응기 내에서 생산되었다. 이 바이오매스 내에 생산된 GFP+의 양을 평가하기 위하여, 단백질 침전 프로토콜이 아세톤 내 단백질 침전에 기초하여 개발되었다. 이 방법을 사용하여, 분말이 생산되고, 무게가 측정되고 생산된 GFP+를 검출하기 위해 SDS-PAGE 젤 상으로 로딩되었다 (도 6B). 야생형으로부터 결여된, 약 27 kDa의 크기를 가지는, 선명한 밴드가 검출되었다. 색소체 형질 전환 바이오매스 내의 GFP+의 생산을 정량하기 위하여, 아세톤 분말의 몇몇의 양이 로드되었고 이 분말의 1 μg 이 면역블로팅에 의해 대략 150 ng의 GFP+를 포함하는 것으로 추정되었다 (도 6C). 이것은 발현 수준이 약 2.8 mg/g 생체중에 도달했음을 나타내었다.

[0157] 생물반응기 내에서, 전체 GFP 생산은 40-일 성장 기간 동안 GFP의 대략적인 비율 17 mg/L/day로 약 660 mg/L 에 도달하였다. 이 값은 세포 혼탁액으로 잠재적으로 달성가능한 비율인 0.4 mg/L/day보다 대략 42-배 높다.

[0158] 논의

[0159] 담배 색소체 형질전환 세포 혼탁 배양

[0160] 엽록체 형질전환 영역에서 지금까지 대부분의 실험은 관심 있는 몇몇의 유전자 발현을 위해 잎에 초점을 맞추고 있었다. 어떤 실험은 색소체 형질전환 감자 덩이줄기 (Sidorov *et al*, 1999) 및 색소체 형질전환 토마토 과실 (Ruf *et al*, 2001)에서의 발현에 관하여 이루어졌으나 그 발현 산출량은 상대적으로 빈약하였다 (각각 TSP의 0.05 및 0.5%). 그러나, 색소체 형질전환된 것임에도 불구하고, 형질전환 식물을 재배하는 것은 공중의 많은 부분에 의해 아직 나쁘게 인식될 수 있고 가능한 환경적인 논의는 어느 미래의 발달에 급격한 영향을 줄 수 있다. 게다가, 각각의 새로운 색소체 형질전환체의 경작지 방출과 연관되어 매우 의미 있는 규제 비용이 있다. 억제된 색소체 형질전환 세포에 기반한 배양에서 재조합 단백질의 생산은 많은 이러한 걱정을 극복하고 이 새로운 생산 시스템의 고도로 억제된 본질로 인하여 규제 비용을 의미 있게 줄일 것이다.

[0161] 서로 다른 형태의 발현 시스템을 비교하기 위하여, 우리는 우선 녹색 형광 단백질 (GFP+)의 변종을 발현하는 담배의 호모플라스토믹 (homoplastic) 계통을 창출하였다. GFP는 이전에 담배 (Khan and Maliga, 1999; Newell *et al*, 2003), 감자 (Sidorov *et al*, 1999) 및 상추 (Kanamoto *et al*, 2006)를 포함하는 서로 다른 범위의 식물의 엽록체에서 높은 발현 능력을 보여주었다. 여기에 기술된 GFP 발현 수준인, 잎에서 대략 TSP의 60%,는 발현의 고점 (high end)에 있고 TSP의 36%에서 GFP가 달성되었던 상추의 GFP 발현에서 관찰된 값과 유사하다 (Kanamoto *et al*, 2006).

[0162] 우리의 결과는 GFP+ 발현 수준이 TSP의 1.5 내지 4% 사이에서 변하는 수준을 가지는 잎 (도 3 및 5)와 비교하여 복수의 캘러스 및 세포 혼탁 배양에서 더 낮다는 것을 분명히 보여주었고, 이는 TSP의 1%인 일시적 색소체 형질전환 상추 복수의 캘러스에서 GFP 발현과 유사하다 (Lelieveld *et al*, 2005).

[0163] 색소체 형질전환 세포 혼탁액 내에서 GFP+의 발현은 TSP의 약 1.5%에 도달하였고, 이는 0.4 mg/L/day의 생산 속도에서 7.2 mg/L와 일치한다 (도 5). 이 발현 수준은 배양 배지의 최적화에 의해, 예를 들면 폴리비닐 피롤리돈 (polyvinyl pyrrolidone) 및/또는 젤라틴의 첨가에 의해 아마도 증가될 수 있었고, 이는 핵 형질전환 식물 세포에서 단백질 발현의 수율을 높이는 데 기여했다 (Kwon *et al*, 2003; Lee *et al*, 2002). 우리는 또한 GFP+ 수준이 빛과 당 함량을 더 최적화시킬 때 약 4% TSP까지 증가될 수 있었다는 것을 보여주었다 (도 5). 만일 이 결과가 세포 혼탁액 성장 기간에 외삽된다면, GFP+ 생산은 잠재적으로 약 1 mg/L/day에 도달할 수 있을 것이다.

[0164] 색소체 형질전환 복수의 캘러스에서 GFP+의 생산에 영향을 미치는 요인들

[0165] 색소체 형질전환 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액에서 일반적으로 더 낮은 발현 수준은 엽록체 형질전환 벡터의 선택에 의해서 및 특별하게는 GFP+ 발현을 만든 각각의 프로모터에 의해서 직접적으로 설명될 수 있었다. pFMGFP에서 사용된 *RNA16S* 유전자의 프로모터, *Prrn*은, 벼로부터 유래한, 잎에서의 그 활성과 비교하여 벼의 배 세포에서 그 활성이 7배 감소한 *RNA16S* 프로모터와 유사하다 (Silhavy and Maliga, 1998). 세포 혼탁액의 색소체가 잎의 엽록체보다 덜 분화되었기 때문에 동일한 현상이 여기서 일어났을 것이다. 그러나, 추가의 실험은 잎 및 복수의 캘러스 모두에서 GFP mRNA 수준을 mRNA 수준에서의 감소 또는 엽록체 수에서의 가능한 변화 사이를 구별할 수 있도록 평가되어야 할 것이다.

[0166] 수크로오스는 증가하는 세포 성장에 더 관계된 것으로 보이는 반면에, 빛은 의미 있는 GFP+ 발현을 위해 명백히 필수적인 것으로 보인다 (도 5). 그러나, 어둠 속에서 1-개월의 배양 기간에도 불구하고, GFP+는 매우 안정하고 어둠 속에서 수크로오스가-보충된 배지 상에서 성장한 캘러스에서 검출된 발현이 어둠으로 옮겨지기 전 담배 세포로부터의 잔여 GFP+ 생산과 일치할 수 있기 때문에, 이 결과는 편향된 것일 수 있다. 사실상, 동일한 프로모터에 의해 만들어진, 감자 미소괴경 (microtubers)에서의 GFP 발현은 단지 0.05% TSP에 도달하였는데 (Sidorov *et al*, 1999), 이는 *prrn* 프로모터 하에서 GFP 발현의 실제 기준치는 여기서 관찰된 것보다 훨씬 적다는 것을 나타낼 수 있다.

[0167] 우리의 실험에서, 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액이 녹색으로 남아있고 세포주변에 넓게 퍼진 다수의 엽록체를 보유했다는 것은 주목할만 했다 (도 4A). 이 세포에서 GFP+는 약 4% TSP에 도달하였고, 그러한 높은 수준은 이 세포가 실제로는 완전히 탈분화되지 않은 일시적 세포 혼탁액이라는 것과 그 속에서 색소체는 기능적인 엽록체와 여전히 유사하다는 것을 나타낼 수 있었다.

[0168] 일시적 침적 생물반응기 내 색소체 형질전환 바이오매스의 생산

[0169] 잎에서의 GFP+의 생산은 미분화 세포 내의 그것보다 대단히 우세하였고 (도 3) 그러므로 색소체 형질전환 캘러스 조직으로부터 짹 유도를 촉진시키기 위해 시도되었다. 고체 배지에 티디아주론 (TDZ)의 첨가는 6주 후 복수의 캘러스로부터 짹의 형성을 유도하였다 (데이터는 보여지지 않음). 흥미롭게도, 마젠타 박스 (magenta box) 내에서 관찰된 성장은 직선적이지 않았고, 첫 2주 내에 특별한 성장은 검출되지 않았다.

[0170] 그러나, 색소체 형질전환 세포 혼탁액이 세포 물질이 액체 속에 잠김을 당한 일시적 침적 조건 하에 놓여졌을 때 가끔, 단지 짹은 기간 동안 일시적 침적 형태 생물반응기를 사용하여, "리피" 물질의 생산은 극도로 풍부한 최종 바이오매스 생산과 함께, 효율적이고 의미 있었다 (도 6A). 바이오매스 성장에서 유사한 유도기 (lag phase)가 고체 배지에 기반한 유도 및 첫 2주 동안 아무런 성장도 검출되지 않았던 일시적 침적 바이오 배양기에 기반한 유도 내에서 관찰되었다.

[0171] 그 물질은 주로 건강한 작은 잎으로 구성되어 있었고 GFP+ 함량은 약 0.66 g/L에 도달하는 것으로 추정되었다 (도 6C). 이 값은 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포에서 관찰된 생산보다 약간 낮지만 (Wilke and Katzek, 2003) 식물-기반의 시스템 내에서 얻어진 최고값 중 하나이다. 게다가, 발현 수준은 어떤 최적화도 없이 얻어졌고 미래의 발달은 공정의 생산량 및 확장성을 향상시킬 것이다. 예를 들어, 1회용 가방 (disposable bag)으로의 유리병 (glass bottle)의 교환은 아마도 더 나은 빛의 침투 및 배분으로 인해, 일시적 침적을 사용해 생산된 커피 체세포배의 양을 거의 두 배로 만들었다 (Ducos *et al*, 2008). 만일 유사한 시스템이 색소체 형질 전환 담배 짹과 함께 사용되었더라면, 생산 수율은 1 g/L 이상에 도달할 수 있었을 것이다.

[0172] 여기에 기술된, 적절하게 규모가 있는 시스템은 온실 내에서 전체 식물체의 생산보다 훨씬 덜 노동 집약적일 것이고, 또한 유리온실 억제 시설 (glasshouse containment facilities)을 요구하지 않는다. 그것은 또한 종자가 생산될 필요가 없기 때문에 형질전환된 조직으로부터 표적 단백질의 생산으로의 잠재적으로 빠른 경로를 제공한다. 사실상, 일단 호모플라스토믹 (homoplasticomic) 담배 계통이 확인되면, 일시적 침적 생물반응기에 적합한 세포 혼탁 배양조직을 얻는 데 단지 1개월이 요구되며, 반면에, 종자가 생산될 필요가 있으면, 약 3개월이 필요하다 (Molina *et al*, 2004). 최근에 기술된 일회용 생물반응기와 색소체 형질전환 짹의 일시적 침적 성장의 결합 (Terrier *et al*, 2007; Ducos *et al*, 2008)은 그러므로 식물에서 생물 약제의 저비용 생산을 위한 유망한 경로이다.

[0173] 실험적 과정

[0174] 담배 짹, 복수의 캘러스 (callus) 및 세포 혼탁액 발생

[0175] 니코티아나 타바쿰 뽕띠 하바나 (*Nicotiana tabacum* Petit Havana) (담배)의 묽, 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액이 25°C, Fi-Totron 600H 배양기 (Sanyo, Watford, UK) 내 30% 습도에서 16 시간의 광주기 (약 100 μmol/m²/s) 하에서, 성장되었다. 담배의 묽는 MS 배지 (Murashige and Skoog, 1962) 상에서 발아되었고 복수의 캘러스가 1 mg/L의 1-나프탈렌아세트산 (NAA) 및 0.1 mg/L 키네틴 (Kinetin) (K)으로 보충된 MS 배지인, 캘러스 유도 배지 (Callus Induction Media) (CIM) 위로 일의 작은 조각을 놓아둠으로써 생산되었다. 세포 혼탁액은 140 rpm의 일정한 교반하에서 아가 (agar)를 결여한 CIM 배지에서 다양한 복수의 캘러스를 배양함으로써 발생되었다. 모든 식물 호르몬 및 배지는 Sigma, St Louis, MO, USA로부터 구입되었다.

[0176] 엽록체 형질전환 벡터의 제작

[0177] 엽록체 형질전환 벡터 pFMGFP가 이전에 규명된 담배 엽록체 벡터 pJST10 (Tregoning et al, 2003) 내에서 NdeI 및 XbaI 제한효소 부위를 사용한 이중 절단에 의해 *TeTC* 유전자를 *gfp+* 유전자로 바꿈으로써 만들어졌다 (Scholz et al, 2000).

[0178] 색소체 형질전환 식물체의 발생

[0179] 담배 엽록체 형질전환 벡터 pFMGFP로 6주 된 야생형 담배 일의 바이올리스틱 (biostatic) 형질전환이 1 mg/L 티아민, 100 mg/L 미오-이노시톨, 1 mg/L N6-벤질아데노신 (BAP) 및 0.1 mg/L 1-나프탈렌아세트산 (NAA)으로 보충된 MS 배지에 기초한 조성을 갖는 RMOP 배지 (Svab et al, 1990) 상에서 1100 psi의 파열판 (rupture disks)과 함께 PDS1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 입자 투사 장치를 사용하여 수행되었다. 벡터 pFMGFP는 제조사의 권고를 따라서 550 nm 금 입자 (SeaShell, La Jolla, CA, USA) 위로 코팅되었다. 포격 (bombardment) 후, 일은 식물 재료가 작은 조각 (5 mm x 5 mm)으로 절단되기 전 48 시간 동안 어둠 속에 남아있었고 500 mg/L 스펙티노마이신 디히드로클로리드로 보충된 RMOP 배지 위로 놓여졌다. 스펙티노마이신 저항성 짹은 동일한 배지 상에서 4회 계대배양 되었다.

[0180] 서던 블롯 분석

[0181] 담배 색소체 유전체 (plastome) 내로 벡터의 삽입은 *gfp+*의 시작부와 벡터 pFMGFP의 상동 부위 바깥에 있는 담배 색소체 유전체 상의 다른 것에 어닐링하는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 평가되었고 (데이터는 보여지지 않음) 색소체 형질전환 GFP-6 계통이 모든 추가의 실험을 위해 선택되었다. 호모플라스토미 상태는 야생형 및 색소체 형질전환 GFP-6 계통 모두로부터 얻은 절단된 전체 게놈 DNA의 서던 혼성화에 의해 평가되었다. 약 7 μg의 게놈 DNA는 BglII으로 절단되고 0.7% (w/v) 아가로스 젤 상에서 전기영동되었다. 그 DNA 젤은 20 x SSC 버퍼 내에서 하룻밤 동안 모세관 현상에 의해 나일론 막 (Hybond-N, Amersham, Uppsala, Sweden) 위로 옮겨졌다.

[0182] 탐침은 DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, UK)를 사용하여 37°C에서 하룻밤 동안 DIG로 표지되었다. 표적 부위에 상동인 3 kb 탐침이 pJST10-F 5'AATTCAACCGCCGTATGGCTGACCGGCGA 3' 및 Rps12-OUT-R 5'TTCATGTTCCAATTGAACACTGTCCATT 3' 프라이머 및 담배 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 PCR에 의해 얻어졌다. 탐침 표지 및 혼성화는 제조사의 권고에 따라서 최종 탐침 농도 25 ng/ml으로 수행되었다. 규정된 CSPD와 함께 특이적 신호의 검출은 X-ray 필름 (Amersham, Uppsala, Sweden)에 의해 제조사의 지침에 따라 검출되었다. 서던 블롯 분석에 의해 호모플라스토미를 확인한 후, GFP-6 유식물체 (plantlet)가 토양으로 옮겨졌고 종자를 생산하도록 허용되었다. 이 T₀ 종자는 500 mg/L 스펙티노마이신으로 보충된 MS 배지 위로 발아되었고 어린 T₀ 일은 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액 발생을 위해 사용되었다.

[0183] 단백질 추출

[0184] 첫째로, 전체 가용성 단백질의 추출이 (Kanamoto *et al*, 2006)를 따라서 수행되었다. 식물 재료 (잎, 복수의 캘러스, 세포 혼탁액)가 액체 질소와 함께 고운 분말로 갈아졌고 전체 가용성 추출 버퍼 (50 mM HEPES pH 7.6, 1mM DTT, 1mM EDTA, 2% (w/v) 폴리비닐 피롤리돈 및 한 알의 완전한 프로테아제 저해제 EDTA-free cocktail (Roche Products Ltd, Welwyn Garden City, UK)와 혼합되었다. 식물 혼합물은 1분 동안 볼텍스 되었고 (volaxed) 13,000 rpm에서 30분 동안 스핀다운 (spun down) 되었다. 상층액은 분액되고 (aliquoted) 이후 사용될 때까지 -20°C에서 저장되었다.

[0185] 두 번째 방법은 전체 단백질 추출 프로토콜에 기반한 아세톤 침전에 기초하였다. 식물 재료는 액체 질소에서 고운 분말로 갈아졌다. 30 ml의 추출 버퍼 (80% (v/v) 아세톤, 5 mM 아스코르베이트)가 2 g의 식물 분말 또는 동등한 잎에 첨가되었고 혼합물은 Ultra-Turrax (IKA, Heidelberg, Germany)와 함께 얼음 위에서 15 초 동안 균질화되었다. 단백질은 4°C에서 5분간 5000 g로 원심분리에 의해 펠렛화되었다. 상층액은 버려지고 펠렛은 동일한 추출 버퍼와 동일한 원심분리 조건을 사용하여 4회 세정되었다. 그 후 펠렛은 순수 아세톤 내에서 재현탁되고 다시 균질화되었다. 단백질은 4°C에서 5분간 10,000 g로 한번 더 가라앉혔다 (spun down). 상층액은 버려지고 펠렛은 순수 아세톤 내에서 3번 더 세정되었다. 마지막 세정 동안에, 버퍼는 분액되고 Speed-Vac (Savant, Holbrook, NY, USA)을 사용하여 건조되고 잔여 분말이 아세톤 분말 (acetonic powder)로 칭해졌다. 펠렛 및 서로 다른 세정 (washes) 내 GFP의 존재가 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출되었다 (보충 도 7).

[0186] 전기영동 및 웨스턴 블롯 분석

[0187] 색소체 형질전환 및 야생형 시료로부터 얻은 단백질이 12.5% (w/v) SDS-PAGE 젤에 정량 목적으로 단백질 표지 및 상업적으로 이용가능한 재조합 GFP (Upstate, Waltham, MA, USA)와 함께 분할되었다 (resolved). 단백질 젤은 Coomassie Blue로 또는 실버 염색으로 직접 염색되었다.

[0188] 전기영동 다음으로, 단백질은 제조사의 권고에 따라 mini Trans-Blot[®] system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하거나 또는 iBlot dry transfer system을 사용함으로써 (Invitrogen, UK) 0.2 μm 니트로셀룰로스 막 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 위로 이동되었다. 이동 후, GFP 특이적 검출이 2차 항체 (홀스래디쉬 퍼옥시다아제-결합 염소 항-토끼 면역글로불린 G, Amersham, Uppsala, Sweden)는 1:10,000으로 희석된 반면 1:20,000으로 희석된 1차 토끼 다클론성 항-GFP 항체 (primary rabbit polyclonal anti-GFP antibody) (Prof Nixon, Imperial College London, UK에 의해 제공됨)로 수행되었다. 생화학적 검출은 ECL SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescence Substrate kit (Pierce Biotechnology Inc., UK)로 수행되었다.

[0189] 일시적 침적 생물반응기

[0190] 담배 바이오매스는 약 7 그램의 니코티아나 타바쿰 뾰띠 하바나 (*Nicotiana tabacum* Petit Havana) 세포 혼탁액을 2-L 일시적 침적 생물반응기 안에 놓아둠으로써 발생되었다 (Ducos *et al*, 2007). 침적은 40-광주기 이상 (over a 40-day period) 0.1 μM 티디아주론 (TDZ, Sigma, UK)으로 보충된 1-L MS 배지와 함께 매 3시간마다 5분간 수행되었다. 추가적으로, 상기 배지는 오염을 방지하고 형질전환 세포를 선별하기 위해 100 mg/L의 스펙티노마이신을 포함하였다. MS 배지 내 TDZ (티디아주론)의 농도는 페트리디쉬 (Petri dishes) 내 복수의 캘러스 고체 유도 (callus solid induction)에 기초하여, Nestle에서 연구자들에 의해 0.1 μM에서 최적인 것으로 추정되었다 (데이터는 보여지지 않음). 배지는 공기 펌프에 의해 2-L 용기 내로 3분간 밀어졌고 (pushed) 중력에 의해 2분간 더 원래의 병으로 돌려보내지는 것이 허용되었다. 광 조건 및 온도는 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액 성장 실험과 유사하였다.

[0191] 형광 현미경

[0192] GFP를 발현하고 GFP-6 계통으로부터 유래한 색소체 형질전환 담배 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액이 Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss, Goettingen, Germany) 및 Axiovision software (version 3.0)를 사용하여 관찰되었다. 여기 및 발광 파장은 GFP+ 검출에 최적이 되도록, 각각 491 nm 및 512 nm로 설정되었다 (Scholz *et al*, 2000). 노출 및 배율은 실험에 따라 변하였고 각각의 도에서 나타난다.

[0193] 표 S1. 생체, 건조증 및 아세톤 분말 사이의 비율

[0194] 이 비율은 GFP의 강력한 정량(robust quantification)의 결정을 위해 계산되었다. 값은 생체증(f.w.), 건조증(d.w.) 및 아세톤 분말(powder)의 최소 4 반복의 평균을 대표하였다. 복수의 캘러스 및 세포 혼탁액(Cells)은 각 성장기의 끝에서 수확되고 일 측정은 어떤 2-3 주된 유식물체에서 수행되었다(식물마다 약 4개의 일으로, 일시적 침적 생물반응기 내에서 생산된 바이오매스와 유사하게).

조직 (Tissue)	d.w./f.w. (%)	분말 (Powder)/d.w. (%)
잎 (Leaves)	6.6 ± 0.9	28.3 ± 1.1
세포 (Cells)	4.4 ± 0.3	14.1 ± 1.4
캘러스 (Calli)	3.6 ± 0.4	12.4 ± 1.3

[0195]

[0196] 참조문헌 (References)

[0197] Azhagiri AK and Maliga P (2007) Exceptional paternal inheritance of plastids in *Arabidopsis* suggests that low-frequency leakage of plastids via pollen may be universal in plants. *Plant J* 52: 817-823.

[0198] Birch RG (1997) PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48:297-326.

[0199] Brinkmann N and Tebbe CC (2007) Leaf-feeding larvae of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) drastically reduce copy numbers of *aadA* antibiotic resistance genes from transplastomic tobacco but maintain intact *aadA* genes in their feces. *Environmental biosafety research* 6: 121-133.

[0200] Daniell H, Lee SB, Panchal T and Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of molecular biology* 311: 1001-1009.

[0201] Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current opinion in biotechnology* 11: 199-204.

[0202] Ducos J, Labbe G, Lambot C and Petiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43: 652-659.

[0203] Ducos J, Terrier B, Courtois D and Petiard V (2008) Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. *Phytochemistry Reviews* 7: 607-613.

[0204] Farran I, Rio-Manterola F, Iniguez M, Garate S, Prieto J and Mingo-Castel AM (2008) High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal* 6: 516-527.

[0205] Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S and Drossard J (1999) Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnology and applied biochemistry* 30 (Pt 2): 109-112.

- [0206] Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology* 7: 152-158.
- [0207] Fox JL (2003) Puzzling industry response to ProdiGene fiasco. *Nature biotechnology* 21: 3 4.
- [0208] Gill R and Saxena PK (1993) Somatic embryogenesis in Nicotiana tabacum L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Reports* 12: 154-159.
- [0209] Gleba Y, Klimyuk V and Marillonet S (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 18:134-41.
- [0210] Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P and Meyerowitz EM (2007) Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development (Cambridge, England)* 134: 3539-3548.
- [0211] Hagemann R (2004) The Sexual Inheritance of Plant Organelles, in *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* pp 93-113.
- [0212] Halioua E (2006) Status of biomanufacturing in the world. Eurobio conference 2006. www.eurobio2006.com/DocBD/press/pdf/41.pdf (accessed 3/3/09)
- [0213] Hellwig S, Drossard J, Twyman RM and Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature biotechnology* 22: 1415-1422.
- [0214] Huang CY, Ayliffe MA and Timmis JN (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422: 72-76.
- [0215] Huang J, Sutliff TD, Wu L, Nandi S, Benge K, Terashima M, Ralston AH, Drohan W, Huang N and Rodriguez RL (2001) Expression and purification of functional human alpha-1-Antitrypsin from cultured plant cells. *Biotechnology progress* 17: 126-133.
- [0216] Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A and Tomizawa K (2006) Efficient and stable transformation of Lactuca sativa L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic research* 15: 205-217.
- [0217] Kang TJ, Loc NH, Jang MO, Jang YS, Kim YS, Seo JE and Yang MS (2003) Expression of the B subunit of E. coli heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic research* 12: 683-691.
- [0218] Khan MS and Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid

transformation in higher plants. *Nature biotechnology* 17: 910-915.

- [0219] Kwon TH, Seo JE, Kim J, Lee JH, Jang YS and Yang MS (2003) Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnology and bioengineering* 81: 870-875.
- [0220] Langbecker CL, Ye GN, Broyles DL, Duggan LL, Xu CW, Hajdukiewicz PT, Armstrong CL and Staub JM (2004) High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant physiology* 135: 39-46.
- [0221] Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Jang YS and Yang MS (2002) Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *Journal of biotechnology* 96: 205-211.
- [0222] Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH and Nugent JM (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant molecular biology* 58: 763-774.
- [0223] Ma JK, Drake PM and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews* 4: 794-805.
- [0224] Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 55:289-313.
- [0225] Molina A, Hervas-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM and Veramendi J (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal* 2: 141-153.
- [0226] Monier JM, Bernillon D, Kay E, Faugier A, Rybalka O, Dessaux Y, Simonet P and Vogel TM (2007) Detection of potential transgenic plant DNA recipients among soil bacteria. *Environmental biosafety research* 6: 71-83.
- [0227] Murashige K and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473:497.
- [0228] Newell CA, Birch-Machin I, Hibberd JM and Gray JC (2003) Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts. *Transgenic research* 12: 631-634.
- [0229] Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H and Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature biotechnology* 19: 870-875.
- [0230] Ruf S, Karcher D and Bock R (2007) Determining the transgene containment level provided by chloroplast

transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6998-7002.

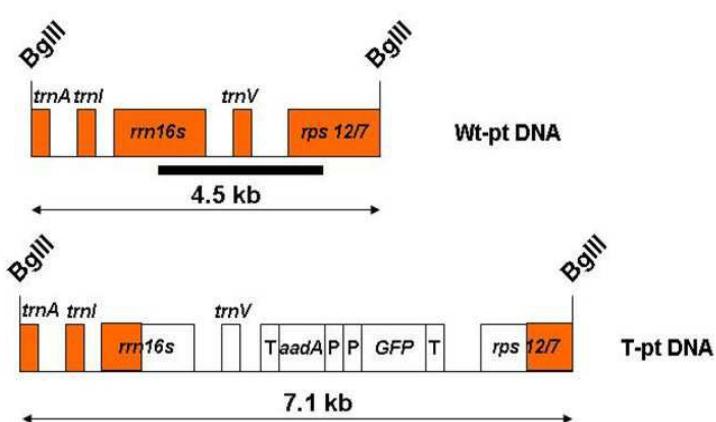
- [0231] Saxby S (1999) Commercial production of monoclonal antibodies. In: *Proceedings of the Production of Monoclonal antibodies Workshop* (Eds. McArdle JE and Lund CJ). <http://altweb.jhsph.edu/topics/mabs/ardf/saxby.htm> (accessed 3/2/09)
- [0232] Scholz O, Thiel A, Hillen W and Niederweis M (2000) Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. p6. *European journal of biochemistry / FEBS* 267: 1565-1570.
- [0233] Scott SE and Wilkinson MJ (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nature biotechnology* 17: 390-392.
- [0234] Sheppard AE, Ayliffe MA, Blatch L, Day A, Delaney SK, Khairul-Fahmy N, Li Y, Madesis P, Pryor AJ and Timmis JN (2008) Transfer of plastid DNA to the nucleus is elevated during male gametogenesis in tobacco. *Plant physiology* 148: 328-336.
- [0235] Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM and Nehra NS (1999) Technical Advance: Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209-216.
- [0236] Silhavy D and Maliga P (1998) Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture. *Current genetics* 34: 67-70.
- [0237] Svab Z, Hajdukiewicz P and Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 8526-8530.
- [0238] Svab Z and Maliga P (2007) Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7003-7008.
- [0239] Terrier B, Courtois D, Henault N, Cuvier A, Bastin M, Aknin A, Dubreuil J and Petiard V (2007) Two new disposable bioreactors for plant cell culture: The wave and undertow bioreactor and the slug bubble bioreactor. *Biotechnology and bioengineering* 96: 914-923.
- [0240] Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G and Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic acids research* 31: 1174-1179.
- [0241] Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in biotechnology* 21: 570-578.

- [0242] Verma D and Daniell H (2007) Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiology* 145: 1129-1143.
- [0243] Wang T, Li Y, Shi Y, Reboud X, Darmency H and Gressel J (2004) Low frequency transmission of a plastid-encoded trait in *Setaria italica*. *Theoretical and applied genetics* 108: 315-320.
- [0244] Wilke D and Katzek J (2003) Primary production of biopharmaceuticals in plants - An economically attractive choice? In: European Biopharmaceutical Review(Autumn). www.biomitteldeutschland.de/files/pdf/Biopharmaceuticalsinplants.pdf (accessed 3/2/09)
- [0245] Zhang Q, Liu Y and Sodmergen (2003) Examination of the Cytoplasmic DNA in Male Reproductive Cells to Determine the Potential for Cytoplasmic Inheritance in 295 Angiosperm Species, in *Plant Cell Physiology* 44: 941-951.

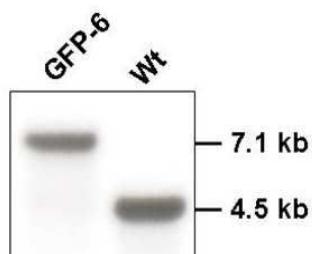
도면

도면1

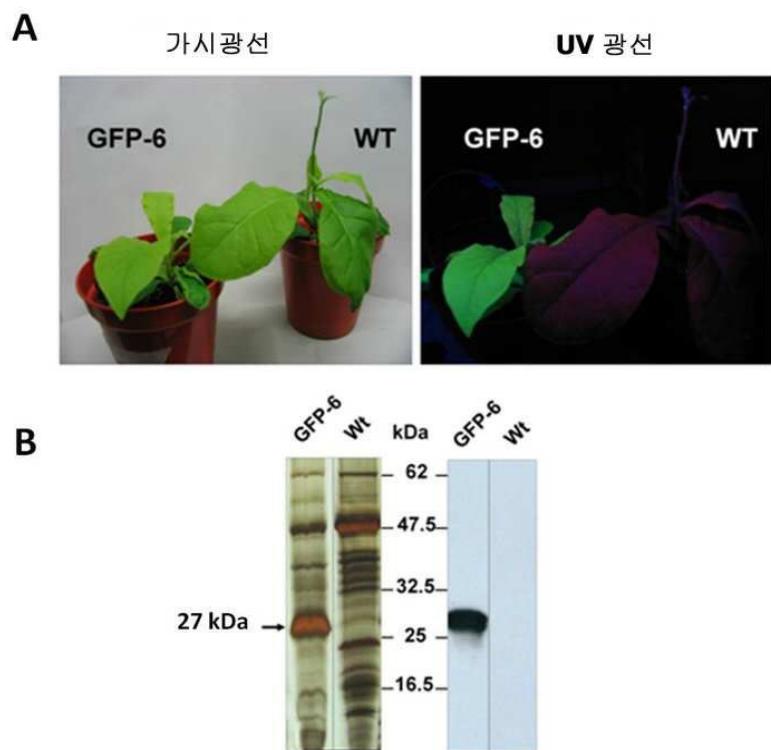
A



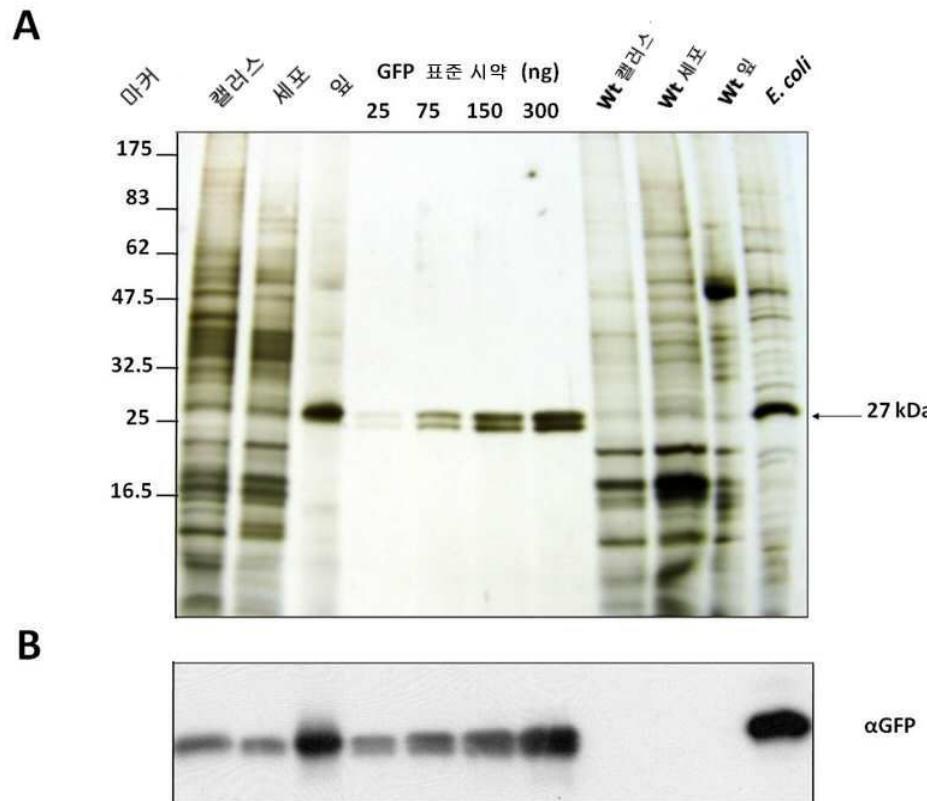
B



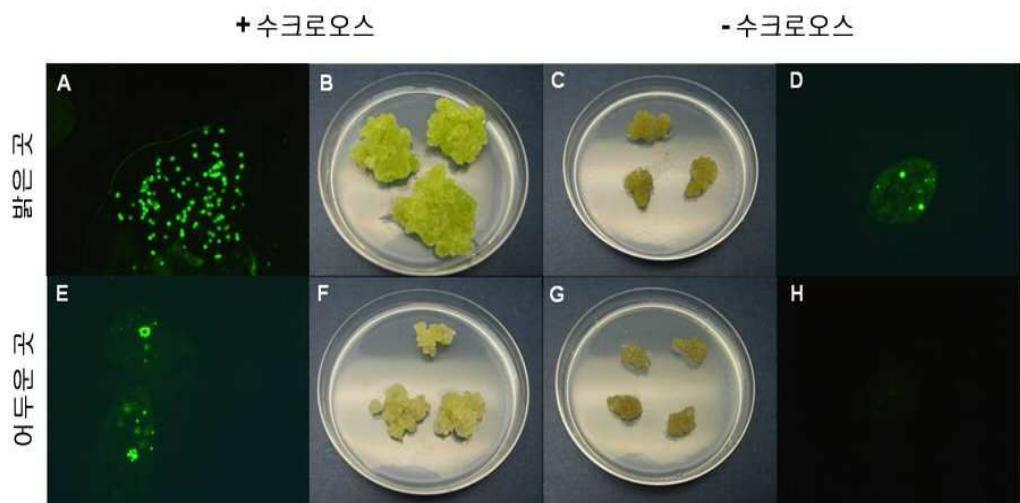
도면2



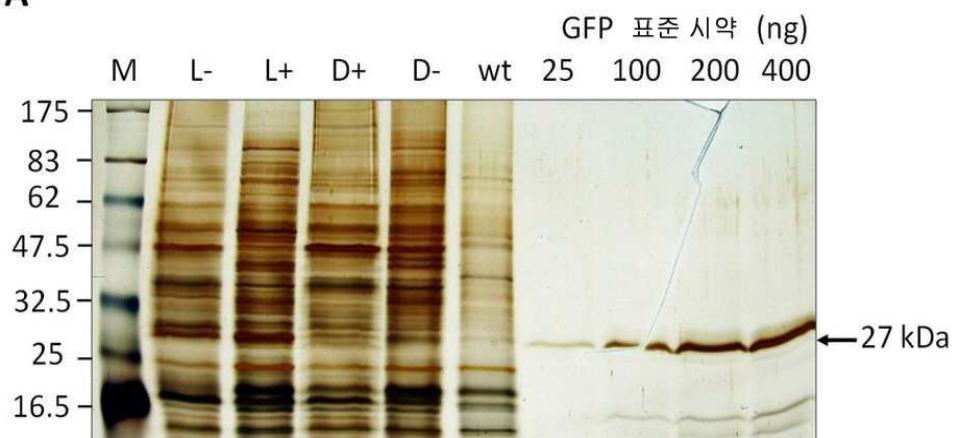
도면3



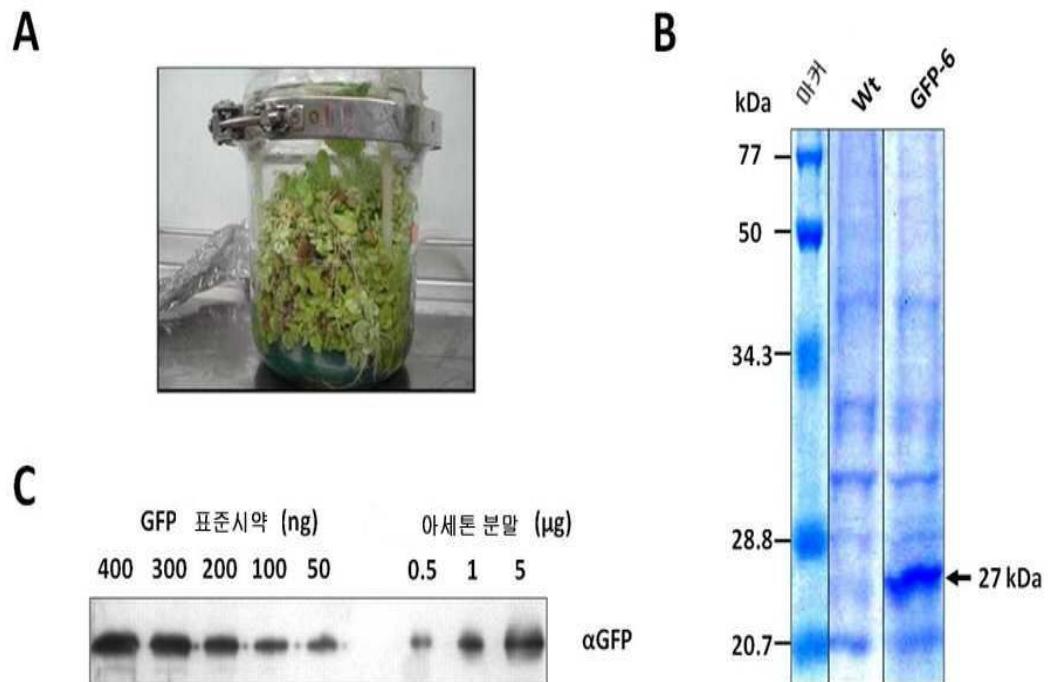
도면4



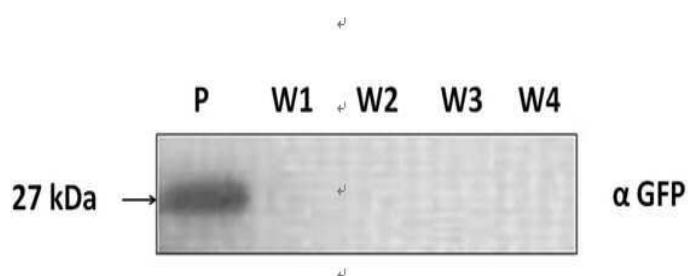
도면5

A**B**

도면6



도면7



도면8

