

세균성 질병 예방을 위한 식물 경구 백신 연구 동향

한범수*, 정영재, 노경희, 박종석, 조강진, 김용환, 김종범*
농업생명공학연구원 신기능소재개발팀

Recent Studies on the Edible Plant Vaccine for Prophylactic Medicine against Microorganism-Mediated Diseases

Bum-Soo Hahn*, Young-Jae Jeong, Kyung Hee Roh, Jong-Sug Park, Kang-Jin Cho,
Yong-Hwan Kim, Jong-Bum Kim*

Plant Metabolic Engineering Team, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Plants have considerable advantages for the production of antigenic proteins because they provide an inexpensive source of protein and an easy administration of vaccine. Since a publication describing edible plant vaccine of HBsAg in 1992, a number of laboratories around the world have studied the use of plants as the bioreactor to produce antigenic proteins of human or animal pathogens. Over the last ten years, these works have been mainly focused on three major strategies for the production of antigenic proteins in plants: stable genetic transformation of either the nuclear or plastid genome, or transient expression in plants using viral vectors. As many antigenic proteins have been expressed in tobacco, also several laboratories have succeeded to express genes encoding antigenic proteins in other crop plants: potato, tomato, maize, carrot, soybean and spinach. At present many works for the production of edible plant vaccine against bacteria-mediated diseases have mostly performed the studies of enterotoxins and adhesion proteins. Also the development of new-type antigens (pili, flagella, surface protein, other enterotoxin and exotoxin etc.) is required for various targets and more efficacy to immunize against microorganism pathogens. Many works mostly studied in experimental animals had good results, and phase I clinical trial of LTB clearly indicated its immunogenic ability. On the other hand, edible plant vaccines have still problems remained to be solved. In addition to the accumulation of sufficient antigen in plants, human health, environment and agriculture regulation should be proven. Also oral tolerance, the physiological response to food antigens and commensal flora is the induction of a state of specific immunological unresponsiveness, needs to be addressed before plant-derived vaccine becomes a therapeutic option.

Key words: Edible plant vaccine, genetically modified crop, microorganism-mediated diseases, mucosal immune system

서 론

유전자 변형된 작물 (genetically modified crop; GMO) 을 이용한 경구 백신 (edible vaccine) 생산은 감염성 질병 예방에 있어 집종의 편리성과 점막 면역을 유도함으로 특이 항체 생성의 고효율성, 백신 생산적인 면에서 경제성이 높다는 측면에서 현재 전세계적으로 연구가 활발히 진행 중

에 있다 (Arakawa et al. 1997; Chikwamba et al. 2002; Cox et al. 2002; Tregoning et al. 2003; Jani et al. 2004; Tacket et al. 2004). 이러한 식물 경구백신 연구는 10여년 전 이 분야의 선두자인 식물 생물학자 Arntzen 박사의 개발도상국에서 질병 예방을 위해 쉽게 사용할 수 있는 경제성과 편리성을 갖는 경구백신의 개발이라는 생각에 기초한 바나나를 이용한 식물 경구 백신 개발 (May et al. 2004)과 Mason 등 (1992)이 간염 바이러스의 표면 항원 (HBsAg)을 담배에서 발현 함으로써 식물 경구 백신의 가능성을 보다 현실화하였다 (Mason et al. 1992).

*Corresponding author Tel 031-299-1740 Fax 031-299-1732
E-mail: bshahn@rda.go.kr

점막 면역계 (mucosal immune system)가 분포하는 조직 중 점막 면역계의 70-80%를 차지하는 gastrointestinal track 이 경구 백신의 주 표적 조직으로써 연구가 가장 많이 되어져 있으며 (Brandtzaeg 1996) 동물과 인체에 감염하여 질병을 유발하는 세균의 감염 경로 및 발병 기전은 입이나 코점막, 소화기 점막을 통해 군체 생성 후 독소 분비를 통해 질병을 일으키고 있다는 점에서 점막 면역반응 유도는 분비형 IgA (sIgA)와 세포 면역 반응에 의한 병원체의 생체 내 감염을 조기에 차단 및 면역 반응의 극대화를 가져올 수 있다는 점에서 더욱 효과적인 질병 예방책이다.

현재 세균에 의한 질병 예방을 위한 백신 연구의 항원으로 사용되는 단백질로는 세균의 점막 감염에 필수적인 부착기능을 수행하는 부착성 단백질 (adhesion protein)과 세균의 독소 단백질을 표적 항원 등이 연구 개발 중에 있다 (Figure 1). 식물에서 항원 단백질을 발현시킨 선행 연구 결과에 의하면 재조합 단백질은 본래의 기능을 수행하는 구조를 가지고 있었으며 동물모델과 전임상 단계의 성공적인 연구 결과는 경구 백신의 실용화에 대한 기대를 한층 고무시키고 있다 (Lauterslager et al. 2001; Chikwamba et al. 2002; Cox et al. 2002; Walmsley et al. 2003; Tacket et al. 2004). 본 논문에서는 세균성 질병 예방을 위한 식물 경구 백신의 개발 현황을 재고하고 앞으로 개선점과 전망에 대해서 논하고자 한다.

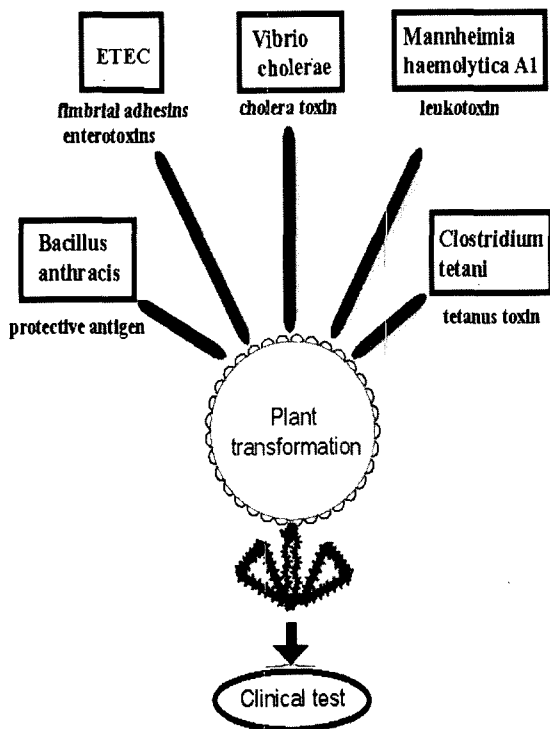


Figure 1. Microorganisms and their antigenic proteins used for the development of edible plant vaccines. ETEC: enterotoxigenetic *Escherichia coli*.

본 론

1. 미생물 유발 질병 예방 경구백신으로 사용된 항원 단백질

동물과 인체에 질병을 유발하는 세균의 감염 경로는 소화기, 피부, 호흡기를 통해서 이루어지며 이들 세균들의 발병기전은 표적 기관에 부착 후 독소를 생성함으로써 숙주에 치명적 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Schmitt et al. 1999). 현재 소화기 및 호흡기에 감염하는 enterotoxigenetic *Escherichia coli* (ETEC), *Vibrio cholerae*, *Mannheimia haemolytica* A1, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani* 등 이들 질병 유발 세균의 감염을 예방하고자 연구되는 항원은 숙주 세포 기관 부착에 필요한 부착성 단백질들 (Cox et al. 2002; Lee et al. 2002)과 숙주에 독성을 나타내는 독소 (Arakawa et al. 1997; Arakawa et al. 1998; Mason et al. 1998; Chikwamba et al. 2002; Tacket et al. 2004; Tregoning et al. 2004)가 주로 경구 백신의 생산을 위한 항원으로 실용화를 위한 연구가 진행중이다. 무엇보다도 독소 물질에 대한 경구 백신 연구는 숙주 세포의 수용체와 자세한 반응 기작이 밝혀져 있고 고전적인 면역 보강제 (classical adjuvant)로 역할을 이용한 융합 단백질 (fusion protein) 형태로 다른 항원 단백질과 함께 식물체에 발현 시 증가된 면역반응을 유도할 수 있다는 측면에서 비교적 많은 연구가 진행되고 있다 (Yu et al. 2001; Kim et al. 2003; Walmsley et al. 2003).

2. 발현 벡터 (expression vector)의 특성 및 식물 경구 백신으로 연구된 형질 전환체

미생물 유래 항원 단백질 및 펩타이드를 식물체 내에서 발현하기 위해 사용된 발현벡터의 프로모터 (promoter)는 주로 CaMV 35S가 많이 사용되어졌으며 (Haq et al. 1995; Hein et al. 1996; Lee et al. 2001; Aziz et al. 2002; Jani et al. 2002; Lee et al. 2002), 또한 전사 (transcription)와 번역 (translation) 단계에서 강한 발현 유도를 위해 바이러스 유래의 enhancer 및 TEV가 사용되었다 (Hein et al. 1996; Mason et al. 1998; Wang et al. 2001; Chikwamba et al. 2003). 다른 한편으로 발현 단백질의 세포 내 소기관 (소포체, 액포, 엽록체)에 집적을 통한 발현량을 증대시키기 위한 연구가 진행되었다 (Daniell et al. 2001; Yu et al. 2001; Kim et al. 2003; Kang et al. 2003; Streatfield et al. 2003; Tregoning et al. 2003). 터미네이터 (terminator)는 nos, CaMV 35S, vsp가 사용되어졌고 엽록체 내에 발현을 위하여 엽록체에서 유래된 psbA 및 rbcL의 3'UTR 등이 사용되었다 (Tacket et al. 1998; Lauterslager et al. 2001; Tregoning et al. 2003; Walmsley et al. 2003; Kang et al. 2004; Piller et al. 2004). 또한 사용된 식물체의 이용 목적에 맞게 감자 괴경 (patatin promoter)과 같은 특정 부위에

서 발현을 유도하는 조직 특이적 프로모터를 이용한 방법 (Lauterslager et al. 2001)이 시도되어졌다 (Table 1). 형질 전환체의 선발을 위해 주로 사용되고 있는 항생제는 kanamycin

이 주를 이루고 형질 전환체의 후대분석의 편리함을 위해서 phosphinothricin (PPT)가 사용되고 있으며 엽록체 형질전환체의 선발을 위한 spectinomycin 또는 streptomycin이 주로

Table 1. Properties of edible vaccines produced in transgenic plants

Source of disease	Antigen	Promoter, cis-acting element /terminator	Resistance marker	Expression level	Transgenic plant	Animal or clinical test	Reference
ETEC	K88ac	CaMV 35S	kan	0.1-4 $\mu\text{g/g}$ of carrot	carrot	mouse, piglet	Lee et al. 2002
	K99	CaMV 35S, TEV/ CaMV 35S	ppt	0.5%/TSP	soybean	mouse	Piller et al. 2004
	LTB	CaMV 35S, TEV, KDEL	kan	5 or 14 $\mu\text{g/g}$ of TSP (tobacco leaf); 30 or 110 $\mu\text{g/g}$ of TSP (potato microtuber)	tobacco; potato	mouse	Haq et al. 1995
	LTB	CaMV 35S, TEV/vspB	kan	17.2 $\mu\text{g/g}$ of tuber	potato	mouse, human	Mason et al. 1998; Tacket et al. 1998
	sLTB	class I patatin /nos	kan	17 $\mu\text{g/g}$ of tuber	potato	mouse	Lauterslager et al. 2001
	sLTB	γ -Zein, TEV/vsp	ppt	0.01-0.07%/TSP	maize callus	mouse	Chikwamba et al. 2002
	sLTB	γ -Zein, TEV, native Itb sp, maize r-zein sp/vsp	n.u.	0.0002%/dry weight (endosperm); 0.00013%/dry weight (strach)	maize	n.d.	Chikwamba et al. 2003
	sLTB-ZP3 epitope	CaMV 35S, TEV, L linker/vsp	kan	0-10 $\mu\text{g/g}$ of fresh weight (tomato leaf); 0-64.7 $\mu\text{g/g}$ of dry weight (fruit)	tomato	mouse	Walmsley et al. 2003; Walmsley et al. 2003
	LTB-ESAT-6	CaMV 35S, TEV, L linker/vsp	kan	22-49 $\mu\text{g/g}$ of fresh weight	Arabidopsis	n.d.	Rigano et al. 2004
	LTK63	Prrn/psbA3'	spc	3.7%/TSP	tobacco*	n.d.	Kang et al. 2004
	LTB	Prrn/psbA3'	spc	2.5%/TSP	tobacco	n.d.	Kang et al. 2003
	sLTB	CaMV 35S, SEKDEL/nos	kan	2.2%/TSP	tobacco	n.d.	Kang et al. 2004
	sLTB	maize constitutive, α -amylase signal sequence, SEKDEL, plastid targeting sequence [†] , vacuole targeting [•] sequece, nuclear targeting sequence [♦] /potato protease inhibitor II	ppt	8%/TSP (cell surface); 12%/TSP (vacuole)	maize	human; mouse	Streatfield et al. 2001; Lamphear et al. 2002; Streatfield et al. 2003; Tacket et al. 2004
Vibrio cholerae	CTA and B	35S enhancer, CaMV 35S, TEV / CaMV 35S	kan	n.d.	tobacco	n.d.	Hein et al. 1996
	CTB	mannopine synthase P2, TEV/ g4pA	kan	0.3%/TSP (1.5 ng/0.5 μg of TSP)	potato	mouse	Arakawa et al. 1997; Arakawa et al. 1998
	CTB	doubled enhancer, CaMV 35S, Ω sequence/ nos (pBI-CTB); doubled enhancer, CaMV 35S, Ω sequence, PR1b signal sequence/ nos(pBI-SPCTB)	kan	0.004%/TSP (pBI-CTB); 0.095%/TSP (pBI-PCTB)	tobacco	mouse	Wang et al. 2001
	CTB	Prrm/ psbA3'	spc	3.5-4.1% /TSP (40 $\mu\text{g/g}$ of TSP)	tobacco*	n.d.	Daniell et al. 2001

	CTB	CaMV 35S, TEV/nos	kan	0.02%/TSP (leaf); 0.04%/TSP (fruit)	tomato	n.d.	Jani et al. 2002
	CTB	CaMV 35S, ERRSS/nos	kan	0.02%/TSP (leaf)	tobacco	mouse	Jani et al. 2004
Vibrio cholerae	CTB- NSP4 CTB-CFA/I	mas 1, KDEL/Ocs, mas 2, GPGP, KDEL/g7pA	kan	3.3 μ g/g of tuber	potato	mouse	Yu et al. 2001
	CTB-NSP4	mas 2, GPGP, KDEL/g7p	kan	0.006-0.026% (tuber); 12.5-25 μ g/3 g (tuber)	potato	n.d.	Kim et al. 2003
	PA	CaMV 35S/Ocs	kan	n.d	tobacco	n.d.	Azhar et al. 2002
Bacillus anthracis	PA	CaMV 35S/Ocs; Prn/ psbA3'	kan; spc	n.d 8%/TSP	tomato; tobacco*	mouse	Aziz et al. 2005
	PA peptide (671-702)-TMV capsid	TMV virus	n.u.	500 μ g/g of spinach	spinach	n.d.	Karasev et al. 2003
	Lkt66-mGFP-KDEL	CaMV 35S/nos	kan	n.d.	white clover	rabbit	Lee et al. 2001
Mannheimia haemolytica A1	Clostridium tetani	TetC-AT, TetC-GC Prn,T7g10 leader sequence/rbcL (pJST10, Nt-pJST11)	spc	25%/TSP (Nt-pJsT10); 10%/TSP (Nt-pJsT11 and 12)	tobacco	mouse	Tregoning et al. 2003

TSP : total soluble protein

Antibiotics : kan:kanamycin, ppt:phosphinothricin, spc:spectinomycin

KDEL : ER retention signal sequence, TEV:tobacco etch virus leader sequence, sp:signal peptide sequence

Vsp : the 3' UTR and polyadenylation signal of a soybean vegetative storage protein gene

Q : TMV RNA 5' untranslated leader sequence

n.d : not determined, n.u.:not used, n.a.:not available

* means the expression of antigenic protein in plastid

means plastid targeting sequence from maize granule-bound glycogen synthase

♣ means vacuole targeting sequence from barley aleurain

◆ means nuclear targeting sequence from simian virus 40 large T antigen.

사용되고 있다 (Table 1).

초기의 연구에는 담배를 모델 시스템으로 사용하였으나 실질적인 상용화를 위해 감자를 비롯한 당근, 옥수수, 토마토, 대두, 시금치, 콜로바 등이 연구되어졌다 (Haq et al. 1995; Lee et al. 2001; Lee et al. 2002; Karasev et al. 2003; Walmsley et al. 2003; Piller et al. 2004; Tacket et al. 2004).

3. 세균 질병에 대한 식물 경구 백신 연구

1) Enterotoxigenetic *Escherichia coli* (ETEC)

돼지설사병을 유발하는 대장균인 ETEC는 그람 음성균에 속하며 질병을 유발하기 위해서는 먼저 장의 수용체와 결합한 후 균체를 이루어야 한다. 이때 대장균의 장내 부착에 중요한 역할을 하는 것이 fimbriae이며 세포 당 약 500개 정도가 존재하는 것으로 알려져 있다. 돼지의 장에서 균체를 이루는 ETEC의 fimbrial adhesin으로는 K88, K99, 987P가 보고되었으며 이중 K88은 대장균의 감염에 널리 알려진 fimbrial adhesin중 하나다 (Jin and Zhao 2000). 현재 K88의 변이체는 3가지 (K88ab, K88ac, K88ad)가 밝혀

져 있으며 이들 단백질들간의 상동성 (identity)은 Kab/Kac (92%), Kab/Kad (89%), Kac/Kad (90%)로 서로간에 매우 유사하다. 또한 이러한 fimbrial adhesin들의 변이체에 대한 각각의 수용체는 분자량이 16-240 kDa에 속하는 당단백질 (glycoprotein)과 당지질 (glycolipid)들로 알려져 있다 (Jin and Zhao 2000).

이러한 fimbrial adhesin을 이용하여 식물 경구 백신의 개발을 위한 연구들은 최근 Cox 등 (2002)이 대장균에서 정제된 fimbrial adhesin을 구강으로 투여한 후 돼지에서 항체가 생성된다는 사실을 알았으며, Lee 등 (2002)은 K88ac 유전자를 이용하여 재조합 항원을 발현하는 형질전환 당근을 먹인 생쥐에서 K88ac 대한 항체 증가를 확인하였고 자돈을 이용한 공격 접종 실험에서 설사가 발병되지 않는다는 결과를 얻었다. Piller 등 (2004)은 합성된 K99을 이용하여 형질전환된 대두를 생쥐에게 복강 투여 후 항체가 증가되는 것을 확인하였으며, 면역 유도된 생쥐의 CD4+ lymphocytes에서 인터페론 감마의 생성을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

급성 설사병을 유발하는 ETEC의 heat-labile enterotoxin (LT)은 ADP-ribosyltransferase 활성을 가지고 있는 subunit

A (27 kDa)와 표피세포 (epithelial cell)의 세포막에 존재하는 G_{M1} -gangliosides에 pentamer로 결합하는 subunit B (11.6 kDa)로 구성되어 있다 (Schmitt et al. 1999). LT의 발병 기전으로는 효소 활성을 나타내는 subunit A가 먼저 GTP binding proteins을 활성화 시키고 세포 내 secondary messenger인 cAMP의 증가를 가져온 결과 이온 수송 이상 현상을 유발하여 장내로 수분과 염화이온의 증가를 가져와 설사를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Schmitt et al. 1999). 현재 LT를 이용한 식물 경구 백신의 연구는 수용체와 결합하는 LTB (heat-labile enterotoxin subunit B)를 이용한 연구가 주로 진행되었으며 또한 돌연 변이를 통한 효소 활성이 없는 LT를 이용한 연구도 진행되었다 (Kang et al. 2004). Haq 등 (1995)은 LTB 항원을 발현하는 담배와 감자를 선발하였다. 담배 잎과 감자 괴경에서 발현된 단백질 양은 소포체 지연 신호 서열 (endoplasmic reticulum retention signal sequence)을 이용한 벡터 구조에서 사용하지 않는 것에 비해 대략 3배정도 증가된 것으로 보고되었다. 또한 이들 연구자들은 재조합 항원을 발현하는 담배잎과 감자 괴경을 위장관 삽입법 및 먹이로 섭취하게 한 생쥐의 동물군에서 mucosal IgA 또는 혈청 IgG의 항체 증가를 확인하였다. Mason 등 (1998)은 LTB (sLTB)를 식물 codon usage에 맞게 합성한 후, 형질 전환체를 선발하였다. 발현된 단백질 양은 앞선 실험에 비하여 약 20배에 달하는 것으로 보고하고 있다. 형질전환 감자를 투여한 군에서 비형질 전환 감자를 투여한 대조군에 비해 fecal IgA와 혈청 IgG가 2배정도 되었다. 또한 공격 접종 실험 (challenge test)에서 형질전환 감자를 먹인 생쥐가 비형질 전환 감자를 먹인 생쥐보다 유의성 있게 Gut/Carcass 비율이 감소되었다. 인체에 대한 항원력 증가 효과를 조사하기 위하여 형질 전환 감자를 직접 투여한 14명의 지원자들에서 단 한번의 형질 전환 감자투여로 비형질 전환 감자를 투여한 대조군에 비해서 IgG anti-LT ASC와 IgA anti-LT ASC의 증가를 관찰하였다. 또한 투여 후 1주일 안에 11명중 9명과 6명에서 증가된 항LT IgG와 IgA의 역가를 측정하였다. 또한 지원자 10명중 5명의 대변에서 대조군에 비하여 sIgA 역가가 4배 증가됨을 측정하였다. 그러나 항원 양의 증가에 따른 항체 양의 증가는 나타나지 않았는데 이러한 결과는 개체 차이에 따른 문제와 지원자 수가 작은 것에 기인 한다고 보고하고 있다 (Tacket et al. 1998). Lauterslager 등 (2001)은 괴경 특이 promoter인 class I patatin를 이용하여 sLTB를 발현하는 감자를 선발하였다. 이러한 결과는 앞선 Mason 등 (1998)의 연구와 유사한 발현양상을 보였다. 생쥐를 이용한 동물실험에서 미리 sLTB로 피하 주사한 군의 혈청과 변에서 IgG1의 증가를 확인하였고, 괴경 추출물로 의해서 booster한 군의 대변에서 IgA 증가가 확인되었다. 저자들은 괴경에 의해 직접적인 점막 면역이 일어나지 않는 요인으로 적은 항원량과 낮은 booster 효과 및 낮은 항원력에 기인하는 것으

로 추측하고 있으며, 이를 극복하는 방안으로 복강 주사로 초기 면역 반응을 유도한 후 구강 투여법으로 점막 면역 반응을 유도하는 방안을 제시하였다. Chikwamba 등 (2002)은 microprojectile bombardment법으로 형질 전환하여 phosphinothricin (PPT)에 저항성을 갖는 옥수수 배형성 캘러스를 선발하였다. 발현된 LTB의 재조합 단백질 분자량은 박테리아에서 발현된 것과 같은 55 kDa로 확인되었다. 즉 재조합 단백질은 대장균에서 발현된 것과 같은 pentamer로 형성됨을 제시하고 있다. 생쥐를 이용한 동물실험에서 혈액 내의 IgG와 IgA의 증가 및 대변 내에서 IgA의 증가를 확인하였으며 LTB에 의해서 유도된 항원이 cholera toxin (CT)에 대해서도 억제 효과가 있으며, LTB와 CTB의 유사한 항원력에 의해서 생성된 항체가 교차반응을 통하여 억제 효과를 나타낼 수 있는 의미 있는 결과를 보였다. Walmsley 등 (2003)은 sLTB와 생쥐 ZP3 epitope (ZP3₃₃₆₋₃₄₂)을 발현하는 토마토와 애기장대를 선발하였다. 또한 Walmsley 등 (2003)은 토마토에서 발현된 LTB항원이 경구로 어미 생쥐를 면역 시킨 후에 어린 생쥐 (생 후 21일)로 항체 전이가 나타났음을 증명하였다. Rigano 등 (2004)은 애기장대에 LTB와 결핵의 항원 ESAT-6 (early secretory antigenic target-6)를 융합 단백질 형태로 애기장대에서 발현 시켰으며 G_{M1} -ganglioside를 이용한 ELISA에서 항원력을 갖고 있음을 확인 하였다. Streatfield 등 (2002, 2003)은 합성된 LTB를 이용하여 옥수수 종자에 형질 전환하여 열에 대한 안전성을 조사한 결과 정제된 LTB보다 상대적으로 열에 안전한 식물 경구 백신 재료를 만드는데 성공하였으며 재조합 단백질 발현을 증대하기 위해서 세포 내 소기관에 단백질을 집적 시킨 결과 액포에 target한 벡터 구조에서 1000배 높은 단백질 농도를 검출할 수 있었다. 또한 이들은 지방이 제거된 옥수수를 사람에게 투여한 결과 LTB에 특이적인 혈청 항체 IgG와 대변에서 sIgA가 생성됨을 알았다 (Tacket et al. 2004). Chikwamba 등 (2003)은 합성 LTB를 옥수수에 발현 후 starch granules에서 endosperm 보다 두배 더 많은 재조합 단백질이 축적됨을 확인하였으며 프로테아제를 처리했을 때 starch granules안에 재조합 단백질이 존재하는 형질전환체에서 더 안정됨을 확인하였고 이는 경구 백신으로 사용시 정제된 단백질 보다 식물체를 이용한 경구 백신이 위산과 pepsin에 더 안정함을 보여주는 결과라 하겠다. Kang 등 (2003)은 LTB를 담배 엽록체에 발현 하여서 핵 형질보다 250배 높은 발현양을 얻었으며 기능적으로 안정된 구조를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 Kang 등 (2004)은 enterotoxin의 독성이 없는 돌연변이인 LTK63을 담배 엽록체에 형질전환 하여 생성된 재조합 단백질이 G_{M1} -ganglioside를 이용한 ELISA에서 항원력을 갖고 있음을 확인 하였다. 또한 동일 저자들은 합성된 LTB를 담배에서 발현 하여 native LTB를 사용하여 발현한 양보다 200배 높게 발현을 유도하였다.

2) *Vibrio cholerae*

콜레라를 유발하는 *Vibrio cholerae*의 endotoxin인 CT는 효소 활성을 나타내는 독성 부분인 CTA (ADP-ribosyltransferase)와 수용체 (G_{M1} ganglioside)에 결합하는 비독성 부분인 CTB로 구성되어 있다. CTA은 분자량은 28 kDa으로써 두개 (A_1 과 A_2)의 주 영역으로 구성되어 있고 CTB는 11.5 kDa을 갖는 다섯 개의 polypeptide가 결합된 구조 pentamer로 되어있다 (Schmitt et al. 1999). CT의 생체 내 발병 기전은 앞서 기술한 LT와 유사하다. 비독성 부분인 CTB는 장 내에서 다른 항원의 adjuvant로 작용할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 식물 경구 백신 연구에 있어서 항원력 증대 및 유용 펩타이드의 융합 단백질로 생체 내 흡수 증진 연구에 이용되고 있다 (Stevceva and Ferrari 2005). Hein 등 (1996)은 G_{M1} ganglioside에 결합하는 재조합 CTB는 *V. cholerae*에서 정제된 CTB와 같은 분자량으로 발현됨을 확인하였다. Arakawa 등 (1997, 1998)은 감자에서 분자량 50 kDa의 재조합 CTB가 pentamer 형태로 발현됨을 확인하였고 G_{M1} -ELISA binding assay 결과, 발현된 CTB는 미생물 유래 단백질과 같은 수용체 결합력을 나타냈으며, 생쥐를 이용한 동물실험에서는 형질전환된 감자를 투여한 군의 소장에서 60%의 설사액 감소 효과가 있다고 보고하였다. Wang 등 (2001)은 CTB를 발현하는 담배를 선발하였으며 담배에서 발현된 CTB는 정상적으로 pentamer를 형성함을 알았다. 또한 정제된 CTB를 생쥐에 근육주사 후 항체가 생성됨을 관찰하였고 immunodiffusion법과 immunoelectrophoresis를 이용한 항원력 측정 결과 박테리아 CTB와 같은 항원력을 나타냈다고 보고하였다. Daniell 등 (2001)은 CTB를 엽록체에 형질전환 후, 발현된 CTB가 pentamer 구조를 형성하고 단백질 발현량은 어린 잎과 노화된 잎 보다는 성숙한 잎에서 높게 나타남을 알았고 박테리아에서 정제된 CTB와 같은 결합력을 갖고 있음을 알았다. 또한 형질전환 식물체는 형태학적으로 비형질 전환된 식물체와 동일한 표현형을 나타내었다. Jani 등 (2002)은 발현된 CTB의 단백질 분자량은 55 kDa임을 확인하였으며, G_{M1} binding assay결과 비형질 전환체에 비해서 6배 이상의 높은 값을 나타냄을 알았다 (Jani et al. 2002). 또한 상피 면역을 유도한 생쥐에서 대조군에 비해 2.4배의 높은 값을 나타냄을 알았고 CTB는 non-inflammatory Th2형태의 조절 기작으로 면역 반응을 유도함을 밝혔다 (Jani et al. 2004). Yu 등 (2001)은 Immunoblot 분석 결과, 분자량 70 kDa에 해당하는 재조합 단백질을 확인하였고 경구를 통한 면역 반응이 유도된 생쥐에서 CTB, NSP4, CFA/I에 해당하는 혈청 항체 IgG와 점막 항체 IgG와 IgA가 증가되고 특히 CTB와 결합된 NSP4를 투여한 생쥐에서 높은 혈청 IgG 역가를 보여 CTB가 면역 증진제로 역할을 하고 있음을 확인하였다. 형질 전환된 감자로 면역 반응이 유도된 생쥐의 비장세포에서 IL-2와 INF

γ 가 증가되었는데 이는Th1-lymphocyte가 증세된 면역 반응이 유도되었기 때문이다. Flow cytometer를 이용한 비장 세포 분석 결과 $CD4^+$ 기억세포는 증가 하였으나 $CD8^+$ 기억세포의 증가는 나타나지 않았다. 저자들은 바이러스 (rotavirus SA11)를 이용한 공격접종 실험에서 형질전환 감자를 투여한 어미로부터 태어난 어린 생쥐의 바이러스 방어 효과를 확인하였고 경구 백신이 모체에 항체 생성 반응을 유도한 후 어린 태아에게 항체가 전이될 수 있는 수동 면역의 가능성을 최초로 보고하였다. Kim 등 (2003)은 CTB-murine rotavirus enterotoxin NSP4 (175 aa)의 재조합 단백질의 분자량은 165 kDa (pentamer)과 33 kDa (monomer)로 나타났다고 보고하였다.

3) *Bacillus anthracis*

탄저병 (anthrax)은 포자를 형성하는 토양 미생물인 *Bacillus anthracis*에 의해서 발병하며 피부, 소화기와 호흡기를 통해서 감염이 일어난다. 주로 토양을 통해 감염이 이뤄짐으로 초식 동물이나 인체에 감염하는 질병으로 알려져 있으며 사망에까지 이르게 할 수 있는 무서운 질병이다 (Friedlander 1999; Metcalfe 2002). 발병 원인 물질로는 poly-D-glutamic acid와 3개의 외독소 [protective antigen (PA), lethal factor (LF)와 edema factor (EF)]가 알려져 있으며, PA는 LF 또는 EF와 결합 시 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 질병 예방을 위한 기존의 백신은 국부적 고통과 부종 (edema), 홍반 (erythema)을 수반하는 부작용을 나타냄으로 새로운 형태의 백신 개발 필요성이 대두되고 있다 (Brachman et al. 1962). Azhar 등 (2002)은 세포독성 실험에서 LF ($1 \mu\text{g/ml}$)를 처리한 대식세포에서 26-98%의 세포독성 효과를 확인 하였다. Karasev 등 (2003)은 PA의 펩타이드 (671-702)를 식물 바이러스 벡터를 이용하여 재조합 항원을 얻었다. Aziz 등 (2002)은 PA를 핵 형질전환과 엽록체 형질전환 후, 생쥐를 이용한 동물실험에서 중화 항체가 생성됨을 확인하였다.

4) *Mannheimia haemolytica* A1

Bovine pneumonia pasteurellosis 또는 shipping fever를 일으키는 *Mannheimia haemolytica* A1은 가축 (염소, 양, 소 등)에게 고통 동반과 폐렴을 일으키고 폐사를 유발하여 축산 산업에서 치명적인 경제적 손실을 야기하는 미생물이다 (Griffin 1997; Yates 1982). 발병 원인 물질인 lipopolysaccharide와 leukotoxin (Lkt)이 알려져 있으며, Lkt는 세포막에 구멍을 내어 삼투압 불균형을 유도하여 세포가 괴사되고 폐렴으로 동물을 죽게 하는 것으로 알려져 있다 (Ackermann and Brogden 2000; Confer et al. 1995). Lee 등 (2001)은 동물 실험에서 Lkt의 transmembrane domain (345 aa)를 제거한 Lkt66과 mGFP5-ER fusion 단백질을 근육주사 후 항체가 생성됨을 확인하였고, 독소 중화 실험에서 Lkt에 대한

중화항체가 생성됨을 확인하였다.

5) *Clostridium tetani*

Tregoning 등 (2003)은 *Clostridium tetani*의 tetanus toxin fragment C domain (TetC)의 야생종 (tetC-AT)과 GC rich 형태 (tetC-GC)를 발현하는 Nt-pJST10의 담배는 백화 현상이 나타남을 관찰하였고 이는 발현된 단백질량과 직접적인 관계가 있음을 알았다. 생쥐 코를 이용한 점막 면역 실험 결과, 혈청 항체 IgG증가와 코와 장점막에서 항체 IgA가 증가됨을 관찰하였다.

결론과 전망

식물체를 이용하여 기존의 백신이 가지고 있는 여러 단점을 극복하고자 식물 경구 백신을 생산하려는 연구들이 10여년 동안 많이 진행되었으며 동물실험을 통하여 특이 항원에 대한 특이 항체가 유도됨이 증명되었고 공격 접종 실험에서 생존력 증가를 가져온다는 결과가 여러 연구자들에 의해서 밝혀졌다 (Arakawa et al. 1998; Yu et al. 2001; Aziz et al. 2002). 또한 LTB와 HBsAg등의 인체를 통한 임상 1 단계에서 성공적인 연구 결과로 식물 경구 백신의 현실적 가능성과 실용화에 한층 다가섰다 (Tacket et al. 1998; Kapusta et al. 1999; Kapusta et al. 2001; Tacket et al. 2004).

보다 안전하고 저렴한 단위 백신을 생산하고자 담배를 비롯하여 감자, 대두, 옥수수, 당근, 토마토, 시금치 등 다양한 식물체에서 형질전환체를 얻는데 성공하였다 (Haq et al. 1995; Lauterslager et al. 2001; Lee et al. 2002; Streafield et al. 2002; Karasev et al. 2003; Walmsley et al. 2003; Piller et al. 2004).

현재 식물 경구 백신 생산 연구는 비교적 항원 구조가 간단한 바이러스 질병에 대한 연구가 많이 이루어졌다 (Mason et al. 1996; Richter et al. 2000; Huang et al. 2001; Biemelt et al. 2003; Smith et al. 2003). 복잡한 항원 구조를 가지고 있는 미생물에 있어서는 비교적 구조가 간단한 enterotoxin (LT, CT, PA, Lkt66, TetC) 이나 미생물의 부착에 필요한 부착성 단백질 (K88ac, K99)들을 이용해 왔으나 앞으로 다양한 미생물의 항원 (예, pili, surface protein, flagella, 감염 숙주에 따른 다른 adhesion protein, 감염균에 따른 다른 enterotoxin 등)의 개발이 필요하고 복잡한 구조의 항원들의 식물체 내 발현을 위해 IRES를 이용한 벡터 시스템 (van der Velden et al. 1999; Toth et al. 2001; Chen et al. 2005; Pisarev et al. 2005) 응용 연구가 필요할 것으로 예상된다. 또한 경구백신으로 사용되는 재조합 단백질의 위장 내 분해 문제를 극복하기 위한 발현양 증대를 위해 plastid의 발현 시스템 (Daniell, et al. 2001; Kang et al. 2003;

Kang et al. 2004)과 발현 시스템의 최적화 연구 (McBride and Schaaf 1994; Mühlbauer and Koop 2005)가 요구되며 실용화를 위한 다양한 작물에서 형질전환 (Ruf et al. 2001; Skarjinskaia et al, 2003; Dufourmantel et al. 2004) 기술의 발전이 요구되고 있다. 이러한 기술적인 연구이외에 현재 식물 경구 백신의 상용화의 문제점으로 크게 대두되는 점은 백신 학자인 Plotkin가 주장하는 장내에서 일어나는 음식물 내성 (food tolerance)에 대한 정확한 기작 연구에 대해서 주의를 필요로 하며 연구가 되어져야 할 것이다. 이러한 내복 내성 (oral tolerance)에 대한 실험으로 ovalbumin을 과량 투여하면 항체가 유도되지 않은 결과도 있다 (van den Broeck et al. 2002). 만약 경구 백신으로 섭취된 항원들이 이러한 문제점을 야기할 경우, 병원균의 침입 시 생체 내에서 인지를 하지 못하는 문제점을 내포할 수도 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 투여량의 조절이 용이한 주사제로 사용 검토가 필요하며, 경구법을 제외한 다른 방법으로 초기 면역 반응이 유도된 동물이나 인체에 면역 반응 유도증가를 위한 경구백신으로 사용될 수 있다고 전망된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

Ackermann MR, Brogden KA (2000) Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Microbes Infect* 2: 1079-1088

Arakawa T, Chong DK, Langridge WH (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16: 292-297

Arakawa T, Chong DK, Merritt JL, Langridge WH (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 6: 403-413

Aziz MA, Singh S, Anand Kumar P, Bhatnagar R (2002) Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 345-351

Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Muller M (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 77: 9211-9220

Brachman PS, Gold H, Plotkin SA, Fekety FR, Werrin M, Ingraham NR (1962) Field evaluation of human anthrax vaccine. *Am J Public Health* 52: 632-645

Brandtzaeg P (1996) History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci* 778: 1-27

Chen YJ, Chen WS, Wu TY (2005) Development of a

- bi-cistronic baculovirus expression vector by the Rhopalosiphum padi virus 5' internal ribosome entry site. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 616-623
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res* 11: 479-493
- Confer AW, Clinkenbeard KD, Murphy GL (1995) Pathogenesis and virulence of *Pasteurella haemolytica* in cattle: an analysis of current knowledge and future approaches, p. 51-62. In W. Donachie, F. A. Lainson, and J. C. Hodgson (ed.), *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Cox E, Van der Stede Y, Verdonck F, Snoeck V, Van den Broeck W, Goddeeris B (2002) Oral immunisation of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Vet Immunol Immunopathol* 87: 287-290
- Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* 311: 1001-1009
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol* 55: 479-489
- Friedlander AM (1999) Clinical aspects, diagnosis and treatment of anthrax *J Appl Microbiol* 87: 303
- Griffin D (1997) Economic impact associated with respiratory disease on beef cattle, p. 367-377. In J. Vestweber and G. St. Jean (ed.), *Veterinary clinics of North America: food animal practice*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Hahn BS, Park JS, Kim HK, Ha SH, Cho KJ, Kim YH, Kim JB (2004) Recent studies of edible plant vaccine for prophylactic medicine against virus-mediated diseases. *Kor J Plant Biotechnol* 31: 151-161
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-716
- Hein MB, Yeo TC, Wang F, Sturtevant A (1996) Expression of cholera toxin subunits in plants. *Ann N Y Acad Sci* 792: 50-56
- Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S (2001) Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 19: 2163-2171
- Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK, Tyagi AK (2002) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 11: 447-454
- Jani D, Singh NK, Bhattacharya S, Meena LS, Singh Y, Upadhyay SN, Sharma AK, Tyagi AK (2004) Studies on the immunogenic potential of plant-expressed cholera toxin B subunit. *Plant Cell Rep* 22: 471-477
- Jin LZ, Zhao X (2000) Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swinea review. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 311-318
- Kang TJ, Han SC, Kim MY, Kim YS, Yang MS (2004) Expression of non-toxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco chloroplasts. *Protein Expr Purif* 38: 123-128
- Kang TJ, Loc NH, Jang MO, Jang YS, Kim YS, Seo JE, Yang MS (2003) Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic Res* 12: 683-691
- Kang TJ, Han SC, Jang MO, Kang KH, Jang YS, Yang MS (2004) Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Appl Biochem Biotechnol* 117: 175-187
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13: 1796-1769
- Kapusta J, Modelska A, Pniewski T, Figlerowicz M, Jankowski K, Lisowa O, Plucienniczak A, Koprowski H, Legocki AB (2001) Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Adv Exp Med Biol* 495: 299-303
- Karasev AV, A. B., Koprowski H (2003) Production of the *Bacillus anthracis* protective antigen fragments in plants. *Expert Rev Vaccines American society for Microbiology biodefense Research Meeting, Baltimore, MD, USA: abstract* 73
- Kim TG, Langridge WH (2003) Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato. *Plant Cell Rep* 21: 884-890
- Lauterslager TG, Florack DE, van der Wal TJ, Molthoff JW, Langeveld JP, Bosch D, Boersma WJ, Hilgers LA (2001) Oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* 19: 2749-2755
- Lee RW, Strommer J, Hodgins D, Shewen PE, Niu Y, Lo RY (2001) Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect Immun* 69: 5786-5793
- Lee YS, Hwang CH (2002) Development of transgenic carrot oral vaccine to protect against diarrhea of piglets. *Kor J Plant Biotechnol* 29: 287-293
- McBride KE, Schaaf DJ, Daley M, Stalker DM (1994) Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7301-7305
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335-5340
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16: 1336-1343

- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11745-11749
- May GD, Afza R, Mason HS, Wiecko A, Novak FJ, Arntzen CJ (2004) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via Agrobacterium-mediated transformation. *Bio/Technol* 13: 486-492
- Medaglini D, Pozzi G, King TP, Fischetti VA (1995) Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6868-6872
- Metcalfe N (2002) A short history of biological warfare. *Med Confl Surviv* 18: 271-282
- Mühlbauer SK, Koop HU (2005) External control of transgene expression in tobacco plastids using the bacterial lac repressor. *Plant J* 43: 941-946
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 18: 1167-1171
- Pisarev AV, Shirokikh NE, Hellen CU (2005) Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol* 328: 589-605
- Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, Le Page RW (1997) Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 15: 653-657
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19: 870-875
- Schmitt CK, Meysick KC, O'Brien AD (1999) Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg Infect Dis* 5: 224-234
- Skarjinskaia M, Svab Z, Maliga P (2003) Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicaceae. *Transgenic Res* 12: 115-122
- Smith ML, Richter L, Arntzen CJ, Shuler ML, Mason HS (2003) Structural characterization of plant-derived hepatitis B surface antigen employed in oral immunization studies. *Vaccine* 21: 4011-4021
- Stevceva L, Ferrari MG (2005) Mucosal adjuvants. *Curr Pharm Des* 11: 801-811
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 4: 607-609
- Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S (2004) Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 22: 4385-4389
- Toth RL, Chapman S, Carr F, Santa Cruz S (2001) A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors. *FEBS Lett* 489: 215-219
- Tregoning J, Maliga P, Dougan G, Nixon PJ (2004) New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC. *Phytochemistry* 65: 989-994
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 31: 1174-1179
- Van den Broeck W, Bouchaut H, Cox E, Goddeeris BM (2002) F4 receptor-independent priming of the systemic immune system of pigs by low oral doses of F4 fimbriae. *Vet Immunol Immunopathol* 85: 171-178
- Van der Velden AW, Thomas AA (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 87-106
- Walmsley AM, Alvarez ML, Jin Y, Kirk DD, Lee SM, Pinkhasov J, Rigano MM, Arntzen CJ, Mason HS (2003) Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Rep* 21: 1020-1026
- Walmsley AM, Kirk DD, Mason HS (2003) Passive immunization of mice pups through oral immunization of dams with a plant-derived vaccine. *Immunol Lett* 86: 71-76
- Wang XG, Zhang GH, Liu CX, Zhang YH, Xiao CZ, Fang RX (2001) Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity. *Biotechnol Bioeng* 72: 490-494
- Webster DE, Thomas MC, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL (2002) Appetising solutions: an edible vaccine for measles. *Med J Aust* 176: 434-437
- WHO (2000). Supplementary information on vaccine safety. Geneva. World Health Organization (WHO/v&B/00.36)
- Yates WDG (1982) A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med* 46: 225-263
- Yu J, Langridge WH (2001) A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol* 19: 548-552

(접수일자 2005년 10월 17일, 수리일자 2005년 11월 21일)