녹색식물로부터 산업용 효소의 생

김 남 수
식품소재연구팀

형질전환식물체기술 (transgenic plant technology)은 산업용 단백질 생산에 있어 경쟁력이 높으며, 그 주요 특징으로 최종 목적물의 저렴한 가격, 종자형태로의 안정적인 단백질 보존, scale-up의 손쉬움 등을 들 수 있다. 이 기술에는 유전자조작 (gene manipulation)에서 육종 (breeding)에 이르는 제단계가 포함되고 기존 화학공정의 대체에 의한 환경오염 방지 등의 혜택도 기대된다. 본 란에서는 분자량, 생체활성과 세포 내 위치가 상이한 β-glucuronidase (GUS), avidin, laccase, trypsin을 예로 들어 형질전환식물체기술의 다양함을 설명하고자 한다.

1. 서 론

산업용 단백질에는 진단 및 정제목적으로 사용되는 것과 산업용 공정에 사용되는 효소 등이 포함된다. 이 중 효소는 원래 대부분의 경우 동식물로부터 얻어왔으나 미생물 발효공정이 발달하게 됨에 따라 대부분의 산업용 효소생산은 미생물 발효에 의하여 이루어지게 되었다. 그러나, 이와 같은 자연적 원천으로부터의 효소생산은 지리학적 요인, 생산비 등의 인자에 의하여 가끔 제한되어 왔으므로 박테리아, 균류 (fungi), 배양동물세포, 형질전환동물체 및 식물체를 이용한 외래단백질 생산시스템 (foreign protein production system)이 발달하게 되었다. 박테리아와 균류 시스템은 비교적 간단하나 발효장비 등에 대한 초기설비투자가 필요하며 이 중 박테리아에서는 당이 결합되지 않은 효소가 분비되고 균류를 통해서는 비교적 정제하기 쉬운 당단백질 (glycoproteins)을 얻을 수 있다. 하지만 단백질 폴딩의 부정확함, 과다한 당 결합이 발생하는 경우가 가끔 있으므로 이를 보완하는 생산 시스템의 정립이 필요하게 되었다.

현재 형질전환단백질(xenogenic proteins)을 동물세포배양 및 형질전환동물체 (transgenic animals)를 통하여 생산하기 위하여 학문적 혹은 산업적 측면에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 이 방법의 주된 장점은 당쇄결합부위에 있는 당이 동물의 천연단백질의 그것과 거의 같다는 것이나 시스템 구축에 비용이 많이 들고 형질전환율이 낮다는 문제점이 있어 고부가가치의 의약용 단백질 생산에 적합한 방법이다.

2. 식물생산 시스템의 장점

식물 시스템에 의한 형질전환단백질 생산기술의 발전에 따라 미생물 발효법에 의해서는 잘 발현되지 않는 다양한 구조 및 분자량을 지니는 trypsin, laccase isozyme 등을 생산할 수 있게 되었으며 경제성 제고, 단백질의 안정성 향상 등의 효과도 기대할 수 있게 되었다. 형질전환식물체기술에 의한 형질전환단백질 생산의 특성 및 주요 장점으로는 다음과 같은 것이 있다.

첫째, 산업용 효소생산에 있어서 중요한 요소의 하나인 생산비를 크게 절감할 수 있다는 점이다. 형

질전환식물체 종자의 발현율 조절에 의하여 목적효소가 고농도로 존재하도록 조작할 수 있고 그 결과 종자추출물 중의 단백질함량이 발효배지에서보다 대개의 경우 고농도로 존재하여 정제과정이 필요한 효소의 경우 생산비 절감을 이룰 수 있게 된다. 현재 형질전환식물체에서 목적효소의 발현율은 1%에 이르고 있으며 연구개발의 초창기에 있으므로 향후 발현율 제고가 기대된다.

둘째, 식물체 종자를 통한 형질전환단백질 생산 시스템의 다른 장점으로 산업공정에 직접 첨가할 수 있어 보관 및 처리와 효소회수와 관련된 공정을 생략하거나 최소화할 수 있다는 점을 들 수 있다. 형질전환식물체의 산물인 종자를 식품산업공정을 포함하는 생산공정에 직접 첨가하는 것은 아직 이루어지고 있지 않으나 미국의 경우 그 가능성이 높다. 식품이나 식품공정에 형질전환단백질을 다량 포함하는 옥수수 종자 등을 직접 첨가할 수 있게 되면 식품첨가물로서나 GRAS (generally recognized as safe)로서의 지위를 확보할 수 있고 그 결과 종자 중의 단백질을 유전물질과 분리하는 등의 처리를 행하지 않아도 되게 된다. 이 점에 있어서의 선례로서 유전적으로 변형된 효모를 빵, 맥주, 포도주 및 치즈 등의 제조에 직접 사용하는 것이 허가되어 있는 상태이므로 형질전환식물체 산물의 직접사용 가능성은 높을 것으로 여겨진다. 식품산업 이외의 경우에도 형질전환 옥수수가루를 직접 사용할 수 있게 되면 생산비 측면에서 뿐만 아니라 amylase와 에탄올 생산을 동일한 원료에서 행할 수 있는 예에서 볼 수 있는 것처럼 생산공정의 시너지효과도 기대된다.

셋째, 형질전환단백질이 식물체의 종자에 안정되게 보관되며 단백질 발현율을 높일 수 있는 장점이 기대된다. 옥수수, 대두, 캐놀러 (canola), 앨팰퍼 (alfalfa) 등의 몇몇 식물체의 경우 프로모터 (promotors), targeting sequence 및 다른 분자성분을 지니므로 이점에 있어 특히 유리하다.

넷째, 상기 작물의 재배면적을 넓히면 형질전환단백질을 발현하는 종자의 대량생산이 가능하고 그 결과 목적단백질의 생산잠재력을 제고할 수 있다.

다섯째, 식물체유래 물질에는 인간병원균이 없어 안전하다는 점을 들 수 있다.

3. 형질전환단백질의 식물생산공정

식물체에서의 단백질 생산은 몇 단계 과정을 거치게 된다. 먼저 유전자 자체를 식물체의 전사 및 단백질합성기구가 인식할 수 있도록 하며 이에 필요한 신호로서 프로모터, target sequence, terminator를 벡터 (vectors)에 도입한다(그림 1). 식물생산공정이 발효공정과 비교하여 경쟁력을 가지려면 외래유전자 발현율을 높여야 하며 손익분기점으로 조직중량대비 0.01 0.1% 이상이 필요한 것으로 보고되고 있다. 이를 위하여 조직특이성을 지니는 새로운 고효율 프로모터의 개발과 다양한 세포내 구획을 이용하는 단백질축적 연구가 이루어지고 있으며 이를 통하여 외래유전자의 발현율을 크게 높일 수 있을 것으로 기대되어 진다.

발현벡터는 *Agrobacterium*에 전기천공 (electroporation)에 의하여 도입되며 벡터가 도입된 *Agrobacterium*을 사용하여 미성숙 옥수수배에 목적유전자를 도입한다. 옥수수 배는 배양실에서 배양하여 형질전환이 이루어졌는지를 확인한 후 식물체로 재생시킨다. 온실에서 T$_0$ 식물체의 종자를 수확하고

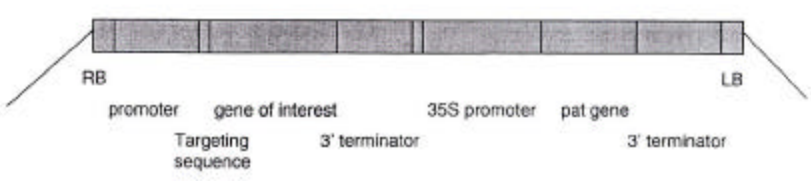

그림 1. *Agrobacterium tumefaciens* 시스템에 의한 외래유전자의 식물내 형질전환용 벡터. 식물체로의 유전자 전이는 RB에서 시작하여 LB에서 끝나는 방향성을 지니며 표지유전자 (marker gene)인 항생제내성 "pat" gene은 도입유전자의 밑부분에 위치함.

표 1. 형질전환 옥수수로부터 생산된 산업용 단백질

Generation	Yield of target protein	
	@200×	@1000×
0	1 g	1 g
1	2000 g	1 kg
2	40 kg	1000 kg
3	8000 kg	10^6 kg

ELISAs법 혹은 효소분석법에 의하여 발현된 각 단백질을 분석하며, 단백질의 상태와 발현농도의 확인을 위한 Western blot 분석, 단백질의 정제 및 특성평가와 분자차원에서 도입유전자 (gene insert)의 상태분석도 행하여진다.

미국의 ProdiGene사의 경우 HiII maize line을 사용하고, 역교배 (back-crosses)를 수 세대에 걸쳐 반복하여 안정된 상태의 고발현율 잡종 (hybrids)을 생산한다. 이 과정의 각 단계에서 단백질 정제와 공정조작을 위하여 곡물생산을 행하며 이 때 USDA 지침을 철저하게 준수한다고 한다. 생산된 곡물을 가공처리하여 알곡식 (whole grain)과 분획분말 (fractionated flour)로 만들고 이들은 산업공정에 직접 사용되거나 추출 및 조립화과정을 거쳐 최종산물로 만들어질 수 있으며 이 과정에서 부산물 활용에 의하여 가격경쟁력을 향상시킬 수 있다.

4. 형질전환식물체로부터 생산된 산업용 단백질

ProdiGene사에서 형질전환 옥수수로부터 생산한 산업용 단백질로는 GUS, avidin, trypsin, laccase가 있고 이 중 GUS와 avidin은 *E. coli* 벡터에 의한 biolistic 형질전환의 예이고 trypsin과 laccase는 *Agrobacterium*에 의한 형질전환의 예이다. 이들에 대한 유전자는 게놈에 아주 낮은 빈도로 존재하였고 T1 종자에서의 최대발현율은 GUS와 trypsin의 경우 각각 20 및 300 ng/mg 종자중량이었으며 그 정도는 프로모터와 targeting se- quence의 종류와는 상관적이지 않았다. 육종 및 선택 과정을 통하여 발현율은 T1 종자보다 낮거나 최대 20배로 증대되었다. 형질전환단백질의 발현율은 역교배 세대수와 상관적이어서 역교배 횟수가 늘어나면 발현율도 증가하였다(표 1).

형질전환 옥수수에서 생산된 재조합단백질은 자연상태의 단백질과 기능적 측면에서 동등하였으며 이 사실은 산업적으로 단백질활성이 중요한 경우 매우 필수적인 요소가 될 수 있다(표 2, 표 3, 그림 2B). Avidin, laccase, trypsin의 경우 분자량에 있어서 약간의 차이가 나타났는데, avidin과 laccase의 경우 당결합의 차이에 따른 것으로 밝혀졌으며 trypsin의 경우는 그 원인이 아직 밝혀지지 않았다.

Laccase는 목재품이나 직물제조에 사용되는 구리함유 산화효소인데 ProdiGene사에서는 형질전환 옥수수로부터 상용화수준의 laccase I isozyme을 발현하였다. 이 때, 63, 59 kDa의 주 band와 몇몇 부 band가 나타났고(그림 2A), 부분정제하여 물리적 특성을 살펴본 결과 곰팡이유래의 laccase와 동일하였다(표 3). 옥수수에서 발현된 형질전환 laccase는 목재품 산업에서 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

단백질분해효소는 효소전구체(zymogens)의 형태

표 2. 옥수수로부터 얻어진 재조합 GUS와 avidin의 물리적 특성

Gene	Transformation method	Copy #	Promoter	Target	T_1 high seed	T_n ear bulk
Avidin[a] (17 kDa)	Biolistics	2	Constitutive	CW	100 ng/mg	2 μg/mg(T8)
GUS[b] (68 kDa)	Biolistics	1	Constitutive	Cyto	20 ng/mg	200 μg/mg(T5)
Trypsin (24 kDa)	*Agrobacterium*	?	Seed preferred	CW	300 ng/mg	50 ng/mg(T2)
Laccase (63 kDa)	*Agrobacterium*	?	Seed preferred	CW	35 ng/mg	65 ng/mg(T4)

[a]Reference 17, [b]Reference 18.

표 3. 자연상태 및 재조합 laccase의 물리적 특성 비교

Biochemical properties	Native E. *coli* GUS	Maize-derived GUS	Egg white avidin	Maize-derived avidin
Molecular weight	68,000 Da	68,000 Da	17,700	16,800
Km	0.21±0.04 nM	0.19±0.05 nM	N.A.	N.A.
Binding stoichiometry	N.A.	N.A.	Binds one biotin per subunit	Binds one biotin per subunit
Vmax	$3.2\times10^{5}\pm3.3\times10^{4}$ nmoles/hr	$1.5\times10^{5}\pm3.8\times10^{4}$ nmoles/hr	N.A.	N.A.
Isoelectric point	4.8-5.0	4.8-5.0	10	10
Ki	N.T.	N.T.	3.16 μM	3.34 μM
Heat stable	Yes	Yes	?	?
Antigenic similarity	Identical	Identical	Identical	Identical
Glycosylated	No	No	Yes	Yes
N-terminal sequence	Native	Identical except for initial methionine	Native	Identical

N.A. = not applicable.
N.T. = not tested.

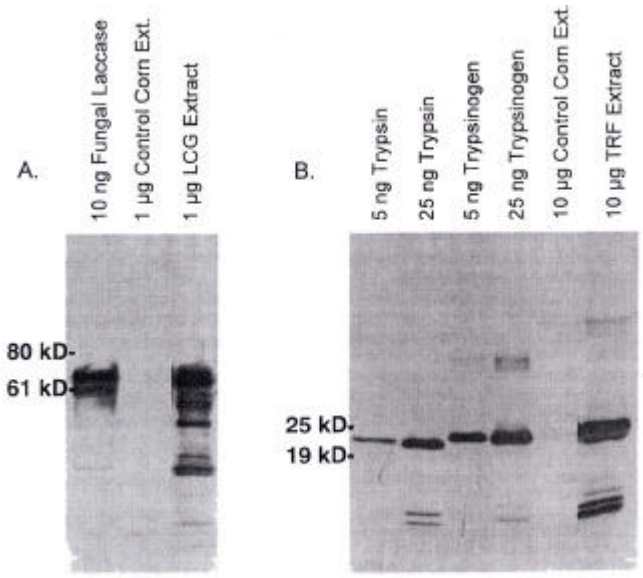

그림 2. Laccase (A)와 bovine trypsin (B)를 함유하고 있는 옥수수 종자추출물의 Western blot. 분자량 측정 marker와, 종자추출물 및 단백질 표준품의 대조군은 표시된 바와 같고 곰팡이 laccase는 *Trametes versicolor*의 laccase I gene을 포함하는 재조합 *Aspergillus* strain으로부터 정제하였다. 단백질 겔을 PVDF 막에 electroblotting한 후 PBST에 용해된 분유로 blocking하고 1차 다클론항체 및 HRP로 표지된 2차항체의 희석액으로 반응시키고 화학발광기질로 검출하였다. LCG: 종자선택성 프로모터가 발현을 행하는 laccase 발현 옥수수 line; TRF: 종자선택성 프로모터가 발현을 행하는 bovine trypsinogen 발현 옥수수 line.

로 형질전환 옥수수에서 생산되는데 ProdiGene사는 이 방법에 의하여 T1 종자와 T2 세대에서 trypsin을 고효율로 발현하는 옥수수의 형질전환 세포주를 개발하였다. 종자추출물의 Western blot시 23개의 band가 나타나지만 N-말단 분석에 의하여 이들 band가 활성 trypsin인 것으로 나타나 추출과정에서 trypsinogen의 자기활성화가 이루어지는 것으로 보인다.

5. 결 론

현재 건물량 기준으로 0.02 0.2%의 발현율을 나타내는 형질전환식물체에서의 단백질생산은 공급을 값싸고 빨리 늘릴 수 있다는 점에서 효소 등의 산업용 단백질 생산에서 발효생산법을 대체할 수 있는 새로운 모범사례를 보여주고 있다. 형질전환식물체기술은 최근에 집중적으로 연구되고 있으며 주요 목적은 식용의 곡물을 생산하는데 있으나, laccase를 목재품 생산에서 접착제로 사용하거나 종이의 표백과정에 사용하면 포름알데히드 (formaldehyde)나 chlorite를 대신할 수 있는 예에서 알 수 있는 것처럼 형질전환단백질을 식품이외의 산업공정에 적용하면 식품에서와 같은 직접첨가에 따른 논란을 피할 수 있고 환경오염산업을 대체하는 효과도 거둘 수 있을 것이다. 인체용 의약이나 백신을 포함하여 형질전환단백질을 활용하는 제품이 점차 시판됨에 따라 일반인들은 점차 그와 같은 기술의 혜택을 느낄 수 있을 것으로 여겨진다.

6. 참고문헌

1. Hood E, Howard J. Protein products from transgenic plants. Agro-Food-Industry Hi-Tech 3, 10:35-6 (1990)
2. Hood EE, Jilka JM. Plant-based production of xenogenic proteins. Current Opinion in Biotechnology, 10:382-6 (1999)
3. Jilka JJ, Hood EE, Dose R, Howard J. The benefits of proteins produced in transgenic plants. AgBiotechNet, 1(9):1-4 (1999)
4. Archer DB. Enzyme production by recombinant *Aspergillus*. Recombinant microbes for industrial and agricultural applications. New York: Marcel Dekker, 373-93 (1994)
5. Georgiou G, Bowden GA. Inclusion body formation and the recovery of aggregated recombinant proteins. Recombinant DNA technology and applications. New York : McGraw-Hill, 333-356 (1991)
6. Harashima S. Heterologous protein production by yeast host-vector systems. Biop-roc Technol, 19:135-58 (1994)
7. Marino MM. Expression of heterologous proteins in yeast. Recombinant DNA technology and applications. New York: McGraw-Hill, 29-65 (1991)
8. Hood EE, Kusnadi A, Nikolov Z, Howard JA. Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. Chemical via Higher Plant Bioengineering, 127-47 (1999)
9. Van Rooijen GJH, Moloney M. Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. Biotechnology, 13:72-7 (1995)
10. Fischer R, Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. Transgenic Research 9(4-5):279-99 (2000)
11. Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G, Nester EW. Genetic analysis of Agrobacterium. Methds in Enzymology, 204: 384-97 (1991)
12. Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology, 14:745-50 (1996)
13. Armstrong CL, Green CE, Phillips RL.

Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. Maize Genet Coop Newsletter, 65:92-3 (1991)
14. Kusnadi A, Nikolov Z, Howard J. Production of recombinant proteins in transgenic plants:practical considerations. Biotech Bioeng, 56:473-84 (1997)
15. Ong E, Brent W, Pollock R, Smith M. Cloning and sequence analysis of two laccases complementary DNAs from the lignolytic basidiomycele *Trametes versicolor*. Gene, 196:113-9 (1997)
16. Kunitz M, Northrop JH. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and inhibitor-trypsin compound. J Gen Physiol, 19:991-1007 (1936)
17. Hood EE. Witcher DR. Maddock S, Meyer T, Baszczynski C, Bailey M, Flynn P, Register J, Marshall L, Bond D, Kulisli E, Kusnadi A, Evangelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehigh RJ, He- rnan R, Kappel WK, Ritland D, Li CP, Howard JA, Commercial production of avidin from transgenic maize: charac- terization of transformant production, processing extraction and purification Molecular Breeding, 3:291-306 (1997)
18. Witcher DR, Hood EE, Peterson D, Baiey M, Bond D, Kusnadi A, Evangelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehigh R, Kappel W, Register JC, Howard JA, Commercial production of β-glucuronidase (GUS):A model system for the production of proteins in plants. Molecular Breeding, 4:301-12 (1998)

<출처 : *Enzyme and Microbial Technology* 30, 279-283 (2002)>