

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 벼 현탁 세포주에서 miraculin 단백질의 생산

김희경 · 고지윤 · 박소영 · 강권규 · 정유진

Production of miraculin protein in suspension cell lines of transgenic rice using *Agrobacterium*

Hee Kyoung Kim · Ji Yun Go · So-Young Park · Kwon Kyoo Kang · Yu Jin Jung

Received: 21 September 2020 / Revised: 23 September 2020 / Accepted: 23 September 2020

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To produce the miraculin protein in suspension cultures, rice (*Oryza sativa* L.) was transformed with *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 containing the miraculin AB512278 gene. The cell suspension cultures were established using cell lines selected from transgenic rice callus. The integration of the miraculin gene into the rice chromosome was confirmed using genomic PCR analysis. In addition, RT-PCR analysis indicated that the miraculin gene is expressed in the selected suspension cell lines. Thus, the recombinant miraculin was expressed in the transgenic suspension cell line, HK-2. Therefore, we have successfully developed a HK-2 line that produces miraculin. These results demonstrate that transformed cell suspension cultures can be used to produce a taste-modifying protein such as miraculin.

Keywords Cell suspension culture, Rice transformation, Miraculin, Taste-modifying protein

H. K. Kim · J. Y. Go · K. K. Kang · Y. J. Jung (✉)
한경대학교 생명공학부 원예생명공학전공
(Division of Horticultural Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea)
e-mail: yuyul216@hkn.ac.kr

K. K. Kang · Y. J. Jung (✉)
한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea)

S.-Y. Park
충북대학교 응용생명공학부 원예과학전공
(Department of Horticultural Science, Division of Animal, Horticultural and Food Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)

서 언

최근 들어 식물세포를 이용한 유용단백질 생산은 비교적 낮은 생산단가, 동물병원균에 자유롭고, 번역 후 변형(post-translational modification) 가능성 때문에 많은 생물학자들에게 수년 동안 주목을 받고 있다. 번역 후 변형에 대한 몇몇 연구에서 단백질의 N-glycosylation은 기능을 하고 있는 단백질들의 안정성 및 활성에 매우 중요한 역할을 한다(Ruiz-Canada et al. 2009; Shrimal et al. 2015). 흥미롭게도 N-glycosylation은 숙주세포, 발현시간, 발현기관 및 성장조건에 따라 달라지며 N-glycan 구조적 다양성을 초래하게 한다(Shrimal et al. 2015). 따라서 재조합단백질을 생산하기 위해서 N-glycan 구조는 단백질의 변형에 있어서 중요하며, *in vitro* 상에서 단백질 생산을 위한 실제적 적용에 있어서 매우 중요한 요인으로 알려져 있다(Ruiz-Canada et al. 2009). Miraculin은 미각 수식 물질 중 하나인 가용성 단백질로 그 작용을 살펴보면 miraculin은 단맛 수용체와 결합하는 성질을 가지며, 신맛을 가지는 것을 먹으면 수소이온이 miraculin과 결합하여 구조가 변화하고 단맛수용체를 활성화하는 것으로 알려져 있다(Ito et al. 2007). 따라서 miraculin은 신맛을 단맛으로 바꾸어 주는 작용을 한다. 이런 miraculin 단백질은 100°C 이상 가열하거나 pH 3 이하 또는 pH 12 이상 일때에는 그 작용을 잃으며, 칼슘 및 마그네슘이온이 존재하는 조건에서 miraculin작용이 저해된다고 하였다(Brouwer et al. 1968). Miraculin과 유사한 작용을 하는 단백질들은 네오쿠린, 쿠루쿠린 및 스토로진 등이 보고되었다(Shirasuka et al. 2004; Kurihara 1997). Theerasilp 등(1989)에 의해 miraculin은 191 아미노산 잔기를 가진 단백질 당쇄가 결합된 당 단백질로 알려졌다. 분자량은 약 24,600 Da이며, 그 중 13.9%에 해당되는 3,400 Da는 글루코사민, 30%는 만노오스, 22%는 후코스, 10%는 자일로스, 7%는 갈락토스 등으로 이루어진 당쇄 구조이다(Theerasilp and Kurihara

1988). 또한 이황화(S-S) 결합을 통해 2량체 두 개가 연결된 4량체(98.4 kDa)형이 존재하고 있다. 통상 miraculin 단백질은 마라클 프루트(*Richardella dulcifica*) 열매 1립에서 약 0.3mg 정도 얻는다고 하였다(Brouwer et al. 1968). 최근 들어 miraculin 기능을 산업용 또는 재조합 miraculin 생산을 위해 대장균(Kurihara 1992), 효모(Kurihara 1997) 및 *Aspergillus oryzae* (Ito et al. 2007)와 같은 다양한 숙주세포를 이용하여 실험한 결과 마라클 프루트 열매로부터 얻은 활성보다 훨씬 낮은 결과를 초래하였다. 반면에 식물 발현시스템을 통한 몇몇 실험에서는 재조합 miraculin 활성과 천연 miraculin 활성과 거의 비슷한 결과를 얻었다(Sun et al. 2006, Sun et al. 2007, Al Bachchu et al. 2011, Park et al. 2020). 이런 결과는 N-glycosylation 뿐만 아니라 miraculin에서 β 1,2-xylose (Xyl)과 α 1,3-fucose (Fuc) 잔기들을 가진 식물 특이적 N-glycans이 단백질 접힘(folding), 안정성 및 그에 따른 활성 등에 매우 중요하다고 하였다(Kajiura et al. 2018).

본 연구에서는 miraculin 단백질을 *in vitro* 상에서 생산하기 위해 고구마 유래 배양세포에서 과 발현시킨다고 알려져 있는 SWPA2 프로모터를 이용하여 Ti-plasmid 구축, *Agrobacterium* 법에 의해 형질전환 실험, 벼 계놈에 도입 및 발현 분석을 수행하였다. 그 후, miraculin 단백질이 안정적으로 발현하는 세포주를 선발하여 현탁배양을 통한 단백질 대량생산 시스템에 대해 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

식물발현 벡터 구축

벼 형질전환을 위한 Ti-plasmid는 pCAMBIA2300의 binary 벡터를 사용하였다. Miraculin 유전자(AB512278)는 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 염기서열 정보를 기반으로 ORF 말단부위에 제한효소 *Xho* I 및 *Bam*H I 인식서열을 첨가하여 유전자를 합성하였다(<https://www.bioneer.co.kr>). 합성한 miraculin 유전자의 총 염기는 727 bp로 개시 및 종지 코돈이 잘 포함되었다. 또한 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위하여 C-말단 영역에 2xFLAG-tag (DYKDDDDK) 서열을 첨가하여 pCAMBIA2300 벡터에 클로닝 하였다. 또한 miraculin 유전자 발현을 위해 사용한 프로모터는 Kim 등(2003)이 보고한 고구마 유래 산화스트레스 유도성 SWPA2 (sweetpotato peroxidase anionic 2)를 분양 받아 miraculin 유전자 앞에 클로닝 하였다. 형질전환체 선발을 위한 선발 마커는 bar 유전자를 사용하여 Ti-plasmid 벡터를 완성하였다(Fig. 2A). 구축한 벡터는 electroporation 방법(Kámán-Tóth et al. 2018)에 의해 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 EHA105에 도입하여 초저온 냉동고(-80°C)에 저장하였고 일부는 식물형질 전환에 사용하였다.

형질전환 셀 라인 육성 및 도입유전자 확인

형질전환 벼 육성을 위하여 농촌진흥청으로부터 분양 받은 동진 벼(*Oryza sativa* L. var. Japonica cv. Dongjinbyeo) 종자를 70% EtOH에서 30초, 2.5% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 소독하였으며, 멸균된 증류수를 이용하여 3회 이상 세척한 후 2 mg/L 2,4-D가 포함된 N6 고체배지에 파종하여 28°C에서 3주 동안 암 배양하였다. 암 배양하여 형성된 callus를 선발하여 100 mM acetosyringon이 포함된 *Agrobacterium* 현탁액에 담가 10분간 접촉한 후 callus를 멸균된 필터페이퍼 위에서 5분간 건조시켜 2 mg/L 2,4-D와 10 mg/L glucose, 100 mM acetosyringon이 포함된 N6 고체배지에 치상하여 25°C에서 3일간 공동배양 하였다. 3일 후 감염된 callus는 멸균된 증류수로 3회 이상 세척하여 2 mg/L 2,4-D와 10 mg/L glucose, 400 mg/L carbenicillin과 6 mg/L PPT (phosphinothricin)가 들어간 N6 고체배지에 callus 생장 및 형태를 관찰하여 선발된 형질전환 셀라인을 2주마다 계대배양하여 육성하였다(Jung et al. 2014, Jung et al. 2017, Lee et al. 2018). 선발된 형질전환 셀라인은 현탁배양에 이용하였다(Fig. 2B). 형질전환 callus 셀라인으로부터 miraculin 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 선발된 셀라인으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석은 SWPA2-Fw (5'-CCAATTAAGTCCCAACCA-3')와 Miraculin-Rv (5'-ACGGTGGGACAGAAAACAAG-3') primer set를 이용하였으며, PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 57°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 30cycles로 수행하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하여 분석하였다(Table 2).

형질전환세포 발현 분석

형질전환 후, 유전자가 도입된 형질전환 셀라인으로부터 도입 miraculin 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR과 Western blot 분석을 수행하였다. Total RNA는 FavorPrep™ Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen, Korea)를 사용하여 추출하였고, Inclone™ One-step RT-PCR kit (Inclone Biotech, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 57°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 30cycles로 수행하였고, 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. PCR 산물을 2% agarose gel 상에 영동 한 후, ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다. Western blot 분석을 위한 단백질 추출은 miraculin 유전자가 도입되어 mRNA의 발현양이 높은 셀라인과 wild type의 callus로부터 extraction buffer 2.0 M KPO₄ (pH 7.8), 0.5 M EDTA, Triton X-100, 1.0 M dithiothreitol (DTT), 80% glycerol 및 dH₂O 200 μ l를 용해 완충액으로 사용하여 추출하였다. Bradford (1976)가 보고한 방법을 통해 단백질의

Table 1 Comparison of the amino acid sequence of miraculin with allergenic proteins using Allermatch (<http://www.allermatch.org/>) and NCBI blast

Description	Best hit identity	No of hits ident >35.00	% of hits ident >35.00	Full identity	Scientific name
Serine protease inhibitor 7	39.30	24	17.02	28.60/227	<i>Solanum tuberosum</i>
Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1	37.54	16	11.35	33.50/212	<i>Glycine max</i>
Trypsin inhibitor A	37.54	13	9.22	31.60/215	<i>Glycine max</i>
Kunitz-type trypsin inhibitor KTI2	37.54	8	5.67	32.40/213	<i>Glycine max</i>
Kunitz trypsin inhibitor	37.50	13	9.22	31.60/215	<i>Glycine max</i>
Kunitz trypsin inhibitor	37.50	13	9.22	31.60/215	<i>Glycine max</i>
Aspartic protease inhibitor 11	35.80	6	4.26	29.90/194	<i>Solanum tuberosum</i>
Cysteine protease inhibitor 1	35.00	3	2.13	28.80/240	<i>Solanum tuberosum</i>

Table 2 PCR primers for transgene confirmation and RT-PCR

Primer name	Sequence (primer direction 5'-3')
PCR primers	
SWPA2-Fw	CCAATTAAGTCCCCAACCA
Miraculin-Rv	ACGGTGGGACAGAAAACAAG
RT-PCR primers	
Miraculin RT-Fw	TCCACCGATCTCAACATCAA
Miraculin RT-Rv	GGTTGCGTTTTTCGTCTAG
Actin-Fw	ATGGTTGGGATGGGTCAAAAA
Actin-Rv	TCTTTAATGTCACGGACGATT

농도를 조절하였고, 대조구로 소혈청알부민을 사용하여 검출하였다. Western blot 분석은 각각의 셀라인으로부터 총 단백질 50 µg을 12% SDS polyacrylamide gels에서 분리하였다 (Laemmli 1970). Anti-FLAG용 단일 항체(Sigma-Aldrich, USA)는 1: 1000 (v/v)로 희석하여 사용하였고, 단백질 검출은 Roche 회사에서 제공하는 매뉴얼에 따라 수행하였다.

E. coli로부터 재조합 miraculin 단백질유도

*E. coli*를 이용하여 miraculin 단백질 발현을 위해 pET42 벡터의 *EcoRV* 및 *BamH I* 제한효소 부위에 클로닝하여 *E. coli* 균주 BL21에 형질전환 하였다(Fig. 6A). 형질전환 된 균주는 50 mg/L kanamycin이 들어간 LB 고체배지에 도말하고, 선발된 colony를 50 mg/L kanamycin이 들어간 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 이후, 배양액은 1/20로 scale-up 하여 37°C에서 약 3시간 배양하여 OD₆₀₀가 0.5-1.0에 도달하도록 하였다. 이후 균 배양액에 IPTG를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가하여 37°C에서 약 3시간 배양함으로써 단백질 발현을 유도하였다. 발현 유도된 균 배양액은 4°C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하고 PBS buffer를 넣고 1초 간격으로 60회 sonication 하였다. 용해된 세포를 4°C에서

12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하고 상층액을 수집하여 발현 분석 및 단백질 정량을 위한 표준곡선 구축에 이용하였다.

Miraculin 단백질 정제

*E. coli*로부터 추출한 재조합 단백질의 정제는 Anti-DYKDDDDK Affinity Resin Column (Sino Biological Inc., China)을 이용하여 진행하였다. PBS buffer (pH 7.4)를 column에 3회 흘려 column을 평형화 시킨 뒤 0.45 µM filter로 필터링 한 전체 가용성 단백질을 Anti-DYKDDDDK Affinity Resin에 몇 차례 결합시켰다. 그 다음 PBS buffer (pH 7.4)를 이용하여 결합되지 않은 단백질을 washing 후 pH 3.0의 elution buffer (100 mM glycine, 10 mM NaCl)를 5회 이상 흘려 column에 결합된 재조합 단백질을 용출하였다.

Miraculin 단백질 정량화를 위한 표준곡선 구축

정제된 miraculin 단백질 100 ng, 200 ng, 400 ng, 600 ng, 800 ng, 1000 ng/lane을 12% SDS polyacrylamide gels에서 분리하고, 상기에 기재된 바와 동일하게 Western blot 분석을 실시하여 검출하였다. 농도별로 검출된 면적의 intensity를 측정하여 Bradford (1976)가 보고한 방법을 응용하여 단백질 정량을 위한 표준곡선으로 나타냈다.

결과

Miraculin 단백질의 특성 및 구조분석

서아프리카 원산으로 *Richadella dulcifica*의 붉은 열매인 miracle fruit에서 분리된 miraculin 유전자는 660 bp의 염기로 이루어져, 29개의 아미노산 N-말단 신호 서열을 포함하는 220개의 아미노산으로 24.6 kDa의 분자량을 갖는다(Fig. 1). Miraculin

```

AGAATTCCTCGAGATGAAGGAATTAACAATGCTCTCTCTCTCGTCTCTCTCTCGTCTCTGCA 61
1  E F L E M K E L T M L S L S F F F V S A
TTGTTGGCAGCAGCGGCCAACCCACTGCTTAGTGCAGCGGATTTCGGCACCCCAACCCGGTT 121
21  L L A A A A N P L L S A A D S A P N P V
CTTGACATAGACGGAGAGAACTCCGGACGGGGACCAATATTACATTTGTGCGGTGCTC 181
41  L D I D G E K L R T G T N Y Y I V P V L
CGGACCATGGCGGCGGCCTTACAGTATCCGCCACCACCCCAACGGCACCTTCGTTTGT 241
61  R D H G G G L T V S A T T P N G T F V C
CCACCCAGAGTTGTCCAACACGAAAGGAGGTGCGACCAGATCGCCCTCGCTTCTTT 301
81  P P R V V Q T R K E V D H D R P L A F F
CCAGAGAACCCAAAGGAAGACGTTGTTTCGAGTCTCCACCGATCTCAACATCAATTTCTCG 361
101 P E N P K E D V V R V S T D L N I N F S
GCGTTTCATGCCCTGTGTTGGACCACTCCACCGTGTGGCGGCTCGACAAATACGATGAA 421
121 A F M P C R W T S S T V W R L D K Y D E
TCCACGGGGCAGTACTTCGTGACCATCGGCGGTGTCAAAGGAAACCCAGGTCCCGAAAC 481
141 S T G Q Y F V T I G G V K G N P G P E T
ATTAGTAGCTGGTTAAGATTGAGGAGTTTTGTGGTAGTGGTTTTTACAAGCTTGTTTTC 541
161 I S S W F K I E E F C G S G F Y K L V F
TGTCCACCGTGTGTTTCCTGCAAGTAAATGCGGAGATGTGGGCATTACATTGAT 601
181 C P T V C G S C K V K C G D V G I Y I D
CAGAAGGGAAGAAGGCGTTTGGCTCTCAGCGATAAACCAITTCGCAITTCGAGTTCAACAAA 661
201 Q K G R R R L A L S D K P F A F E F N K
ACCGTATACTTCGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGTGAACAAGGACGACGATGAC 721
221 T V Y F D Y K D D D D K G D Y K D D D D
AAGTGATAAGGATCCG 737
241 K - - G S

```

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of miraculin gene. The underlined green text represents the FLAG-tag

단백질 생산 및 활용을 위하여 Allermatch (<http://www.allermatch.org/>) 및 NCBI blast에서 serine protease inhibitor 7 등 총 8종의 독성 및 알러지 관련 단백질과 유사성을 조사한 결과, 모든 단백질에서 35.0~39.3%의 범위로 나타났다(Table 1). 그러므로 miraculin 단백질은 인체 또는 동물에 유해한 독성 및 알러지에 영향이 거의 없는 것으로 판단된다. 따라서 본 실험에 사용한 miraculin 단백질을 식물 세포에 발현하여 세포내 축적하면, 매우 유용할 것으로 평가된다.

형질전환 세포 육성 및 cell line 선발

Miraculin 유전자를 벼 게놈에 도입하기 위해 식물형질전환용 Ti-plasmid pCAMBIA2300 벡터에 SWPA2 프로모터에 하에 발현하도록 유전자를 클로닝하고, 선발 마커로 bar 유전자가 삽입된 식물발현 벡터를 구축하여 *A. tumefaciens* EHA105에 형질전환시켜 벼 캘러스에 도입하였다. 감염된 callus는 cell line 구축을 위해 N6 고체배지에서 증식시켰으며 2주마다 계대배양을 하여 빠르게 분화하는 5개의 cell line을 선발하였다(Fig. 2). 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 선발된 cell line으로부터 각각 DNA를 추출한 후 SWPA2 프로모터 영역과 miraculin 유전자 영역의 프라이머를 작성하여 PCR 분석을 수행하였다. 그 결과 WT과 달리 선발된 callus로부터 661 bp에서 밴드가 검출되어 miraculin 유전자가 식물세포에 안정적으로 도입되었음을 확인하였다(Fig. 3A).

선발 셀라인의 현탁배양 및 세포 증식

Miraculin 유전자의 도입 여부가 확인되어 선발된 cell line들을 대량 증식하기 위해 현탁배양을 실시하였다(Fig. 4A). 선발한 5개 cell line은 60~85 rpm으로 현탁 배양하고, 4일마다 계대배양을 하였으며, 세포 성장률을 조사하였다. 그 결과,

배양 후 12일째 HK-2 계통의 성장율이 대조구에 비해 6.3배로 가장 많이 증가하였으며, HK-3과 HK-4는 각각 5.5배와 5배의 증가율을 보였다(Fig. 4B).

선발된 현탁배양 cell line으로부터 miraculin 발현분석

선발한 형질전환 셀라인들에서 miraculin 유전자의 발현여부를 확인하기 위해 각각의 셀라인으로부터 total RNA를 추출한 후 RT-PCR 분석을 수행하였다. 그 결과, 선발한 5개 셀라인에서 유전자가 발현한 예상 사이즈의 밴드가 검출되었으나, 대조구에서는 검출되지 않았다(Fig. 3B). 따라서 도입한 miraculin 유전자가 벼 게놈에 잘 integration되어 mRNA로 안정적으로 전사되었음을 시사한다. RT-PCR 결과에서 HK-2가 가장 높은 발현양을 보였으며, 다음으로 HK-3, HK-4 순으로 발현의 차이를 보였다(Fig. 3B). 또한 선발한 5개 셀라인에서 단백질 축적 여부를 검토하기 위하여 SDS-PAGE 및 Western blot 분석을 수행한 결과, 선발한 5개 셀라인에서 28.4 kDa의 밴드가 검출되었다(Fig. 5). 따라서 형질전환 벼 현탁배양 셀라인에서 miraculin 단백질이 안정적으로 발현하고 있음을 보여주었다.

E. coli 재조합 단백질 생산 및 정량화

*E. coli*에 miraculin 유전자를 발현시켜 단백질 생산 여부 및 정량화를 Ming과 Hellekant (1994)에 의해 보고한 방법으로 실시한 결과 miraculin의 분자량인 24.6 kDa에 FLAG-tag 분자량을 포함한 28.4 kDa에서 농도별로 단백질이 검출되었다(Fig. 6B). 검출된 면적의 intensity를 측정하여 단백질 정량을 위한 표준곡선으로 나타낸 결과, $y = 7630.4x + 148034$ 의 방정식을 얻었다(Fig. 6C).

표준곡선을 기반으로, 형질전환 식물 세포로부터 추출한

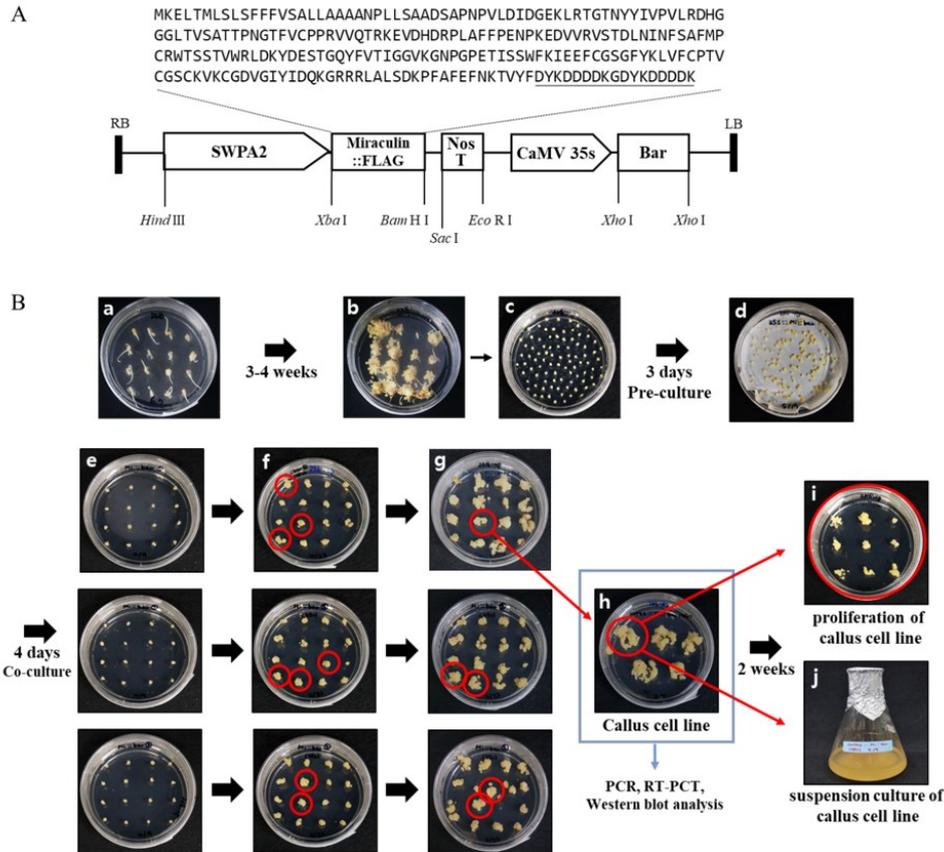


Fig. 2 Selection strategy of suspension cell lines with the recombinant taste-modifying protein, miraculin. (A) Ti-plasmid vector construction for overexpression of miraculin genes in rice. T-DNA region of pCAMBIA2300::miraculin. RB, right border; LB, left border; SWPA2, oxidative stress-inducible peroxidase anionic 2 promoter; miraculin::FLAG, miraculin gene with FLAG-tag; Nos-T, nopaline synthase terminator; CaMV 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; bar, bar gene. (B) *Agrobacterium*-mediated transformation procedures in rice callus. a, seed sowing; b, callus formation after 3 weeks; c, callus selection for infection; d, callus infection; e-g, callus formation after infection; h-i, selection of callus cell line; j, suspension culture of callus cell line (HK-2)

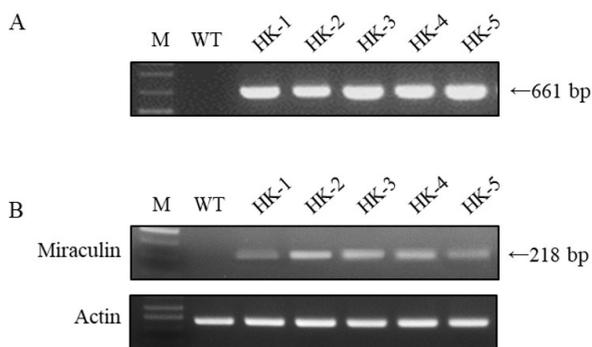


Fig. 3 RT-PCR analysis of recombinant suspension cell lines. (A) Confirmation of T-DNA integration in recombinant suspension cell lines using forward primer (SWPA2 promoter region) and reverse primer (miraculin gene region). (B) RT-PCR analysis of recombinant suspension cell lines and wild type. M, molecular marker; WT, wild type callus as negative control; HK-1-HK-5, transgenic suspension cell lines

total 단백질에서 얻을 수 있는 재조합 miraculin의 양을 정량화 하였다. 식물형질전환 세포로부터 추출한 동일한 양의 총 단백질 50 µg/lane을 12% SDS polyacrylamide gels에서 분

리하고(Laemmli 1970), Western blot을 실시하여 검출된 밴드의 intensity를 측정하였으며, 이를 구축한 표준곡선에 대입하였다. 그 결과, HK-2 계통에서 현탁배양세포의 정제된 miraculin 단백질은 0.087 µg/mL (TSP 대비 2.0%) 로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 HK-3, HK-4, HK-5 및 HK-1 계통 순으로 0.080 ~ 0.033 µg/mL 범위를 보였다(Table 3). 이런 결과는 박 등(2020)이 당근세포에 발현시킨 결과 보다는 3배 정도 높게 나타났다. 따라서 현탁배양세포를 이용하기 위해서는 당근보다는 벼 유래 현탁배양세포가 용이하다고 생각한다. 본 연구에서 miraculin 단백질 생산이 가장 높았던 HK-2 계통은 탱크배양 등을 통해 scale up 하면 miraculin 단백질 생산이 가능할 것으로 사료된다.

고 찰

과도한 설탕 섭취로 성인 질병의 위험이 높아짐에 따라 사카린, 아스파탐, 시클라메이트 및 아세설팜 K와 같은 인공 감미료는 전세계적으로 당뇨병, 고지혈증, 충치 및 비만과

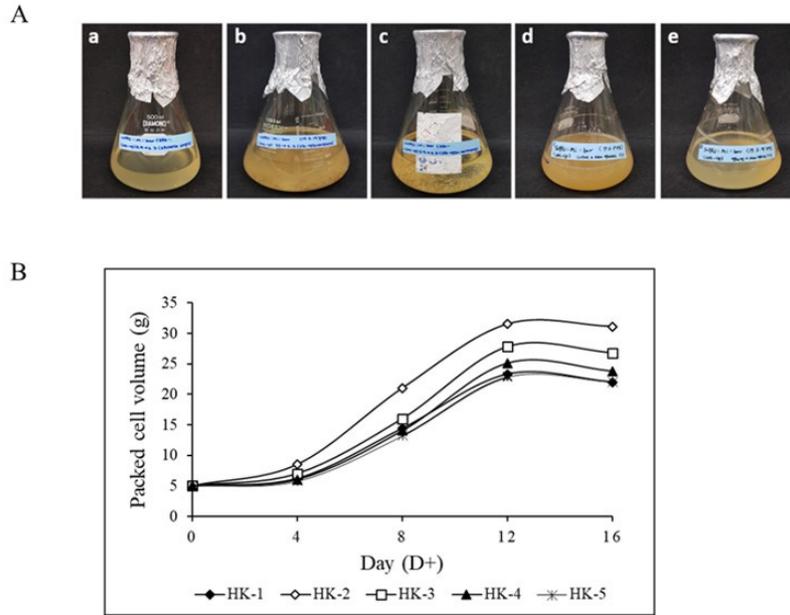


Fig. 4 Cell growth curves for recombinant suspension cell lines. (A) Suspension cell lines sub-cultured 4 times and measured 4 times every 4 days. a-e, suspension cell line HK-1 to HK-5. (B) The relationship between packaged cell volume and suspension culture time

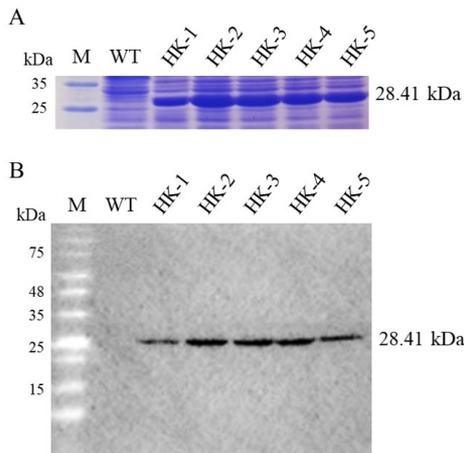


Fig. 5 Protein production in recombinant suspension cell lines using SDS-PAGE and Western blot analysis. (A) SDS-PAGE analysis (B) Western blot analysis with the FLAG-tag (DYKDDDDK). Protein was isolated from 5 suspension cell lines (HK-1 to HK-5) and wild type callus. M, molecular marker; WT, wild type callus as negative control

같은 설탕 소비와 관련된 질병을 가진 환자들을 위한 저칼로리 감미료로서 사용된다. 그러나 이러한 물질은 심리적 문제, 정신 장애, 방광암, 심부전 및 뇌종양을 포함한 부작용을 일으킬 수 있다고 하였다(Kant 2005). 따라서 대체 감미료에 대한 지속적인 관심이 있어왔으며, 당 단백질 및 미각 수식 단백질은 천연물질로 안전하며 저칼로리 감미료의 특성 때문에 이러한 인공 감미료를 대체할 수 있다. 그 중 열대 식물인 *Richadella dulcifica*로부터 분리된 miraculin은 한정적인 재배 환경으로 인하여 생산 및 상업적 이용에 제한이 있다. 따

라서 대장균(Kurihara 1992), 효모(Kurihara 1997), *Aspergillus oryzae* (Ito et al. 2007) 등 미생물에서 miraculin 단백질의 대량 생산을 위한 대체 생산 시스템의 연구가 많이 진행되었으며 상추(Sun et al. 2006; Jung and Kang 2018), 토마토(Sun et al., 2007), *Citrus unshiu* (Al Bachchu et al., 2011) 등 형질전환 식물을 사용한 연구도 진행되고 있다. 특히, 식물 발현 시스템은 낮은 생산 비용, 동물성 병원균의 부재 등을 포함하여 몇 가지 장점을 갖는다. 또한, 식물 세포는 박테리아에서 수행될 수 없는 글리코실화와 같은 복잡한 번역 후 변형(Post-translational modification) 이 가능하다. 따라서 식물 형질전환체는 백신, 항체, 호르몬, 바이오 제약 및 식품 첨가물과 같은 재조합 단백질을 생산하기 위해 사용되고 있다(Hood and Jilka 1999; Yoshida and Shinmyo 2000; Daniell et al. 2001; Hood et al. 2002; Horn 2004). 본 실험에서 선발한 HK-2 계통에서 현탁배양세포의 정제된 miraculin 단백질은 0.087 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (TSP 대비 2.0%)을 얻어 산업적으로 생산 가능한 수준으로 평가된다. 또한 이전에 박 등(2020)에 의해 당근세포주에서 유사한 결과를 보인 것으로 미루어 볼 때 현탁배양을 통해 단백질의 안정적인 생산이 매우 유효하다는 평가를 내릴 수 있다. 본 연구에서는 miraculin 단백질의 이용 가능성을 높이기 위해 재조합기술을 이용한 형질전환 비 세포로부터 유전자의 안정적 발현 및 정량화를 수행하고, 현탁배양 시스템을 통해 세포 증식에 대한 토대를 마련하였다. 향후, 본 연구를 통해 선발한 HK-2 계통은 고농도 단백질 정제 기술 개발 및 탱크 배양을 통한 재조합 단백질 대량생산 시스템을 구축하는데 이용 가능 할 것으로 사료된다.

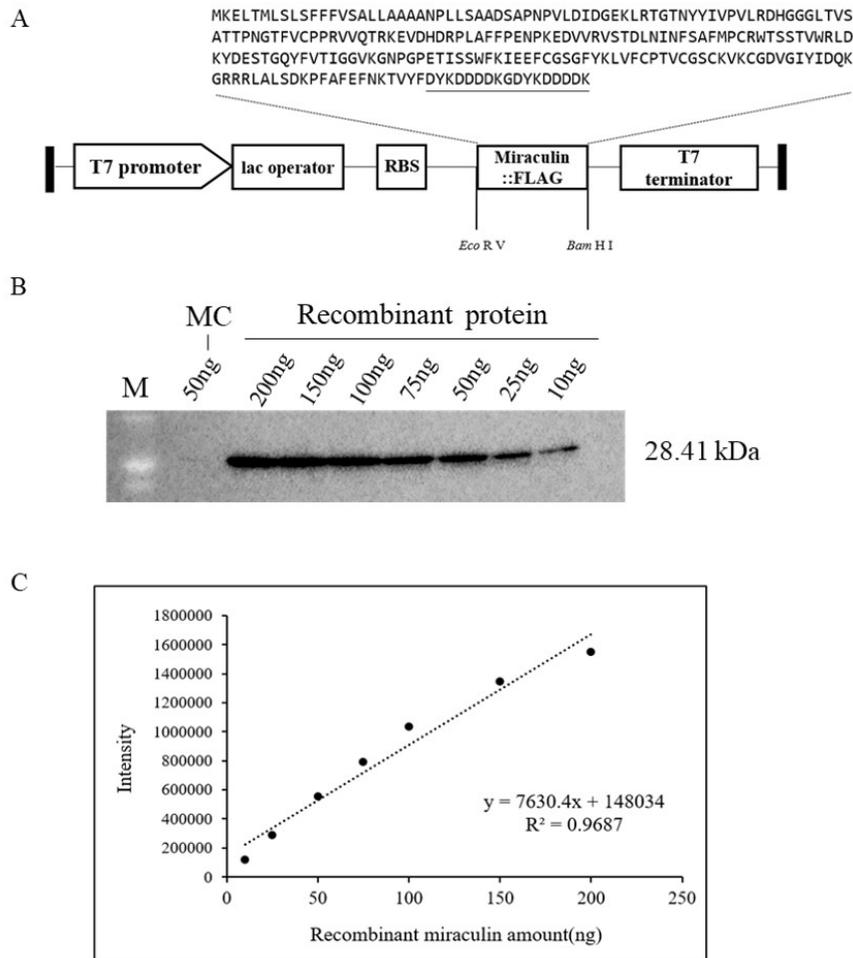


Fig. 6 Standard curve for quantification of recombinant miraculin protein. (A) pET42 vector construction with *EcoRV* and *BamHI* for miraculin protein expression in *E. coli*. pET42-miraculin vector consisted of a T7 promoter gene, lac operator gene, RBS (ribosomal binding site), the miraculin gene with FLAG-tag, and a T7 terminator gene. (B) Western blot analysis of purified recombinant miraculin protein from *E. coli* strain BL21 containing pET42-miraculin vector. M, molecular marker; MC, *E. coli* strain BL21-MOCK control (no IPTG treatment); Recombinant proteins by concentration (IPTG treatment). (C) Standard curve for recombinant protein quantification

Table 3 Quantification of miraculin protein from suspension cultured cell lines using a modified Bradford assay (Bradford 1976)

Cell line	Total soluble protein (TSP) (µg/µL)	Purified miraculin protein (µg/mL)	Purity (% TSP)
HK-1	3.55	0.033	0.93
HK-2	4.35	0.087	2.00
HK-3	4.15	0.080	1.93
HK-4	3.80	0.072	1.89
HK-5	3.58	0.050	1.40

적 요

벼(*Oryza sativa* L.)에서 세포 현탁 배양을 통한 miraculin 단백질의 생산을 위해 miraculin 유전자(AB512278)가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105를 매개로 벼 캘러스에

형질전환하였다. 현탁배양세포주는 형질전환 캘러스를 이용하여 몇 번의 선발과정 및 계대배양을 통해 선발하였고, 게놈 PCR 분석을 통해 miraculin 유전자가 벼 염색체에 안정적으로 도입된 것을 확인하였다. 또한, RT-PCR 분석을 통해 형질전환 세포주에서 도입된 miraculin 유전자가 과발현 되었다. 재조합 miraculin은 형질전환 현탁배양 HK-2 세포주에서 가장 높게 발현되어 total soluble protein (TSP) 대비 2.0%를 보였다. 이러한 결과는 형질전환 현탁세포배양이 miraculin 과 같은 미각 수식 단백질의 대량생산 시스템을 구축하는데 이용 가능 할 것으로 사료된다.

사 사

본 성과물은 농촌진흥청 차세대바이오그린21 연구사업(세부과제번호: PJ01368902)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Al Bachchu MA, Jin SB, Park JW, Boo KH, Sun HJ, Kim YW, Lee HY, Riu KZ, Kim JH (2011) Functional expression of Miraculin, a taste-modifying protein, in transgenic Miyagawa Wase Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54:24-29
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brouwer JN, Van Der Wel H, Francke A, Henning GJ (1968) Miraculin, the sweetness-inducing protein from miracle fruit. *Nature* 220:373-374
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6:219-226
- Hood EE, Jilka JM (1999) Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 10:382-386
- Hood EE, Woodard SL, Horn ME (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants-myths and realities. *Curr Opin Biotechnol* 13:630-635
- Horn ME, Woodard SL, Howard JA (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep* 22:711-720
- Ito K, Asakura T, Morita Y, Nakajima KI, Koizumi A, Shimizu-Ibuka A, Masuda K, Ishiguro M, Terada T, Maruyama J, Kitamoto K, Misaka T, Abe K (2007) Microbial production of sensory-active miraculin. *Biochem Bioph Res Co* 360:407-411
- Jung YJ., Bae S, Lee GJ, Seo PJ, Cho YG, Kang KK (2017) A novel method for high-frequency genome editing in rice, using the CRISPR/Cas9 system. *J Plant Biotechnol* 44:89-96
- Jung YJ, Kang KK (2018) Stable expression and characterization of brazzein, thaumatin and miraculin genes related to sweet protein in transgenic lettuce. *J Plant Biotechnol* 45:257-265
- Jung YJ, Nou IS, Kang KK (2014) Overexpression of *Oshsp16.9* gene encoding small heat shock protein enhances tolerance to abiotic stresses in rice. *Plant Breed Biotech* 2:370-379
- Kajiura H, Hiwasa-Tanase K, Ezura H, Fujiyama K (2018) Comparison of the *N*-glycosylation on recombinant miraculin expressed in tomato plants with native miraculin. *Plant Biotechnol* 18:1023-1027
- Kámán-Tóth E, Pogány M, Dankó T, Sztatmári Á, Bozsó Z (2018) A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. *3 Biotech* 8:148-153
- Kant R (2005). Sweet proteins—potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr J* 4:5-10
- Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur Y, Bang JW, Kwak SS (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51:831-838
- Kurihara Y (1992) Characteristics of antisweet substances, sweet proteins, and sweetness-inducing proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:231-252
- Kurihara Y (1997) Structures and activities of sweetness-inducing substances (miraculin, curculin, strogin) and the heat-stable sweet protein, mabinlin. *FFI J Jpn* 174:67-74
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee YR, Akter S, Lee IH, Jung YJ, Park SY, Cho YG, Kang KK, Jung YJ (2018) Stable expression of brazzein protein, a new type of alternative sweetener in transgenic rice. *J Plant Biotechnol* 45:63-70
- Ming D and Hellekant G (1994) Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS lett* 355:106-108
- Park YJ, Han JE, Lee H, Jung YJ, Murthy HN, Park SY (2020) Large-scale production of recombinant miraculin protein in transgenic carrot callus suspension cultures using air-lift bioreactors. *Amb expr* 10:140-146
- Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, Gilmore R (2009) Cotranslational and posttranslational *N*-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* 136:272-283
- Shirasuka Y, Nakajima KI, Asakura T, Yamashita H, Yamamoto A, Hata S, Nagata S, Abo M, Sorimachi H, Abe K (2004) Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1403-1407
- Shrimal S, Cherepanova NA, Gilmore R (2015) Cotranslational and posttranslational *N*-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Sem Cell Dev Biol* 41:71-78
- Sun HJ, Cui ML, Ma B, Ezura H (2006) Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS lett* 580:620-626
- Sun HJ, Kataoka H, Yano M, Ezura H (2007) Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. *J Plant Biotechnol* 5:768-777
- Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajo S, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y (1989) Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem* 264:6655-6659
- Theerasilp S, Kurihara Y (1988) Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit. *J Biol Chem* 263:11536-11539
- Yoshida K, Shinmyo A (2000) Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *J Biosci Bioeng* 90:353-362