

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

• 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지, 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 <u>이용허락규약(Legal Code)</u>을 미해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer 🖵





2008年度 2月 博士學位論文

Development of Recombinant Protein Production System Using Mushroom

朝鮮大學校大學院

生命工學科

金 承

Development of Recombinant Protein Production System Using Mushroom

버섯을 이용한 재조합 단백질 생산시스템 개발

2008年2月25日

朝鮮大學校大學院

生命工學科

金 承

Development of Recombinant Protein Production System Using Mushroom

指導教授 金 成 俊

이 論文을 理學博士學位 申請論文으로 제출함

2007年10月

朝鮮大學校大學院

生命工學科

金 承

金承의 博士學位論文을 認准함.

委員	員長 朝無	并大學校	教授	印
委	員 朝魚	并大學校	教授	印
委	員 朝魚	并大學校	教授	印
委	員 ㈜	개러스	所長	印
委	員 朝魚	并大學校	教授	印

2007 年 12 月 日

朝鮮大學校大學院

목 차

LIST OF	TABLES	iv
LIST OF	FIGURES	v
ABBRE	VIATIONS	ix
ABSTRA	ACT	xi
I. 서론		1
Ⅱ. 재료	및 방법	13
II – 1	균주 및 유전자	13
11 -2		13
11 –3	Vector construction	15
11 -4	Agrobacterium 형질전환체 제작	15
11 –5	Mushroom transformation by vacuum infiltration	16
II -6	Mushroom transformation by particle bombardment	16
11 –7	정질전환체 선별	20
II –8	GUS 활성의 조직화학적 분석	20
11 –9	형질전환체의 재분화	21
II – 1	0 형질전환 균사체 액체배양	21
II – 1	1 Genomic DNA 분리	21
II – 1	2 PCR을 통한 유전자 도입 확인	22

	II - 13	Southern blot analysis	22
	II - 14	Total RNA 분리 및 cDNA 합성	23
	II – 15	PCR 및 northern blot analysis	23
	II – 16	형질전환 균사체의 단백질 분리	24
	II – 17	단백질 발현 및 정량	24
	II – 18	Western blot analysis	24
III.	결과		26
	III <i>-</i> 1	재조합 hGH2 유전자 발현벡터 제작	26
	III-2	재조합 <i>h</i> lL32 유전자 발현벡터 제작	26
	III-3	재조합 유전자의 Agrobacterium 형질전환	33
	III <i>-</i> 4	GUS 유전자의 조직화학적 분석	33
	III <i>-</i> 5	<i>Agrobacterium</i> vacuum infiltration에 의한 형질전환	33
	III-6	Particle bombardment에 의한 형질전환	38
	III <i>-</i> 7	형질전환 균사체의 유전자 도입 확인	38
	III-8	Southern 분석	48
	III <i>-</i> 9	cDNA를 이용한 PCR 분석	48
	III - 10	Northern 분석	48
	III – 1 1	Western 분석	55
IV.	고찰		62
	IV-1	재조합 유전자 발현벡터 제작	62
	IV-2	재조합 유전자의 버섯형질전환	62
	IV-3	재조합 유전자 형질전환체 분석 및 재조합 단백질 발현	63

V. 적요	65
VI. 참고문헌	68
감사의 글	84

LIST OF TABLES

Table	1. Comparison	of expression	systems	for recombinant	proteins
	product			•••••	3
Table	2. List of primers	used for PCR			14

LIST OF FIGURES

Fig. I.	Global market of protein products2
Fig. 2.	Comparison of various expression systems 4
Fig. 3.	Vacuum infiltration process for A. tumefaciens - mediated
	transformation
Fig. 4. F	ruiting body tissue of <i>Pleurotus eryngii</i> for particle bombardment.18
Fig. 5.	Particle bombardment system
Fig. 6.	The plasmid map of the constructed pCambia1304 expressing
	<i>h</i> GH2 gene27
Fig. 7.	Identification of the constructed pCambia1304 containing hGH2
	gene, after transformation into <i>E. coli.</i>
Fig. 8.	PCR detection of the hGH from transformed E. coli using
	the primer combination
Fig. 9.	Construction of hIL32 gene expressing pCambia1304 vector 30
Fig. 10.	Identification of the constructed pCambia1304 containing hL32
	gene, after transformation into <i>E. coli.</i>
Fig. 11.	PCR detection of the hL32 from transformed E. coli using
	the primer combination
Fig. 12.	PCR detection of the hGH from transformed A. tumefaciens
	using the primer combination34

Fig. 13. PCR detection of the hlL32 from transformed A. tumefaciens
using the primer combination35
Fig. 14. Gus Histochemical result of transformation assay after vacuum
infiltration 36
Fig. 15. Gus specific activity of <i>Pleurotus eryngii</i> tissues after vacuum infiltration
Fig. 16. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of <i>Pleurotus eryngii</i>
rieulolus elyligii
Fig. 17. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of
Pleurotus eryngii40
Fig. 18. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of
Pleurotus eryngii41
Fig. 19. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of
Pleurotus eryngii42
Fig. 20. PCR analysis of genomic DNA isolated from transformants
(hGH2) of Pleurotus eryngii44
Fig. 21. PCR screening of genomic DNA samples from regenerated
mushroom (hL32) after Agrobacterium-mediated transformation44
Fig. 22. PCR analysis of genomic DNA isolated from transformants
(hGH2) of Pleurotus eryngii46
Fig. 23. PCR screening of genomic DNA samples from regenerated
mushroom (//lL32) after particle bombardment transformation 47

Fig. 24. Southern blot analysis of transformants (hGH2) of Pleurotus eryngii
using Agrobacterium vacuum infiltration and particle
bombardment49
Fig. 25. Southern blot analysis of transformants (hL32) of Pleurotus eryngii
using Agrobacterium vacuum infiltration and particle
bombardment50
Fig. 26. PCR detection of hGH2 in transformed Pleurotus eryngii 53
Fig. 27. PCR detection of hL32 in transformed Pleurotus eryngii 54
Fig. 28. PCR detection of hGH2 in transformed Pleurotus eryngii 55
Fig. 27. PCR detection of hL32 in transformed Pleurotus eryngii 56
Fig. 30. Northern blot analysis of transformant (hGH2) of Pleurotus eryngii
using Agrobacterium vacuum infiltration and particle
bombardment57
Fig. 31. Northern blot analysis of transformant (AL32) of Pleurotus eryngii
using Agrobacterium vacuum infiltration and particle
bombardment58
Fig. 32. Western blot analysis of transformant (hGH2) of Pleurotus eryngii
using <i>Agrobacterium</i> vacuum infiltration 59
Fig. 33. Western blot analysis of transformant (hlL32) of Pleurotus eryngii
using Agrobacterium vacuum infiltration 60
Fig. 34. Western blot analysis of transformant (hGH2) of Pleurotus eryngii
using particle bombardment61

Fig.	35.	Western	blot analysis	of transformant	(/dL32) of	Pleurotus	eryngii
		using	particle bomb	ardment			62

ABBREVIATIONS

BSA Bovine Serum Albumin

GRAS Generally Recognized As Safe

hGH Human Growth Hormone

hIL Human Interleukin

DEPC Diethylpyrocarbonate

E. coli Escherichia coli

EDTA Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

EtBr Ethidium Bromide

NK Natural Killer

IFN Interferon

TNF Tumor Necrosis Factor

OD Optical Density

NF Neurofibromatosis

PAGE Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PCR Polymerase Chain Reaction

PDA Potato Dextrose Agar

PDB Potato Dextrose Broth

MAPK Mitogen Aactivated Protein Kinases

PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells

GFP Green Fluorescent Protein

PVDF Polyvinylidine difluoride

GUS β -glucuronidase

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

GHRH GH Releasing Hormone

TCA Trichloroacetic acid

TEMED N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine

HAS Human Serum Albumin

CTAB Cetyltrimethylammonium bromide

RA Rheumatoid Arthritis

ABSTRACT

Development of Recombinant Protein Production System using Mushroom

Kim, Seung

Advisor: Prof. Kim, Sung-Jun, Ph. D.

Department of Biotechnology,

Graduate School of Chosun University

The advent of recombinant protein production technology has led to a worldwide zeal for the development of protein pharmaceuticals in the past two decades. These protein pharmaceuticals or pharmaceutical candidates include functional regulators and supplements, enzyme activators and inhibitors, polyclonal and monoclonal antibodies, and various vaccines. In comparison with small chemical drugs, protein pharmaceuticals have high specificity and activity at relatively low concentrations. These features have made protein pharmaceuticals indispensable for combating human diseases. Human GH (hGH) has been available over 40 years for the treatment of children with GH deficiency. Human growth hormone (hGH) is mainly produced in the somatotrophic cells of the

хi

pituitary in brain and is the product of the GH-N gene. The most prominent effects of GH include promoting growth and having protein anabolic and lipolytic effects. As unlimited supplies of recombinant GH became available in 1985, it has been possible to investigate the metabolic effects of GH rather than just its well characterized growth-promoting effects. Recombinant human growth hormone is anabolic and enhances immune functions. Aside from its growth stimulation effects, hGH has been considered as a possible therapeutic agent for the treatment of the frailty associated with aging, osteoporosis, morbid obesity, cardiac failure, major thermal injury, and a variety of other acute and chronic catabolic conditions. IL-32, originally named NK cell transcript 4 (NK4), is the latest described inflammatory cytokine. Its transcripts are highly expressed in immune tissues. It is produced mainly by mitogen-activated lymphocytes, IFN-y activated eCs, IL-12, IL-18 and IL-32-activated NK cells, and IL-18 gene transfected cells. IL-32 promotes a number of proinflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-8, and MIP-2 in different cells. Human recombinant IL-32 induces the production of large amounts of several proinflammatory cytokines and chemokines, even in macrophage cell lines by activation of NF-κB and MAPK. The ability of IL-32 to potentiate inflammation is not the sole action of this cytokine. IL-32 stimulates prostaglandin (PG)E2 in human PBMCs, which are pivotal in inflammation. This indicates that IL-32 contributes to the mediation of cartilage and bone destruction

in Rheumatoid Arthritis (RA). Therefore, IL-32 antibody may be effective to treat these diseases by virtue of its anti-inflammatory and probably analgesic properties. Among the edible mushrooms, the king oyster mushroom (Pleurotus eryngii) is one of the most popular mushrooms in Asia, Europe and North America. The increasing popularity of *P. eryngii* among consumers is due to its flavor, texture and shelf life. Commercial production of this species began in Italy in the mid 1970s and is produced in over a dozen other countries. Mushrooms have been used for the diet in many countries due to their good taste and nutritive value. Bioactive molecules have been isolated from mushrooms including lectin, nucleases, proteases, ribosome-inactivating proteins, ubiquitin-like protein, polysaccharides and polysaccharide-peptide and polysaccharide protein complexes. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of fungi was first reported in 1995. Further developments in Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of fungi have taken place and several studies continued to optimize the technology. This study suggests a modified Agrobacterium-mediated method for efficient transformation of hGH2 and hIL32the in Pleurotus eryngii. The binary vector, pCambia1304 was used for the initial transformation transformants were selected by expression of and selectable markers, such as hygromycin phosphotransferase gene (hygromycin resistance), β-glucuronidase (GUS) and Green Fluorescent Protein (GFP).

Infiltrated samples transformed with pCambia1304 showed a wider GUS response than the co-cultivated in the $50\mu g/ml$ hygromycin and cefotaxim selection medium. Transformants appeared at the margins of the tissue pieces after 9 to 14 days on selection medium. Particle bombardment offered another approach to improve Agrobacterium tumefaciens mediated transformation through the causing of micro wounds and the delivery of Agrobacterium deep into the target tissue. Also particle bombardment method had advantage to obtain transformants without use of antibiotics, cefotaxim. In particle bombardment, DNA was bound to 0.6μm gold particle on the tip of microcarriers. The macrocarrier is accelerated through a barrel towards the target tissue by hellum gas shock of 1,300 psi pressure. And then, the transformants were selected in the medium containing 50 $\mu g/m\ell$ hygromycin. Transformants appeared at the margins of the tissue pieces after 7 to 10 days on selection medium. From both infiltration and particle bombardment methods, 13 putative transformants were screened. Transformants PCR analyses confirmed that the hGH2 and hIL32 gene was into the genome of *Pleurotus eryngii*. Expression of the transgenes was confirmed by GUS staining, Southern hybridization, Northern hybridization and Western blot analysis. Both transformation techniques described herein provide a practical method for using transgenic technology in the genetic improvement of this commercially important mushroom and represents an important tool for the molecular genetic analysis of biological processes in this species. Also, through the development of mushroom-contained recombinant protein health foods, functional foods and pharmaceutical raw materials, this study final aims to make growing contributions to life science, focusing on cures for disease and maintenance and promotion of good health.

1. 서 론

바이오 신소재로 각광받고 있는 유용단백질 소재는 학문분야에서는 연구의 수단으로, 산업분야에서는 기술개발의 도구 및 최종 제품으로 정차 그 활용 폭을 확대해 나가고 있으며, 여러 산업들에 파급효과가 매우커서, 국가 산업 측면에서 중요성이 부각되고 있다. 산업자원부의 산업기술개발 사업보고서에 의하면 단백질 제품의 세계 시장 규모는 1997년 188억 달러에서 2001년에 2 배에 달하는 363억 달러가 되었고, 이후 지속적인 성장을 거듭하여 2011년에는 1,100억 달러에 이를 것으로 추산되어진다 (Fig. 1). 이중 산업용 단백질에 비해 의약용 단백질이 차지하는 비중은 계속 커져서 2011년에는 4 배가 넘는 수준이 될 것으로 예상되어진다. 특히, 의약용 단백질은 바이오산업의 40% 이상을 차지하며 황금알을 낳는 고부가가치의 산업으로 전 세계적으로 100개 이상의 다국적기업이 참여하고 있는 것으로 보고 되어지고 있다(고, et al., 2004; 구, et al., 2005; 산자부 보고서., 2006; 산자부 보고서., 2006; 산자부 보고서., 2006)

의약용 단백질 또는 산업용 효소의 경제적인 생산을 위해 이들 단백질을 효과적으로 생산할 수 있는 숙주 또는 재조합 시스템의 선정은 생산성, 생산된 단백질의 활성 여부 및 이후 모든 공정에 영향을 미친다는 측면에서 매우 신중히 고려되어야 한다. 현재 주로 이용되고 있는 외래단백질 생산 숙주로는 대장균(*Escherichia coli*)을 비롯하여, 그람 양성세균, 효모(yeast), 곰팡이, 곤충 세포(insect cell) 그리고 동·식물 또는 그들의 세포 등이 있다(Baneyx, et al., 1999; Seo, et al., 1995; Georgiou, et al., 1995; Hockney, et al., 1994). 대표적인 발현 시스템으로는 대장균

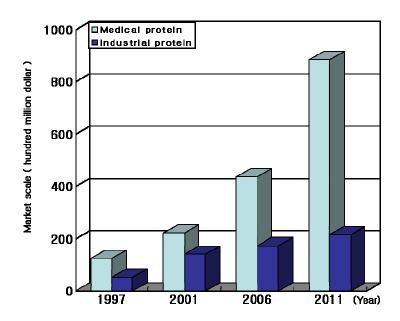


Fig. 1. Global market of protein products.

Table 1. Comparison of expression systems for recombinant protein products.

Characteristics	E. coli	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
Cell growth	Rapid(30 min)	Rapid(90 min)	Slow(18-24 h)	Slow(24 h)
Complexity of growth medium	minimum	minimum	complex	complex
Cost of growth medium	low	low	high	high
Expression level	high	Low-high	Low-high	Low-moderate
Extracellular expression	Secretion to periplasm	Secretion to medium	Secretion to medium	Secretion to medium
Posttranslation al modifications Protein folding	refolding	Proper folding	Proper folding	Proper folding
N-linked alvcosvlation	none	High mannose	Simple,	complex

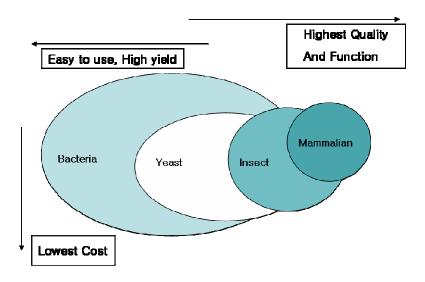


Fig. 2. Comparison of various expression systems.

이나 효모와 같은 미생물을 이용하거나 곤충세포, 동물세포를 이용하는 방법이 있는데 이들 발현 시스템은 각기 장단점을 가지고 있다(Table 1, Fig. 2). 미생물을 이용한 발현 시스템으로 널리 사용되어지고 있는 *E.* coli 의 경우 다양한 발현 시스템이 개발되어 있고, 외래 단백질의 발현 율 또한 매우 높으며 균체의 성장 속도가 빠른 점 등의 장점이 있다 (More JT et al., 1993). 그러나 인체 cytokine 등과 같은 고등생물 유래 의 단백질을 재조합 생산하고자 할 때 glycosylation 등과 같은 posttranslational modification이 불가능하며 배양배지로의 단백질 완전 분비 가 어렵고 disulfide bond가 많은 단백질의 경우 folding이 불가능하며 단백질 생산 형태에 있어서도 inclusion body와 같은 불용성 단백질 형태 로 생산되어 활성을 갖지 못하는 점 등의 단점이 있다(Makrides, et al., 1996). Mammalian cell 이나 insect cell의 경우에는 복잡한 인체 단백질 을 대부분 원형 생산이 가능하지만 단백질 생산 세포의 개발 기간이 길 고 배양 시간이 오래 걸리며 전반적인 생산비용이 비싼 단점이 있다. 반 면 진핵 미생물인 효모 Saccharomyces cerevisiae는 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로써 인체에 무해하며 유전자 조작이 편리하 고 여타의 미생물과 마찬가지로 다양한 발현시스템이 개발되어 있으며 비교적 적은 비용으로 세포의 대량 배양 및 단백질 생산이 가능하다. 또 한 인체 의약적으로 중요한 대부분의 단백질이 막단백질 혹은 당단백질 이기 때문에 활성을 갖기 위해서는 분비 과정을 통한 folding glycosylation이 필수적인데 효모 *S. cerevisie* 의 경우 발현된 단백질을 세포 밖으로 분비 할 수 있는 능력이 뛰어나며 glycosylation과 같은 pos-translation modification이 가능한 장점이 있다. 그러나 이러한 많은 장점에도 불구하고 효모를 이용한 인체단백질 분비시스템은 단백질의 종류에 따라 생산율 편차가 크다는 문제점을 가지고 있다. 예를 들어 HSA(Human Serum Albumin)의 경우 수g/L 수준이 분비 생산되지만 /nlL(Human Interleukin)의 경우 거의 분비 생산되지 않는 것으로 알려져 있다.

바이오 의약품 개발 초기에 Amgen, Chiron, Genentech 등 다수의 제약 회사에서 효모를 숙주로 사용하기 위한 많은 연구가 진행되었으나, 단백질 종류에 따라 분비가 불가능하거나 분비 생산성이 매우 낮은 문제점때문에 개발이 지연되고 왔고 결과적으로 미국과 유럽에서 효모를 이용한 단백질의약품의 생산 예는 다른 발현시스템에 비하여 상대적으로 적은 편이다(Walsh, *et al.*, 2000).

이러한 여러가지 문제로 인하여 현재 새로운 생물 공장의 필요성이 대두 되고 있으며, 그 중에서 시도 되어지고 있는 미생물이 담자균류 (Basidiomycetes) 즉, 버섯(Mushroom)을 이용한 단백질 생산 시스템을 개발하는 것이다. 그러나 현재까지 버섯을 이용한 연구로는 양송이버섯을 이용한 hygromycin B phosphotransferase (hph) 유전자, EGFP (enhanced green fluorescent protein) 유전자의 형질전환연구(Chen, et al., 2000; Vander, et al., 1996; C. Burns et al., 2005) 및 느타리버섯 (Sunagawa, et al., 2002; Irie, et al., 2001; Honda, et al., 2000) 팽이버섯(Kuo, et al., 2004; Nakai, et al., 2000), 표고버섯(Irie, et al., 2003; Lugones, et al., 1999; Sato, et al., 1998), 재먹물버섯(Kikuchi, et al.,

2004; Yaver, et al., 1999; Ogawa, et al., 1998; Granado, et al., 1997; Binninger, et al., 1991)을 이용한 유전자 클로닝의 시도가 전부라 할 수 있을 만큼 연구범위가 한정적이고 상업적으로 이용 가능한 실용적인 단백질 생산에 관한 연구는 아직까지 이루어지지 않고 있다.

전통적으로 버섯은 식용 및 약용식품으로 여겨져 왔으며, 그로 인해 분자생물학적 연구가 많이 진행되지 못한 것은 부정할 수 없는 현실이다. 버섯은 분류학상으로 고등균류 중 진균류(Eumycetes)에 속하며, 대부분은 담자균류에 속한다(Lee, et al., 1992) 이러한 버섯은 독특한 맛과 향이 뛰어나 기호성이 높은 식품으로 이용되어져 왔고, 당질, 단백질, 비타민, 아미노산, 무기질 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양소를 골고루 함유하고 있으며, 광범위한 약리 작용도 나타내므로 예로부터 전통식품 및민간약의 제제로서 널리 이용되어져 왔을 뿐만 아니라 항암활성, 면역증강 등의 효능작용 때문에 최근에는 기능성 식품 및 의약품 소재로 많이이용되고 있다(Choi, 2000; Lee, et al., 2001; R, et al., 2008; Shu-Yao, et al., 2007; Cheuk-Lun, et al., 2006; B. Grinde, et al., 2006; Lillian, et al., 2007, Eun Jae, et al., 2006; Akindahunsi, et al., 2006).

본 연구에서 재조합 단백질 생산을 위한 미생물로 사용되어진 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)은 프랑스, 이탈리아, 체코, 헝가리 및 러시아등의 유럽 남부지역, 중앙아시아, 아프리카 북부와 아메리카 등의 주로아열대 건조 목초지 토양에 단생 또는 군생하고 있다(Park, *et al.*, 1993; Komatsu, *et al.*, 1969; Dermar, 1974; Zadrazil, 1974). 큰느타리버섯은 분류학적으로 담자균아문(*Basidiomycotina*), 주름버섯목(*Agaricales*), 느

타리버섯과(*Pleurotaceae*), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하는 식용버섯이다(Rajarathnam, *et al.*, 1987; Hilber, 1989; Boekhout, 1990; Eger, 1987). 이 버섯은 육질이 치밀하여 씹는 맛이 자연송이와 비슷하고, 일반느타리버섯에 비해 대가 굵고 길며 저장성이 좋아 유럽에서도 "초원의 꿀맛버섯"(Vasilkov, 1995) 또는 "King oyster mushroom"(A. Teichmann *et al.*, 2007; Domondon, *et al.*, 2004; Dermar, 1974)이라 하여 대중적 인기가높다. 우리나라에서는 야생으로 채집된 기록은 없으나, 1997년경부터 인공재배된 것이 "새송이"라는 상품명으로 시판되어 그 인기가 급증하고있으나, 큰느타리버섯의 기능성 및 기타 메커니즘에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다(Kim, *et al.*, 1997).

본 논문에서 의약품 및 기능성 식품용 단백질로 선택한 성장호르몬 (GH: growth hormone)은 체내에서 성장을 촉진하는 호르몬으로 사람의 뇌하수체 전엽에서 분비되며, 뼈와 연골 등의 성장을 촉진시키고 단백질 합성 및 저장된 지방 분해를 촉진하고 단백질, 지방의 신진대사 활동에 직접 작용하여 골격 및 내장의 성장속도를 조절하는 물질을 말한다(Feld, et al., 1996; Florini, et al., 1996; Knudtzon, et al., 1989). 성장호르몬은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 인체 성장에 중요한 역할을 하는 호르몬 (Underwood LE., 1985) 으로 혈중에서 대부분은 분자량이 22kDa 형태로 발견되나 일부분은 분자량이 20kDa의 형태로 존재한다. 또한, 성장호르몬은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 펩타이드 호르몬으로써 뇌하수체보다 더 위 쪽의 뇌에서 조절과 제어를 받고 있는데 시상하부(hypothalamus)가 그것이다. 시상하부에서는 성장호르몬 방출 호르몬(GH releasing

hormone; GHRH)을 분비하여 성장호르몬을 가극하고 소마토스타틴 (somatostatin; SRIF)으로 억제하는데, 성장호르몬은 191개의 아미노산으 로 구성된 큰 분자로 거의 단백질에 가까운 호르몬이다(Raben, 1962; Rosen, *et al.*, 1990; Toogood, *et al.*, 1996) 성장 호르몬의 분비량은 연 령에 따라 차이를 보이는데 유아기 때는 분비량이 많지 않으나 나이가 들면서 인체 성장과 더불어 분비량이 증가하게 되고 사춘기에 이르러서 는 분비량이 최대치에 이른다. 인체 성장이 멈추게 되면 개인 차이는 있 으나 대개 30대를 지나면서 성장호르몬의 분비량은 서서히 감소하게 되 며 노인의 경우 성장 호르몬의 분비량이 현저히 감소하고 인체의 노화현 상이 뚜렷이 나타나게 된다(Rudman, *et al*., 1991). 또한 대장균과 효모 에서 생산이 되지 않거나 그 생산량이 극히 제한적인interleukin-32(JL32) 는 (Makrides, *et al.*, 1996; Walsh, *et al.*, 2000) TNFα (Tumor Necrosis Factor)의 발현을 유도하는 신규인체 싸이토카인으로서 항암 및 항자가면 역 질환 치료용 신약 또는 신약 타겟으로 알려져 있다. 현재까지 기능과 구조가 구체적으로 밝혀지지 않았지만 IL-32는 조직에 따라서 IL-32α, IL-32β, IL-32γ 및 IL-32δ의 4종으로 발견되고 있으며 IL-32α, IL-32β, 및 IL-32δ의 경우 인체 NK (Natural killer) cell로부터 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 을 통해 분리되었으며 IL-32ɣ 의 경우 이미 NK4의 전사체로서 보고된바 있다. IL-32는 PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)-differentiiated THP-1 cell에서 투여량에 따라 TNFα와 interleukin의 발현을 증가시키는 TNFa의 inducing factor 로서의 기능을 한다. 또한 raw macrephage cell에서 TNFa와 MIP (Macrophage Inflammatory Protein)-2의 유도체 역할을 하는 것으로 보고 되었다 (Soo-Hyun, et al., 2005; Joosten, et al., 2006; Novick, et al., 2006; Netea, et al., 2005; Lanzilli, et al., 2005; Castellani, et al., 2006; Castellani, et al., 2006; Emporiadou, et al., 2005; Olmos, et al., 2006).

본 연구에서는 지금까지 언급한 성장 호르몬과 신규 인체 싸이토카인 생산시스템을 개발하고자 새로운 생물공장으로 이용가능성이 높은 버섯 을 이용하였으며, 식물 등에 많이 쓰이는 형질전환방법을 버섯에 맞게 응 용하여 이용하였다. 형질전환방법으로는 *Agrobacterium tumefaciens* 의 Ti plasmid를 매개로 하거나(Bundock, et al., 1999; Bundock, et al., 2002; Piers, *et al*., 1996; Abuodeh, *et al*., 2000; Dunn-Coleman, *et al*., 1998; Gouka, et al., 1999; . Hanif, et al., 2002; Malonek, et al., 2001; Mikosch, *et al.*, 2001; Mullins, *et al.*, 2001; Pardo, *et al.*, 2002) 버섯조 직에 직접 유전자를 도입하는 Particle bombardment 방법(Sanford, *et al*., 1987; Heiser, 1994; Boileau, *et al.*, 1999; Wakita, *et al.*, 1998; Zeef, *et* al., 2000; Schillberg, et al., 2000; Bills, et al., 1995; Fungaro, et al., 1995; Moor, *et al.*, 1995)등이 사용되고 있다. 형질전환의 선발표지 유전 자로는 neomycin phosphotransferase (NPT 11), hygromycin phosphotransferase (hpt), aminoglycoside adenyltransferase (aadA), phosphinothricin acetyltransferase 등이 널리 사용되고 있다(Jefferson, et al., 1987; Zoubenko, et al., 1994; Bayer, et al., 1972). 한편 표지유전 자로는 β-glucuronidase (GUS) 유전자, GFP (Green fluorescent protein) 등이 이용되고 있는데 GUS유전자는 기존에 사용된 chloramphenicol

acetyltransferase (CAT)에 비해 정량이 비교적 용이하고, 세포 혹은 조직 간의 유전자 발현의 차이를 구별할 수 있게 하는 이점을 준다(Jefferson, *et al.*, 1987).

생산량이 한정된 호르몬, 항체, 백신 및 생체기능성 단백질과 같은 유 용 단백질을 미생물 숙주세포에서 대량 생산하여 의약품으로 개발하는 재조합 단백질 의약품 생산기술은 미생물을 세포공장(cell factory)으로 활용하는 대표적인 미생물 이용기술로 부상되었다. 더욱이 인류의 보건 복지가 향상됨에 따라 난치성 질환의 치료를 위한 고순도의 단백질성 의 약품에 대한 수요가 기하급수적으로 증가되고 있어서 저렴한 비용으로 대량생산이 가능한 미생물 발현시스템을 이용한 재조합 의약품 생산기술 개발은 미래 의약산업의 성장에 크게 기여할 것으로 예측되고 있다. 또한 인간 게놈 프로젝트의 완성 이후 신약 개발을 위한 신규 단백질 수요가 폭발적으로 증가하며 단백질 구조 및 기능 분석을 위한 초고속 발현 시 스템에 대한 수요도 급증하고 있는 상황이다. 그러나 많은 경우, 의약품 으로 개발될 잠재성 높은 인체 유래의 단백질들은 기존 미생물 기반 발 현 기술로는 발현 효율이 매우 저조하므로 이들 난 발현 단백질 (difficult-to-express proteins) 관련 문제들을 해결하기 위한 혁신적인 개발의 필요성이 대두되고 있으며, 의약용 단백질의 기술 translational modification은 치료 효능, 체내 안정성 및 면역 부작용 등 에 중요한 영향을 미친다는 사실이 알려지면서. 생산량(quantity) 보다 원 형 단백질과 동일하거나 그 이상의 품질(quality)을 지닌 단백질을 생산할 수 있는 기술의 개발이 중요해지고 있는 실정이다. 또한, 미생물 활용 재 조합 의약용 단백질 개발 분야의 경우 생산기술의 근간이 되는 신규 고발현 시스템 개발, 유전체 정보 기반의 고기능 숙주세포 재설계, 고성능생산균주의 대량 배양에 관한 분자생물공정 기술 개발 등이 국제시장 개방과 함께 국가 경쟁력 강화를 위한 중요한 분야로 대두되고 있다.

이에 본 연구에서는 기존에 식물의 형질전환방법으로 주로 사용되어 져 왔던 *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation 방법과 Particle bombardment 방법을 버섯에 접목하여 인간 유용단백질을 생산할 수 있는 새로운 버섯형질전환 시스템을 개발하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

Ⅱ-1. 균주 및 유전자

본 연구에서 사용된 균주는 *E. coli* DH5α와 *Agrobacterium tumafaciens* GV3101 를 사용하였으며, 균주의 증식을 위하여 사용된 배지로는 LB 배지(1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다. 또한 단백질발현 시스템개발을 위해 사용된 큰느타리버섯 (*Pleurotus eryngii*)의 자실체는 전북 김제에 소재한 송이농산으로부터 제공받아 사용하였다. 형질전환을 위해 사용된 유전자인 *h*GH2 와 *h*IL32는 한국생명공학연구원 21C Frontier Human Gene Bank 에서 구입하여 사용하였으며, pCambia1304 벡터는 BioForge 로부터 구입하여 사용하였다.

II-2. 시약 및 Primer 제작

Sodium dodecyl sulfate (SDS), Isopropanol, Chloroform, Ethanol, Kanamycin 등은 Sigma (U.S.A) 제품을 사용하였으며, DNA ligase, RNase 와 *Hin*d III, *Eco*RI, *Sma*I등과 같은 제한효소는 Promega (U.S.A) 제품을, Trizol™은 Invitrogen (U.S.A) 제품을, Plasmid DNA isolation kit, DNA gel elution kit는 Qiagen (U.S.A) 제품을, Acrylamide, Sodium chloride는 Amresco (U.S.A)제품을 구입하여 사용하였다. cDNA 합성 및 PCR을 하기 위하여 사용한 MMLV, dNTPs, Taq polymerase, DNA size marker와 primer는 Bioneer (Korea) 제품을 사용하였으며, 기타시약은 특급을 사용하였다. 벡터구축 및 버섯형질전환체의 삽입유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 실시한 PCR에 사용한 *h*GH2, *h*IL32 및 pCambia1304 의 primer는 제노텍에서 제작하여 사용하였다(Table 2).

Table 2. List of primers used for PCR.

Genes	Primer sequences	Nucleotides Position	PCR product	Gene reference
pCambia 1304	Forward :CCCAGGCTTTACACTTTAGT Reverse :CATAACTGAAGGCGGGAAAC	11453-11614	362 bp	AF234300
hGH2	Forward:ATTCCAACACCTTCCAACAG Reverse:AGCCCGTAGTTCTTGAGCAG	312-625	314 bp	BC020760
hIL32	Forward :GAAAGAGATGGATTACGGTG Reverse : GACAGAGAGCAGCAGAAAC	284-507	224 bp	BC018782

II -3. Vector construction

버섯에서 인간단백질 유전자를 발현시키기 위하여 식물형질전환 벡터로 많이 사용되는 pCambia1304 벡터를 이용하였다. 구입한 pDNR-LIB vector에 삽입 되어있던 hGH2는 Hind III 와 EcoR I 으로 절단하여 준비하고 pCambia1304 벡터 또한 같은 제한효소로 처리하여 ligation 후, E. coli DH5여에 형질전환하여 kanamycim 50㎏/៧ 농도의 배지에서 형성된 colony 를 배양 후 DNA를 분리하여 제한효소 처리 후 유전자 도입 여부를 확인하였다. pOTB7 vector 에 삽입 되어있는 hl32는 EcoR I 과 Sma I 으로 절단 후 위와 같은 방법으로 유전자 도입 및 벡터 구축을실시하였다. 또한 각 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여 kanamycin 함유배지에서 형질전환이 된 E. coli를 선별하여 kanamycim 50㎏/៧ 농도의 액체배지에서 배양한 뒤 DNA를 분리하여 제한효소 처리 및 각각의 primer를 이용한 PCR을 실시하여 벡터 구축여부를 최종 확인하였다.

Ⅱ-4. Agrobacterium 형질전환체 제작

Freeze-thaw법(An, et al., 1988)에 의하여 Agrobacterium tumafaciens GV3101 에 E. coli 에서 구축되어진 각각의 벡터를 도입시켰다. 50째 LB 배지에 Agrobacterium을 접종하여 28℃, 120rpm 조건으로 OD600 값이 0.5~1.0 이 될 때까지 진탕 배양한 후 얼음에 넣어 5분간 냉각시키고, 3,200rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 cell에 20Mm CaCl₂ 1째을 가하여 현탁하고, 여기에 미리 Qiagen minipreps kit로 분리해 놓은 각각의 DNA를 첨가하고 액체 질소에 넣어 급냉시킨 다음 37℃ 배양기에서 5분간 반응하였다. 반응 후 400ሥ의 LB 배지를 첨가하여 28℃에서 4시간 배양하였다. 배양액을 100 ሥ८/째 kanamycin이 함유된 LB 고체배지에 도말하여 28℃에서 배양하였다. 배양 후 48시간이 지난뒤 LB 고체배지에 형성된 colony를 100 ሥ८/째 kanamycin 함유 LB 액체배지에서 증식시켜 버섯 형질전환의 매개체로 사용하였다. 한편, Agrobacterium tumefaciens GV3101에 형질전환된 DNA의 도입여부를 확

인하기 위하여 선별배지에서 증식한 GV3101의 DNA를 분리하여 각각의 primer를 사용한 PCR 을 실시하여 유전자 도입여부를 최종 확인하였다.

II -5. Mushroom transformation by vacuum infiltration

재조합 DNA가 도입된 *Agrobacterium*을 LB배지에 접종하여 28℃, 120rpm 조건으로 48시간 배양하여 OD₆₀₀ 1.8~2.0까지 증식시킨 후 4600rpm 에서 30분간 원심분리하여 준비하였다. 준비된 *Agrobacterium* cell에 동량의 10Mm MgCl₂를 가하여 현탁한 후 다시 4600 rpm 에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리된 cell에 적정량의 10Mm MgCl₂를 가하여 최종적으로 OD₆₀₀ 1.0으로 조정하여 준비하였다. 송이농산으로부터 제공받은 큰느타리버섯은 자실체부분을 무균적으로 0.5x0.5㎝ 의 크기로 절단하여 준비하였다. 절단한 버섯조직을 OD₆₀₀ 1.0으로 조정하여 준비한 *Agrobacterium* 현탁액에 넣고 vacuum desiccator 에서 서서히 진공상태로 만들어 주면서 *Agrobacterium* 현탁액이 버섯조직에 충분히 침투되도록 약 15분동안 진공상태를 유지시켰다. 진공상태가 해제된 후 현탁액상부에 떠 있던 버섯조직이 밑으로 가라앉는 것을 확인하였다(Fig. 3).

II -6. Mushroom transformation by particle bombardment

송이농산으로부터 제공받은 큰느타리버섯을 무균적으로 0.2x0.2cm 크기로 잘게 잘라 LB 고체배지 중앙부에 평균직경 2.5cm 내에 20-25개 치상하여 준비한 후 bombardment용 재료로 사용하였다(Fig. 4). Bombardment 용 DNA 역시 *Agrobacterium* vacuum infiltration 때와 같은 DNA를 사용하였다. Particle bombardment 기기로는 Bio Rad 사의 'PDS-1000'(Fig. 5)을 사용하여 70cmHg의 진공상태에서 헬륨가스를 이용하여 bombarding 하였다(Heiser, 1992; Hilber, *et al.*, 1994; Johnston, *et al.*, 1988; Klein, *et al.*, 1988; Moore, *et al.*, 1995). Sanford 등 (Sanford, 1987)의 방법에 따라 60mg의 gold particle(직경: 0.6 pm)에

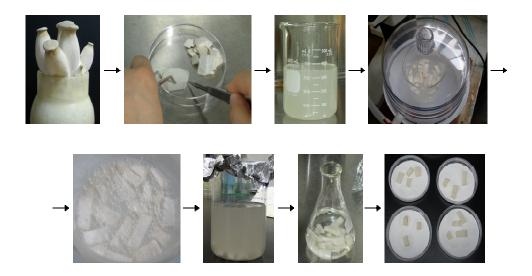


Fig. 3. Vacuum infiltration process for *A. tumefaciens*-mediated transformation.



Fig. 4. Fruiting body tissue of *Pleurotus eryngii* for particle bombardment.

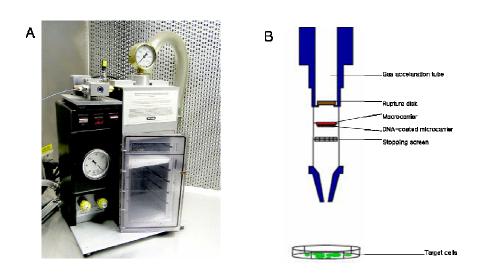


Fig. 5. Particle bombardment system.

A, The external appearances of Gene Gun. B, Schematic representation of the PDS-1000/He system.

DNA를 5μ 8/ μ 8 의 농도로 3.5M CaCl $_2$ 및 0.1M spermidine을 이용하여 코팅한 후, 6μ 8 입자 용액을 microcarrier 전면에 도말하여 건조한 후 1300psi 헬륨가스 압력으로 버섯조직과의 거리를 9cm로 조정한 후 bombarding 하였다.

Ⅱ-7. 형질전환체 선별

Agrobacterium vacuum infiltration을 실시한 후 버섯조직 표면에 남아 있는 Agrobacterium 현탁액을 제거하기 위하여 멸균된 3차 증류수로 3회 세척한 다음 멸균된 whatman No.2 filter paper 위에 15분간 방치하여 조직 표면에 남아있는 수분을 최대한 제거하였다(Fig. 3). 수분이 제거된 버섯조직을 Petri dish 에 parafilm으로 밀봉한 후 25℃에서 5~7일 동안암 배양하였다. 5~7일간의 암 배양이 끝난 후 버섯조직을 hygromycin 50㎏៧ 과 cefotaxim 50㎏៧에 이 함유되어 있는 selection medium 에옮겨 10일 동안 배양한 후 배지 표면위로 균사체가 형성되어진 형질전환체를 선별하였다. Particle bombardment 후 DNA가 bombarding 된 버섯조직을 멸균된 핀셋을 사용하여 hygromycin 50㎏៧에 이 함유되어 있는 selection medium 에옮겨 7일 동안 배양한 후 균사체가 형성되어진 형질전환체를 선별하였다.

Ⅱ-8. GUS 활성의 조직화학적 분석

GUS 활성의 조직화학적 분석은 Jfferson 등(Jefferson, *et al.*, 1987) 방법에 따라 실시하였다. 5~7일동안 25℃ 에서 1차 암 배양을 한 *Agrobacterium* infection 버섯조직의 일부를 임의로 선발하여 5-bromo-4-chloro-3-indoleglucuronide (X-Gluc, Duchefa, Netherland)가 포함된용액에 넣어 37℃에서 24시간 반응시킨 다음, 조직에 나타나는 청색의색깔로 GUS 발현 여부를 관찰하였다. 또한 대조구로 사용된 비형질전환큰느타리버섯의 조직도 같은 방법에 따라 GUS 활성의 조직화학적 분석을 실시하였다.

Ⅱ-9. 형질전환체의 재분화

Agrobacterium vacuum infiltration 방법과 particle bombardment 방법으로 형질전환 실시 후 각각의 selection medium 에서 성장한 형질전환 균사체를 hygromycin 50㎏៧ 이 함유된 LB 고체배지에 재 접종하여최종적으로 형질전환체를 선별하였으며, 순수분리한 형질전환체를 PDA (potato extract 20%, dextrose 2%, agar 1.5%) 배지에 보관하여 사용하였다.

Ⅱ-10. 형질전환 균사체 액체배양

각각의 형질전환 균사체 액체배양은 PDB (potato extract 20%, dextrose 2%)배지를 250째 플라스크에 100째씩 분주하여 121℃, 1.5기압에서 20분간 가압살균 후 배지를 조제하였다. 최종적으로 순수분리 선별된 균사체 선단을 백금이로 0.7㎝x0.7㎝씩 3부분을 절단하여 액체배지에 접종한 후, 진탕 배양기에서 25±1℃, 120 rpm으로 10일간 배양을 실시하였다.

II-11. Genomic DNA 분리

액체배양된 각각의 형질전환체로부터 genomic DNA 의 분리는 CTAB (Scott, et al., 1994)법을 변형하여 실시하였다. 시료 0.1g 을 액체질소로 급냉시킨 후 유발로 곱게 마쇄하였다. 여기에 700 № 의 genomic DNA extraction buffer [100mM Tris-HCI (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0), 10%SDS]를 가하여 잘 섞은 후 65℃에서 20 분간 반응시킨 후 13,000rpm 에서 15 분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 새로운 tube 에 옮겨 동량의 isopropanal 을 가하여 10 회 정도 inverting 하고, 얼음속에서 1 시간동안 방치하였다. 다시 13,000rpm 에서 10 분간 원심분리를 하고, 상등액을 버린 후 남아있는 pellet 을 70% EtOH 를

사용하여 2회 세척하였다. Clean bench 에서 15 분간 pellet 을 건조한 후 $30~\mu$ 의 멸균 증류수를 가하여 녹인 후 시료로 사용하였다.

Ⅱ-12. PCR을 통한 유전자 도입 확인

형질전환균사체의 재조합 DNA 도입여부를 확인하기 위하여 분리한 genomic DNA를 PCR법을 실시하여 확인하였다. 본 실험에 사용된 primer는 Table 2. 와 같이 제작하여 사용하였다. PCR은 Takara사의 PCR Thermal Cycler를 사용하였고, PCR 반응은 94℃에서 10분간 가열하여 DNA를 열 변성시키고 난 뒤 94℃에서 2분간 denaturing, 58.9℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 30초간 extension의 반응을 1회로 하여 35회반복한 뒤 70℃에서 7분간 반응시켰다. 이와 같이 반응하여 증폭된 생성물을 1.0% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 확인하였다.

II -13. Southern blot analysis

형질전환균사체의 재조합 DNA 삽입여부를 확인하기 위하여 southern blot (Southern, 1975)을 실시하였다. 형질전환균사체와 비형질전환균사체의 genomic DNA를 각각 *Hin*d III 와 *Eco*RI, *Sma*I과 *Eco*RI으로 절단하여 1.0% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. Southern blot을 위하여 gel은 100Mm HCl에 10분간 방치한 뒤 DNA 변성용액(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)에서 60분, DNA 중화용액(1M Tris pH 7.5, 1.5M NaCl)에서 60분 동안의 중화과정을 거친 후, DNA를 nitrocellulose filter paper로 흡착시키기 위하여 southern blot을 위한 장치를 하여 10시간 정도 실시하였다. 반응이 끝난 후 filter를 gel로부터 분리한 후 6x SSC에서 세척한뒤 80℃의 오븐에서 2시간 동안 고정시켰다. 이와 같이 blotting된 filter는 0.5M NaCl이 포함된 ECL detection system의 hybridization buffer에넣고 42℃에서 30분간 prehybridization하였다. Prehybridization 시킨 filter에 각각의 probe DNA를 넣고 42℃에서 12시간 이상을 반응시켰고,

반응이 끝난 filter는 primary wash buffer (6M urea, 0.4% SDS, 0.5% SSC)에 침지하여 20분씩 2회 세척한 다음, secondary wash buffer (2x SSC)로 실온에서 5분씩 2회 세척하였다. 세척이 끝난 filter에 ECL detection solution을 가하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 X-ray film에 현상하였다.

II-14. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

Total RNA를 분리하기 위하여 모든 시약과 초자기구류는 diethylpyrocar-bonate (DEPC)로 처리하였고, RNA는 TriZol™ reagent를 이용하여 분리하였다. 형질전환균사체 및 비형질전환균사체 50㎜을 막자 사발에 넣고 액체질소를 가하여 급냉시킨 후 막자를 이용하여 곱게 분쇄 하였다. 분쇄된 각각의 시료에 TriZol™ reagent 1㎖을 첨가하여 균질화한 후 0.2㎖ chloroform을 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 12.000rpm 으로 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후 0.5㎖의 isopropanol을 첨가하여 실온에서 15 분간 반응시켰다. 반응 후 12,000rpm 으로 4℃에서 10분간 원심분리하 여 얻은 침전물에 75% 에탄올 1째을 첨가하여 혼합한 후 7,500rpm 으 로 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 이 RNA pellet을 clean bench에서 건조시켰으며, RNase free-water에 녹여 purity를 측정한 후 -20℃에 보 관하여 cDNA 합성에 이용하였다. cDNA 합성을 위해 moloney murin leukemia virus (M-MLV) 및 oligo dT primer는 Bioneer 사로부터 구입하 였으며, 제조사로부터 제공되어진 매뉴얼에 따라 합성하였다.

II-15. PCR 및 northern blot analysis

형질전환균사체와 비형질전환균사체에서 분리한 RNA를 사용하여 합성한 cDNA를 이용하여 genomic DNA에서 유전자 도입 확인을 위해 사용한 방법과 동일하게 PCR을 수행하였다. 또한 PCR로 확인된 잠정적인각각의 형질전환체를 확인하기 위하여 northern blot을 실시 하였다. 분리

한 각각의 total RNA 30㎏을 65℃에서 변성시켜 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동 한 후 20X SSC 용액에서 나일론 membrane (Turboblotter, Schleicher & Schuell, U.S.A)에 옮기고 각각의 표지된 DNA probe를 이용하여 northern blot을 수행하였다.

Ⅱ-16. 형질전환 균사체의 단백질 분리

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

Ⅱ-17. 단백질 발현 및 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry (H. Lowry, *et al.*, 1951)등의 방법에 의한 BCA단백질정량 kit (Pierce, U.S.A)를 사용하여 측정하였으며 표준단백질은 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다.

II –18. Western blot analysis

단백질 수준에서의 hGH2, hIL32의 발현유무를 확인하기 위하여 각각의 antibody를 처리하여 분석하였다. 분리된 단백질을 12%의 separating gel과 stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 전기영동 하였다. SDS-PAGE 에서 전기영동된 단백질을 polyacrylamide gel로부터 PVDF (Polyvinylidene difluoride) membrane으로 transfer하기 위하여 PVDF membrane을 methanol에 담가 shaker 위에 올려 놓고 30분동안 흔들어 주었다. 30분간의 방치 후 transfer 완충용액(0.25 M Trizma base, 1.92 M glycine, 400㎖ methanol/L, pH 8.3)에서 15분간 반응 후 Bio-rad transfer kit를 이용하여 100V에서 90분간 transfer를 수행하였다. 또한 BSA를 농도가 3%가 되도록 TBST용액 (20mM Tris-HCI, pH 7.5, 137mM NaCI, 0.1% Tween20)에 녹여 blocking solution을 제조하여 transferred PVDF membrane을 담그고 한 시간 동안 shaker 위에 올려 놓고 흔들어 주었다. 한 시간 후 TBST 용액으로 15분씩 4회 세척한 후 1:1000 비율로 TBST 용액에 희석한 primary antibody로 4℃에서 12시간 처리 후 동일한 방법으로 15분씩 4회 세척한 후 1:1000의 비율로 TBST 용액에 희석한 secondary antibody 로 실온에서 3시간 처리하였다. Horseradish peroxidase conjugated (HRP) secondary antibody에 의한 반응을 확인하기 위하여 WEST-ZOL을 처리한 후 X-ray film에 감광하여 단백질 band를 확인하였다.

Ⅲ. 결과

Ⅲ-1. 재조합 *h*GH 유전자 발현벡터 제작

Ⅲ-2. 재조합 /nL32 유전자 발현벡터 제작

ML32 유전자를 가지고 있는 pOTB7 vector를 Smal, EcoR/로 절단하여 얻은 # ML32 유전자를 동일 한 효소로 처리한 pCambia1304 vertor에 ligation (Fig. 9)하여 kanamycin 함유 selection medium에서 배양시켜 형질전환체를 선별하였다. 선별된 형질전환체의 DNA를 분리하여 Smal, EcoR/로 절단하여 전기영동을 실시한 결과 Fig. 10과 같이 구입유전자를 처리했을 때와 동일한 1.2kb의 유전자를 확인할수 있었다. 또한 유전자의 형질전환 여부를 최종 확인하기 위하여 제작된 primer를 사용하여 cross primer PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 11과 같이 예상한 사이즈인 1.2kb 크기에서 밴드가 증폭됨을 확인할 수 있었다.

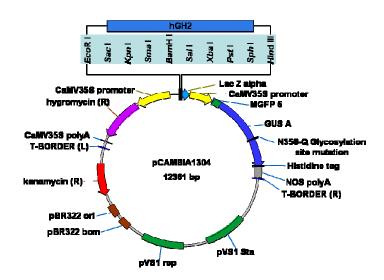


Fig. 6. The plasmid map of the constructed pCambia1304 expressing hGH2 gene.

pCambia1304 is 12361bp in size and consists of a pCambia1301 backbone containing the kanamycin resistance (R) gene and the right border (R/B) and left border (L/B) sequences of Agrobacterium T-DNA. The hygromycin resistance, MGFP and GUS A genes are located between the border sequences.

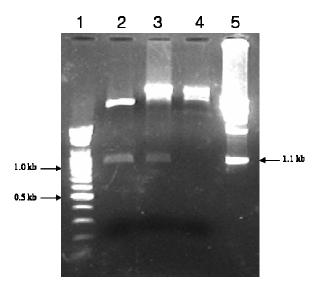


Fig. 7. Identification of the constructed pCambia1304 containing hGH2 gene, after transformation into E. coli.

Electrophoresis on 1% agarose of *HindIII* and *EcoR I* restriction enzyme digests of DNA of *E.coli* containing *h*GH2 gene. Lane 1. 100bp marker; Lane 2. Control (*h*GH2 digested by *Hind III* and *EcoR I*); Lane 3. Transformed DNA digested by *Hind III* and *EcoR I*; Lane 4. pCambia1304 DNA digested by *Hind III* and *EcoR I*; Lane 5. 1kb marker

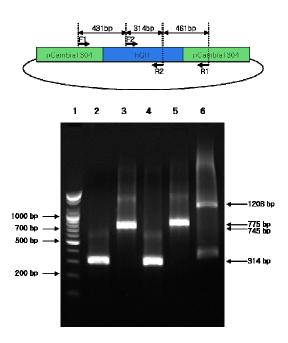


Fig. 8. PCR detection of the hGH from transformed E. coli using the primer combination.

Lane 1. 100bp Marker; Lane 2. control(hGH2) using primer F2, R2; Lane 3. transformed DNA using primer F1, R2; Lane 4. transformed DNA using primer F2, R2; Lane 5. transformed DNA using primer F2, R1; Lane 6. transformed DNA using primer F1, R1

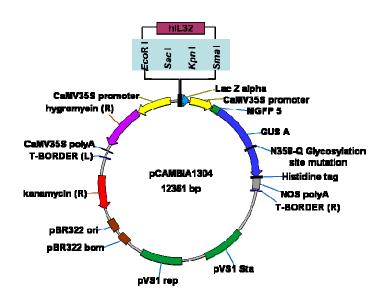


Fig. 9. Construction of hIL32 gene expressing pCambia1304 vector.

pCambia1304 is 12361bp in size and consists of a pCambia1301 backbone containing the kanamycin resistance (R) gene and the right border (R/B) and left border (L/B) sequences of *Agrobacterium* T-DNA. The hygromycin resistance, MGFP and GUS A genes are located between the border sequences.

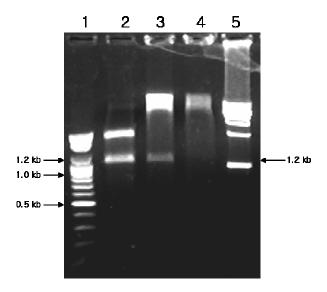


Fig. 10. Identification of the constructed pCambia1304 containing hL32 gene, after transformation into E. coli.

Electrophoresis on 1% agarose of *Sma |* and *EcoR |* restriction enzyme digests of DNA of *E.coli* containing *h*IL32 gene. Lane 1. 100bp marker; Lane 2. Control (*h*IL32 digested by *Sma |* and *EcoR |*); Lane 3. Transformed DNA digested by *Sma |* and *EcoR |*; Lane 4. pCambia1304 DNA digested by *Sma |* and *EcoR |*; Lane 5. 1kb marker

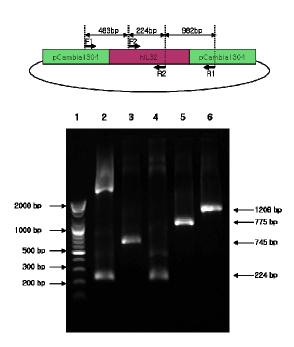


Fig. 11. PCR detection of the hL32 from transformed *E. coli* using the primer combination.

Lane 1. 100bp Marker; Lane 2. control(hlL32) using primer F2, R2; Lane 3. transformed DNA using primer F1, R2; Lane 4. transformed DNA using primer F2, R2; Lane 5. transformed DNA using primer F2, R1; Lane 6. transformed DNA using primer F1, R1

Ⅲ-3. 재조합 유전자의 Agrobacterium 형질전환

hGH2, hlL32 유전자를 버섯에 형질전환시켜 재조합 단백질생산 연구 를 수행하고자 형질전환용 벡터인 pCambia1304를 사용하였다. *E. coli* DH5α 에 도입된 재조합 균주의 plasmid DNA를 분리하여 Agrobacterium tumefaciens GV3101에 형질전환하였다. Kanamycin 저항 성을 나타낸 single colony를 배양하여 각각의 유전자 도입여부를 확인하 고자 *Agrobacterium* plasmid quick screen법(An, *et al.*, 1988) 에 의하여 DNA를 분리한 후 2쌍의 primer를 사용하여 cross primer PCR을 수행한 결과 Fig. 12, 13 과 같이 hGH2, hL32 유전자 제작 primer 사이즈인 314bp(*h*GH2), 224bp(*h*IL32)의 크기에서 밴드가 증폭되어짐이 확인되었 다.

Ⅲ-4. GUS 유전자의 조직화학적 분석

Agrobacterium vacuum infiltration 후 7 일동안 암 배양하여 배양조직체 일부를 임의적으로 선별하여 X-Glu 기질용액에 반응시켜 GUS 의 발현을 관찰하였다. 관찰 결과 Fig. 14 와 같이 hGH2 가 포함된 pCambia1304 벡터가 도입된 버섯의 조직에서 전체 또는 부분적으로 청색의 색깔이 보여지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 형질전환을 하지 않은 대조구로 쓰인 큰느타리버섯 조직의 색깔은 기질용액에 전혀 반응하지 않아 청색의 색깔이 나타나지 않았다. 또한 hIL32 유전자가 포함된 pCambia1304 벡터가 도입된 버섯의 경우도 Fig. 15 에서보여지듯이 hGH2 와 마찬가지로 X-Gluc 기질용액에 반응을 보여 색깔이 청색으로 변화였으며, 반면 대조구로 쓰인 비형질전환 버섯조직에서는 GUS 발현양상이 나타나지 않음을 확인 할 수 있었다.

Ⅲ-5. Agrobacterium vacuum infiltration 에 의한 형질전환

각각의 재조합 DNA 가 형질전환된 *Agrobacterium* 배양현탁액에 버섯의 조직을 vacuum infiltration 시켜서 버섯의 형질전환을 실시하였다.

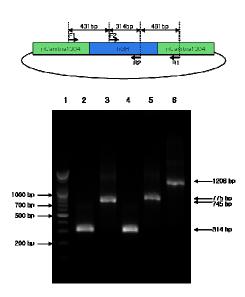


Fig. 12. PCR detection of the hGH from transformed A. tumefaciens using the primer combination.

Lane 1. 100bp Marker; Lane 2. control(hGH2) using primer F2, R2; Lane 3. transformed DNA using primer F1, R2; Lane 4. transformed DNA using primer F2, R2; Lane 5. transformed DNA using primer F2, R1; Lane 6. transformed DNA using primer F1, R1

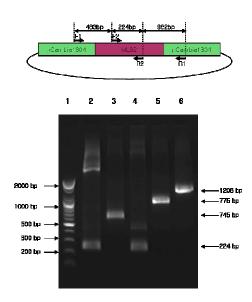


Fig. 13. PCR detection of the hlL32 from transformed A. tumefaciens using the primer combination.

Lane 1. 100bp Marker; Lane 2. control(hIL32) using primer F2, R2; Lane 3. transformed DNA using primer F1, R2; Lane 4. transformed DNA using primer F2, R2; Lane 5. transformed DNA using primer F2, R1; Lane 6. transformed DNA using primer F1, R1

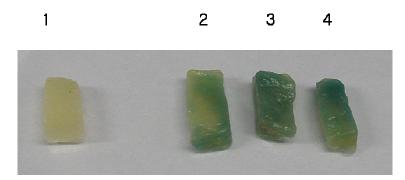


Fig. 14. Gus Histochemical result of transformation assay after vacuum infiltration.

Wild-type(1), transformed tissues($2\sim4$) with *A. tumefaciens* GV3101 bearing the vector pCambia1304 containing GH2 gene.

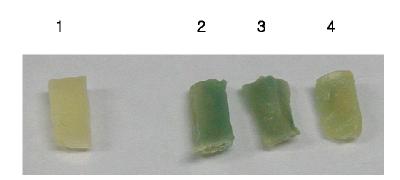


Fig. 15. Gus specific activity of *Pleurotus eryngii* tissues after vacuum infiltration.

Wild-type(1), transformed tissues($2\sim4$) with *A. tumefaciens* GV3101 bearing the vector pCambia1304 containing IL32 gene.

버섯조직 표면에 남아있던 과잉의 수분을 제거하고 petridish 에 담아 parafilm 으로 밀봉한 후 7 일동안 25℃ 암 조건에서 subculture 하였다. 1 차 배양이 끝난 버섯조직을 50 ા/8/ml hygromycin 과 50 1/8/ml cefotaxim 이 함유된 LB 고체배지에서 형질전환체 성장을 유도하였다. 형질 전환된 균사체를 유도한 결과 배양 10 일 후 비형질전환 버섯조직은 균사체 성장이 이루어지지 않았으나, 형질전환된 버섯조직은 선별배지 표면에서 균사체 성장이 이루어짐을 확인 할 수 있었다(Fig. 16, 17). 또한, 대조군으로 사용된 일반 큰느타리버섯의 조직은 항생제가함유된 배지에서 성장이 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다.

Ⅲ-6. Particle bombardment 에 의한 형질전환

형질전환체 선발유전자로 hygromycin resistance 유전자를 이용하기 위하여 50 년 hygromycin 이 함유되어 있는 LB 고체배지에 bombarding 한 버섯조직을 치상하여 7 일동안 암 배양한 후 형질전환 균사체 형성을 확인하였다. 배양 6 일 후부터 kanamycin 에 내성을보이는 형질전환체들은 버섯조직 위로 균사체를 형성하기 시작하였으나(Fig. 18, 19), Agrobacterium 형질전환과 마찬가지로형질전환이 이루어지지 못한 버섯조직에서는 hygromycin 항생제의영향으로 균사체 형성이 이루어지지 못하였음을 확인할 수 있었다. 1 차성장한 형질전환 균사체중 배지표면으로 균사체가 형성된 부분을절단하여 다시 50 년 hygromycin 이 포함된 LB 배지로 계대배양하여최종적으로 형질전환균사체를 순수분리하였다.

Ⅲ-7. 형질전환균사체의 유전자 도입 확인

버섯에 형질전환 되어진 새로운 재조합 DNA 의 삽입여부를 확인하기 위하여 hygromycin 항생제 배지에서 재분화시킨 버섯균사체의 일부를 취하여 PDB 배지에 배양하였다.

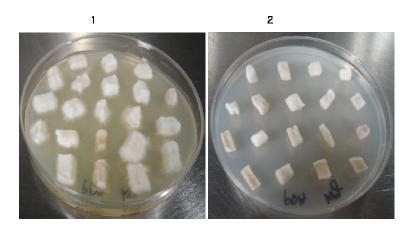


Fig. 16. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of *Pleurotus eryngii*.

Pieces of fruiting body tissue were co-cultivated with(1) and without(2) A. tumefaciens strain GV3101 carrying the vector pCambia1304 containing the GH2 gene. Shown is the appearance of the cultures after 10 days on PDA with hygromycin at 50 μ g/m ℓ .

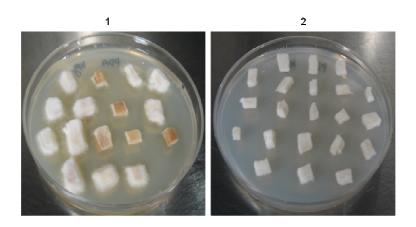


Fig. 17. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of *Pleurotus* eryngii.

Pieces of fruiting body tissue were co-cultivated with(1) and without(2) A. tumefaciens strain GV3101 carrying the vector pCambia1304 containing the IL32 gene. Shown is the appearance of the cultures after 10 days on PDA with hygromycin at 50 μ g/m ℓ .

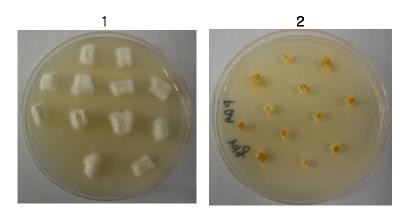


Fig. 18. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of *Pleurotus* eryngii.

Pieces of fruiting body tissue were co-cultivated with(1) and without(2) A. tumefaciens strain GV3101 carrying the vector pCambia1304 containing the GH2 gene. Shown is the appearance of the cultures after 10 days on PDA with hygromycin at 50 μ g/ml.

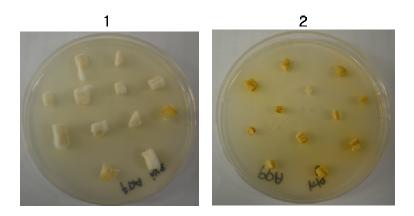


Fig. 19. Selection of putative hygromycin-resistant transformants of *Pleurotus* eryngii.

Pieces of fruiting body tissue were co-cultivated with(1) and without(2) A. tumefaciens strain GV3101 carrying the vector pCambia1304 containing the IL32 gene. Shown is the appearance of the cultures after 10 days on PDA with hygromycin at 50 μ g/m ℓ .

액체 배양된 균사체를 CTAB 법으로 genomic DNA 를 분리한 후, 각각의 primer 를 사용하여 PCR 을 실시한 후 1% agarose gel 에서 전기영동을 실시한 결과 Fig. 20, 21 과 같은 결과를 확인 할 수 있었다. 확인된 결과 유전자 증폭이 예상되었던 크기에 해당하는 314bp(hGH2), 224bp(hL32)의 제작된 primer 위치에서 밴드가 강하게 증폭되어짐을 확인하였다. 또한 형질전환시키지 않은 대조구의 큰느타리버섯 균사체 genomic DNA 에서는 DNA 의 증폭이 전혀 일어나지 않았다. 또한 bombarding 후 hygromycin selection 배지에서 1 차 선별하고, 그 중성장이 양호한 균사체를 선별하여 계대배양하여 보관한 균사체중 일부를 감자배지에 접종하여 균사체를 배양하였다. 배양된 균사체에서 genomic DNA 를 분리하여 유전자 각각의 primer 를 사용하여 삽입유전자 PCR 증폭을 수행한 결과 hGH2 의 경우 선별된 2 개체에서 전부 원하는 유전자 크기에 증폭이 이루어졌고, hL32 의 경우 선별된 4 개체중 3 개체에서 삽입유전자 증폭이 확인되었다(Fig. 22, 23).

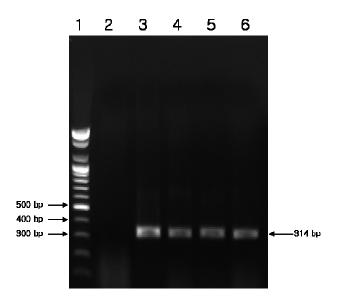


Fig. 20. PCR analysis of genomic DNA isolated from transformants (hGH2) of *Pleurotus eryngii*.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type), 3: Positive control with hGH2 gene, 4 to 6: Genomic DNA isolated from putative transformants mushroom.

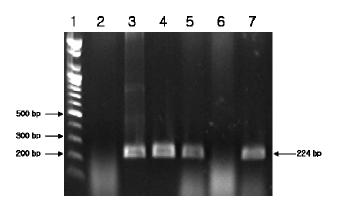


Fig. 21. PCR screening of genomic DNA samples from regenerated mushroom (hlL32) after *Agrobacterium*-mediated transformation.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type), 3: Positive control with hL32 gene, 4 to 7: Genomic DNA isolated from putative transformants mushroom

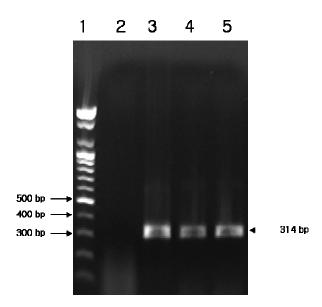


Fig. 22. PCR analysis of genomic DNA isolated from transformants (hGH2) of *Pleurotus eryngii*.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type) , 3: Positive control with $h\mathrm{GH2}$ gene, 4 to 5: Genomic DNA isolated from putative transformants mushroom.

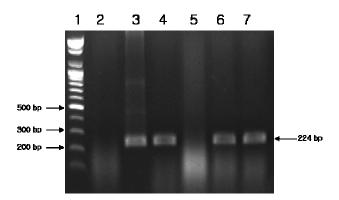


Fig. 23. PCR screening of genomic DNA samples from regenerated mushroom (hlL32) after particle bombardment transformation.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type), 3: Positive control with hL32 gene, 4 to 7: Genomic DNA isolated from putative transformants mushroom.

Ⅲ-8. Southern 분석

큰느타리버섯에 삽입된 각 유전자를 확인하기 위하여 각각의 방법에 의해 형질전환되어진 균사체를 대상으로 southern 분석을 하였다. PCR 로 외래 유전자의 도입이 확인된 hygromycin 저항성 균사체의 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후 각각의 유전자인 hGH2, hL32를 probe DNA로 사용하여 hybridization 시켰다. hGH2와 hL32 형질전환체 게놈 DNA를 각각 Hind III와 EcoRI, SmaI과 EcoRI으로 절단하여 hGH2, hL32를 probe DNA로 사용하여 hybridization 한 후 x-ray film에 감광한 결과 여러 다른 밴드 위치에서 특이적으로 반응하여 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 24, 25). 그러나 형질전환시키지 않은 버섯의 DNA에서는 어떠한 밴드도 관찰되지 않음을 확인하였다. 이것은 PCR로 증폭되었던 DNA들이 유전자의 도입에 의한 것임을 확인시켜준결과가 되었다. 이로써 버섯조직에 Agrobacterium vacuum infiltration과 particle bombardment의 방법으로 외래 유전자의 도입이 이루어졌으며 균사체 재분화를 거친 후에도 유전자는 계속 안정적인 상태로 유지되었음을 확인할 수 있었다.

Ⅲ-9. cDNA 를 이용한 PCR 분석

각각의 형질전환체로부터 total RNA를 분리하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 PCR을 실시하여 Fig. 26, 27, 28, 29 와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 그림에서 보여지는 바와 같이 각각의 2 개체 모두에서 원하는 크기의 유전자가 증폭된 것을 확인하였다. RNA 에서 합성한 cDNA 에서 또한 유전자의 삽입을 확인한 결과 버섯에 삽입된 유전자가 안정하게 유지되고 있음을 또다시 확인할 수 있었다.

Ⅲ-10. Northern 분석

삽입된 재조합 유전자를 가진 각각의 형질전환 균사체로부터 total RNA를 분리하여 northern 분석을 실시하였다. Northern 분석을 수행한

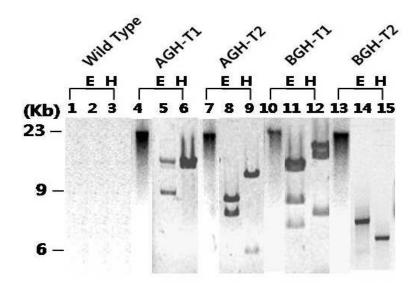


Fig. 24. Southern blot analysis of transformants (hGH2) of Pleurotus eryngii using Agrobacterium vacuum infiltration and particle bombardment.

Genomic DNA was isolated from broth cultures, digested with *EcoRI* or *HindIII*. Lane 1: nontransformant genomic DNA, Lane 2: nontransformant digested with *EcoRI*, Lane 3: nontransformant digested with *HindIII*, Lane 4, 7, 10, 13: Undigested genomic DNA from transformants, Lane 5, 8, 11, 14: transformants digested with *EcoRI*, Lane 6, 9, 12, 15: transformants digested with *HindIII*.

*AGH means transformation using *Agrobacterium* Vacuum filtration; BGH means transformation using Particle Bombardment.

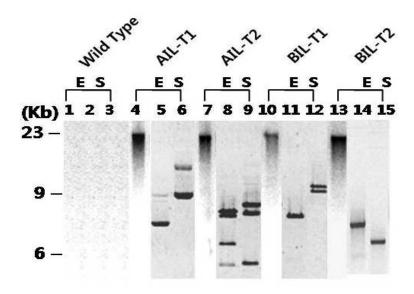


Fig. 25. Southern blot analysis of transformant (hlL32) of *Pleurotus eryngii* using *Agrobacterium* vacuum infiltration and particle bombardment.

Genomic DNA was isolated from broth cultures, digested with *EcoRI* or *Sma I*. Lane 1: nontransformant genomic DNA, Lane 2: nontransformant digested with *EcoRI*, Lane 3: nontransformant digested with *Sma I*, Lane 4, 7, 10, 13: Undigested genomic DNA from transformants, Lane 5, 8, 11, 14: transformants digested with *EcoRI*, Lane 6, 9, 12, 15: transformants digested with *Sma I*.

*AIL means transformation using *Agrobacterium* Vacuum filtration; BIL means transformation using Particle Bombardment.

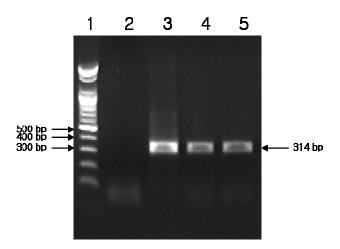


Fig. 26. PCR detection of hGH2 in transformed Pleurotus eryngii.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type), 3: Positive control with hGH2 gene, 4 and 5: amplified cDNAs from putative transformants mushroom.

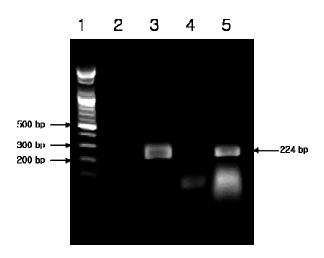


Fig. 27. PCR detection of hIL32 in transformed Pleurotus eryngii.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type), 3: Positive control with hIL32 gene, 4 and 5: amplified cDNA from putative transformants mushroom.

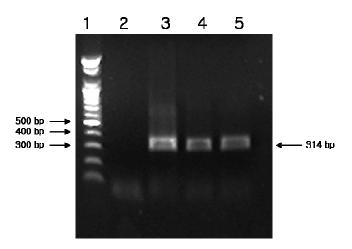


Fig. 28. PCR detection of hGH2 in transformed Pleurotus eryngii.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type), 3: Positive control with hGH2 gene, 4 and 5: amplified cDNAs from putative transformants mushroom.

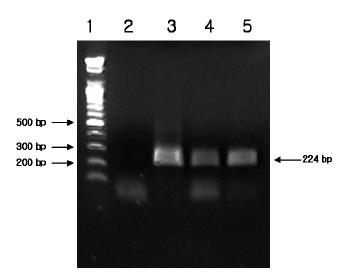


Fig. 29. PCR detection of hIL32 in transformed Pleurotus eryngii.

1: 100bp ladder DNA marker, 2: Negative control (wild type), 3: Positive control with hlL32 gene, 4 and 5: amplified cDNA from putative transformants mushroom.

결과 probe 로 쓰인 각각의 유전자에 해당하는 부위에서 강한 발현이나타남을 확인하였다(Fig. 30, 31).

Ⅲ-11. Western 분석

최종적인 단백질 발현유무를 확인하기 위하여 형질전환된 각각의 균사체로부터 조단백질을 제조한 후 20 μ_{B}/μ_{L} 로 정량하여 SDS-PAGE 전기영동을 수행한 결과 Fig. 32-(A), 33-(A), 34-(A), 35-(A) 에서 보는 바와 같이 형질전환버섯균사체와 대조구로 쓰인 큰느타리버섯의 단백질 양상을 확인할 수 있었다. SDS-PAGE gel 상에서는 큰 차이를 발견하지 못하였고, 단지 버섯균사체의 단백질 전개양상만을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 유도된 mRNA 가 단백질로 정확하게 발현되었는지 확인하기 위해 Western blot 을 수행한 결과 Fig. 32-(B), 33-(B), 34-(B), 35-(B) 에서 보는 바와 같이 22kDa (hGH2), 15kDa (hIL32)의 예상 단백질 크기로 단백질이 발현됨을 확인하였다.

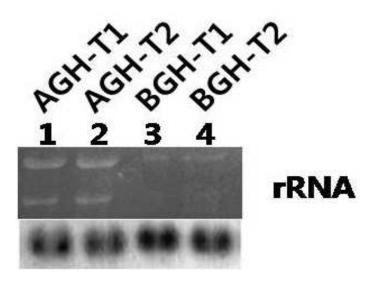


Fig. 30. Northern blot analysis of transformant (hGH2) of Pleurotus eryngii using Agrobacterium vacuum infiltration and particle bombardment.

The total RNA samples isolated from AGH-T1 (lane 1), AGH-T2 (lane 2), BGH-T1(lane 3), BGH-T2(lane 4). AGH-T1 (lane 1), AGH-T2 (lane 2), BGH-T1(lane 3), BGH-T2(lane 4), were electrophoresed, transferred to a nylon membrane and hybridized to the 32P-labeled probe of hGH2 cDNA. The top panel is the ethidium bromide staining of the electrophoresed RNA samples.

*AIL means transformation using *Agrobacterium* Vacuum filtration; BIL means transformation using Particle Bombardment.

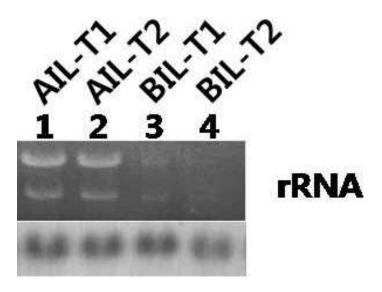


Fig. 31. Northern blot analysis of transformant (hlL32) of *Pleurotus eryngii* using *Agrobacterium* vacuum infiltration and particle bombardment.

The total RNA samples isolated from AIL-T1 (lane 1), AIL-T2 (lane 2), BIL-T1(lane 3), BIL-T2(lane 4). AIL-T1 (lane 1), AIL-T2 (lane 2), BIL-T1(lane 3), BIL-T2(lane 4), were electrophoresed, transferred to a nylon membrane and hybridized to the 32P-labeled probe of hIL32 cDNA. The top panel is the ethidium bromide staining of the electrophoresed RNA samples.

*AlL means transformation using *Agrobacterium* Vacuum filtration; BlL means transformation using Particle Bombardment.

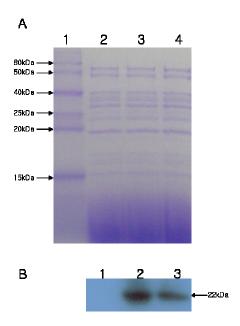


Fig. 32. Western blot analysis of transformant (hGH2) of Pleurotus eryngii using Agrobacterium vacuum infiltration.

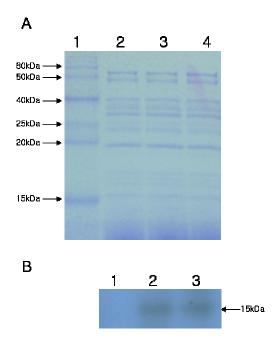


Fig. 33. Western blot analysis of transformant (hlL32) of *Pleurotus eryngii* using *Agrobacterium* vacuum infiltration.

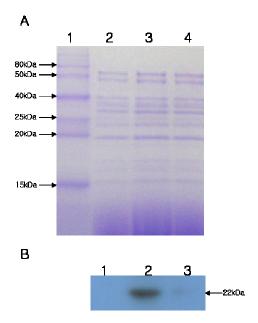


Fig. 34. Western blot analysis of transformant (hGH2) of Pleurotus eryngii using particle bombardment.

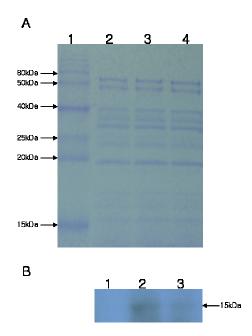


Fig. 35. Western blot analysis of transformant (hlL32) of *Pleurotus eryngii* using particle bombardment.

Ⅳ. 고찰

1. 재조합 유전자 발현벡터 제작

버섯 형질전환을 위해 hGH2 와 hlL32 유전자가 포함된 발현벡터를 제작하여 E. coli 와 A. tumefaciens 에 형질전환시켜 최종적으로 두가지의 벡터를 제작하였다. 제작된 발현벡터를 유전자의 primer와 벡터의 primer를 서로 엇갈려 사용하여 결과를 얻음으로 삽입된 유전자의 진위여부 및 recombinant strain을 최종적으로 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 도입하고자 했던 각각의 유전자의 형질전환이 정확하게 이루어 졌음을 최종적으로 확인할 수 있었다. 얻어진 결과를 토대로 Agrobacterium으로 구축되어진 각각의 유전자 벡터가 최종 형질전환 된 것을 확인하였으며, 버섯으로 형질전환 시키기 위한 벡터의 구축이 확립되었음을 확인할 수 있었다. 또한 기존에 식물의 형질전환에 이용되었던 pCambia 벡터(YongJun, et al., 2007; Zeng-Yu, et al., 2005; Bernadette, et al., 2002)를 미생물에 접목하여 확인한 결과로써 식물에 이용되던 벡터가 버섯에도 접목 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

2. 재조합 유전자의 버섯형질전환

Agrobacterium vacuum infiltration 및 particle bombardment 방법을 이용하여 실시한 버섯형질전환에서 형질전환 시키고자 했던 각각의 유전자가 포함된 벡터 DNA 의 삽입이 GUS 분석을 실시한 결과 형질전환이 이루어 졌음을 확인할 수 있었으나, 다른 한편으로 GUS 유전자의 발현이 버섯의 형질전환에 의해 나타난 결과인지 infection 된 재조합 Agrobacterium 에 의한 일시적인 유전자의 발현인지는 형질전환균사체의 유전적 분석을 통해 최종적으로 확인해야 할 것으로 사료된다. 또한 형질전환체 선별을 위해 항생제 선별배지에서 균사체를 유도한 결과 형질전환 균사체를 얻을 수 있었다. 이때 형질전환체 선발표지항생제로 사용된 hygromycin 의 경우 버섯의 생장을 방해하여

생육이 이루어지지 못하게 하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며(Clough, et al., 1998; De Groot, et al., 1998; Harmsen, et al., 1992; Staben, et al., 1989; Challen, et al., 1994) cefotaxim 은 Agrobacterium 의 생육을 저해하여 버섯에 infection 된 Agrobacterium 이 성장하지 못하게 하는 기능을 하여 버섯과 Agrobacterium 이 공생하지 못하게 하는 것으로 알려져 있다(Bundock, et al., 1995; Royer, et al., 1991). 또한, 항생제 선별배지에서 성장한 형질전환 균사체들을 50 ા/৪/째 hygromycin 만이 함유된 고체 배지로 계대배양하여 순수한 균사체 성장을 유도한 후 보관균주로 사용하였다.

3. 재조합 유전자 형질전환체 분석 및 재조합 단백질 발현

Agrobacterium vacuum infiltration 및 particle bombardment 방법을 항생제 선별배지에서 분리한 각각의 형질전환 통한 형질전환 후 균사체들의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 균사체에서 genomic DNA 를 분리하여 primer 를 이용한 PCR 을 실시한 결과 positive control 로 쓰였던 각각의 유전자 증폭영역의 크기와 일치하는 결과를 보여주었다. 반면, 비형질전환 균사체의 경우에서는 유전자의 증폭이 이루어지지 않음을 확인하였다. 위의 결과들로 비추어 볼 때 GUS 의 조직화학적 분석에서 보여졌던 결과들이 단지 Agrobacterium 에서 기인한 결과가 아닌 형질전환된 버섯에서 나타난 결과임을 재차 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 particle bombardment 방법으로 형질전환방법으로도 버섯의 형질전환이 실시한 가능할 것으로 판단되었다. 버섯으로의 유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 southern blot 을 실시한 결과 형질전환된 균사체에서 genomic DNA 에 삽입된 유전자의 위치에 따라 적게는 1 개에서 많게는 3 개 정도의 다양한 밴드가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 RNA 의 발현 여부를 확인하기 위하여 northern blot 을 실시한 결과 각각의 유전자의 해당부위에서 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 버섯으로 형질전환된 hGH2 와 hL32 의 유전자가 버섯군사체내에서 전사과정이 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 재조합 단백질의 버섯내에서의 발현 가능성을 내포하는 결과로 확인할 수 있었다. 최종적으로 형질전환 버섯군사체에서 재조합 단백질의 발현유무를확인하기 위하여 western blot 실시하여 확인한 결과 각각의 생산단백질의 분자량인 22kDa(hGH2), 15kDa(hL32)에서 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 western blot 결과에서 보여진 단백질의 발현수준은 northern blot 을 통해 확인한 RNA 의 발현수준에 비례하여나타나는 것을 확인할 수 있었다. 향 후 형질전환 균사체의 대량생산체계확립과 생산된 균사체의 단백질정제 및 생물학적 활성연구가병행되어지면 인간 재조합 단백질 생산을 위한 새로운 미생물생산시스템으로의 활용이 가능할 것으로 사료되어진다.

V. 적 요

최근 난치성 질환의 증가와 국민의료 수준의 향상에 따라 고순도 재조합 단백질성 의약품의 수요가 급증하면서 의약용 재조합 단백질이 건강관련 생명공학 분야에서 차지하는 비중이 매우 높아지고 있다. 재조합단백질의 제조의 기술은 1970년대 중반부터 시작된 이래로 그 적용의 범위가 빠른속도로 확대되어 이제 기초연구분야에서는 번번히 쓰이는 기본적인 도구로, 생산기술분야에서는 인체용 의약품의 제조뿐만 아니라 농수산 관련의 범용성 단백질 제품의 생산에까지 그 사용범위가 넓어지고 있는 추세이다. 인체 치료용 재조합의약품 및 산업효소를 포함하는 단백질소재 시장은 향 후 몇 년 이내에 수천억 달러에 달할 것으로 전망되나,신약개발을 위한 신규단백질 수요가 폭발적 증가세를 보이고 있으나 현재 다양한 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 범용 발현시스템이 없는 현실이다.

현재 인체단백질 및 산업효소를 포함하는 단백질 소재는 대부분 유전 자재조합기술로 대장균 및 효모를 포함하는 미생물 또는 포유동물세포를 이용하여 제조되고 있다. 대량의 재조합단백질을 동시에 생산하기 위해서는 균주의 조작이 용이하고 대량 배양이 쉬운 대장균이나 효모 등의 미생물이 유리하지만 인체 유래의 복잡한 단백질을 원형(authentic form)으로 생산하기 힘든 문제를 안고 있다. 또한 동물세포나 식물세포를 이용하는 경우에는 복잡한 단백질의 원형생산이 가능하지만, 생산숙주세포의 개발기간이 길고 배양시간이 오래 걸리며 배지비용이 고가이기 때문에 전반적인 비용이 비싸다는 단점이 있다. 따라서 현재 재조합단백질은 생산된 단백질이 얼마나 인체단백질에 가까운지(authenticity)와 생산된 단백질이 얼마나 순수하게 생산되는지가 가장 중요한 변수로 인식되고 있다. 따라서 고부가가치의 단백질을 고품질, 고효율로 대량 생산할 수 있는 시스템의 개발이 현재 절실히 요구 되어지고 있다.

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

본 실험에서 사용한 버섯인 큰느타리버섯에서 재조합 단백질을 생산하기 위하여 먼저 발현벡터를 구축을 실시한 결과, 1차적으로 *E. coli* DH5α와 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 균주에 *h*GH2 와 *h*IL32 가 포함된 2개의 벡터 구축을 완성하였다. 구축된 발현벡터를 형질전환 시키기 위하여 *Agrobacterium* vacuum infiltration particle bombardment 방법을 이용하였다. *Agrobacterium* vacuum infiltration 방법을 이용한 버섯형질 전환을 실시하여 일차적으로 형질전환체를 얻을 수 있었다. 얻어진 hygromycin 내성을 가진 형질전환체의 유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 각각의 genomic DNA 를 분리하여 primer를 이용한 PCR을 실시하여 각각 hGH2 3개와 hll32 4개의 형질전환균사체를 확인하였다. 또한 southern blot 과 northern blot 을 실시하여 형질전환체의 유전자 발현여부를 확인할 수 있었다. 최종적으로 형질전환균사체의 단백질을 분리하여 균사체에서 인간단백질 발현여부를 확인하기 위해 western blot을 실시한 결과 인간 유래 재조합 단백질인 hGH2 와 h/L32가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또 다른 형질전환방법으로 사용된 Gene Gun을 이용한 particle bombardment 방법을 사용하여 버섯의 형질전환을 실시한 결 과 Agrobacterium vacuum infiltration 방법과 동일하게 형질전환체를 얻을 수 있었다. Particle bombardment 방법으로 얻어진 형질전환체 또한 같은 방법으로 형질전환 유무를 확인한 결과 최종적으로 형질전환체에서 단백질 발현을 확인할 수 있었다. 위의 두 가지 방법으로 형질전환을 실시하여 *h*GH2 5개, hL32 8개의 형질전환버섯균사체를 얻을 수 있었다. Agrobacterium vacuum infiltration 방법과 particle bombardment 방법을 이용한 버섯의 형질전환은 모두 사용 가능할 것으로 판단되어지나, 실험의 편리성 및

형질전환체의 선별기간 측면에서 볼 때 particle bombardment 방법이 좀더 효율적일 것으로 판단된다. 또한, 개발된 형질전환 방법을 통하여 생산되는 재조합 단백질을 기능성식품원료에 응용하여 "Food as Medicine"의 개념으로 개발한다면 높은 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 보여진다. 그리고 향 후 지속적인 연구를 통하여 버섯에서 보다자연 원형상태에 가까우면서 생리활성이 유지된 상태로 재조합 단백질을 생산하며 그 생산성을 극대화 하기 위한 공동의 노력이 생리학자, 분자유전학자, 그리고 발효기술자간의 연계적 연구를 통해 계속적으로유지된다면, 우리의 전통적인 먹거리인 버섯이 재조합 의약품 생산을위한 숙주 시스템으로서의 새로운 모델이 될 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

Abuodeh, R.O., Orbach, M.J., Mandel, M.A., Das, A. and Galgiani, J.N. Genetic transformation of Coccidioides immitis facilitated by Agrobacterium tumefaciens. J. Infect. Dis. 181, 2106-2110. 2000.

Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J. 16:735-743. 1998.

A. A. Akindahunsi and F.L. Oyetayo. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, Pleurotus tuber-regium (fries) singer. Food Science and Technology, Vol.39:5, 548-553. 2006.

A. Teichmann, P. C. Dutta, A. Staffas and M. Jägerstad. Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. Food Science and Technology, Vol.40:5, 815-822. 2007.

An, G., P. R. Ebert. A. Mitre and S. B. Ha. Binary vectors. In plant Molecular Biology Manual. A3. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort eds. Kluwer Academic Publishers. Dordercht. pp. A3/1-A3/19, 1988.

Baneyx, F, Recombinant protein expression in Escherichia coli, Curr. Opin. Biotechnol. 10, 411-421, 1999.

Bayer, E., K. H. Gugel, K. Hagele, H. Hagenmajor, S. Jessipow, W. A. Konig, and H. Zaher. Metabolic products of microorganisms. Phosphinothricin and phosphinothricyl-alanyl-analine. Helv. Chim. Acta. 55:224-239. 1972.

Bills, S.N., Richter, D.L. and Podila, G.K. Genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus Paxillus involutus by particle bombardment. Mycol. Res. 99, 557-561. 1995.

Boekhout T. Pleurotus. Flora Agaricina Neerlandica 2: 20-24. 1990.

Boileau, A.J., Kissmehl, R., Kanabrocki, J.A. and Saimi, Y. Transformation of Paramecium tetraurelia by electroporation or particle bombardment. J. Eukaryot. Microbiol. 46, 56-65. 1999.

Bundock, P., A. Den Dulk-Ras, A. Beijersbergen, and P. J. J. Hooykaas. Trans-kingdom T-DNA transfer from Agrobacterium tumefaciens to Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. 14:3206-3214. 1995.

Binninger DM, Le Chevanton L, Skrzynia C, Shubkin CD, Pukkila PJ. Targeted transformation in Coprinus cinereus. Mol Gen Genet. 227(2):245-51. 1991.

B. Grinde, G. Hetland and E. Johnson. Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from Agaricus blazei in patients with chronic hepatitis C infection. International Immunopharmacology, Vol.6:8,1311-1314. 2006.

Bundock, P., Mroczek, K., Winkler, A.A., Steensma, H.Y. and Hooykaas, P.J.J. T-DNA from Agrobacterium tumefaciens as an efficient tool for gene targeting in Kluyveromyces lactis. Mol. Gen. Genet. 261, 115-121. 1999.

Bundock, P., van Attikum, H., den Dulk-Ras, A. and Hooykaas, P.J.J. Insertional mutagenesis in yeast using T-DNA from Agrobacterium tumefaciens. Yeast 19, 529-536. 2002

Bernadette J. Connors, Melanie Miller, Charles A. Maynard and William A. Powell. Cloning and characterization of promoters from American chestnut capable of directing reporter gene expression in transgenic Arabidopsis plants. Plant Science, Vol.(163)4:771-781. 2002.

Castellani ML, Salini V, Frydas S, Donelan J, Madhappan B, Petrarca C, et al. Interleukin-31: a new cytokine involved in inflammation of the skin. Int J Immunopathol Pharmacol;19:1-4. 2006.

C. Burns, K.E. Gregory, M. Kirby, M.K. Cheung, M. Riquelme, T.J. Elliott, M.P. Challen, A. Bailey and G.D. Foster. Efficient GFP expression in the mushrooms Agaricus bisporus and Coprinus cinereus requires introns. Fungal Genetics and Biology. Vol.42:3, 191-199. 2005.

Castellani ML, Salini V, Frydas S, Donelan J, Tagen M, Madhappan B, et al. The proinflammatory interleukin-21 elicits anti-tumor response and mediates autoimmunity. Int J Immunopathol Pharmacol;19:247-51. 2006.

Chen X, Stone M, Schlagnhaufer C, Romaine CP. A fruiting body tissue method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of Agaricus bisporus. Appl Environ Microbiol. ;66(10):4510-3. 2000.

Choi SH. Extration and purification of physiologically active materials from agaricus blazei fruiting bodies. MS Thesis. So Gang University. 2000.

Cheuk-Lun Lee, Xiaotong Yang and Jennifer Man-Fan Wan. The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from Coriolus versicolor. Enzyme and

Microbial Technology, Vol.38:1-2, 14-21. 2006.

De Groot, M. J. A., P. Bundock, P. J. J. Hooykaas, and A. G. M. Beijersbergen. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. 16:839-842. 1998.

Dermar A. Pleurotus eryngii (DC. ex Fr.) Quel in Slovakia. Ceske Mykologie 28: 57-59. 1974.

Dunn-Coleman, N. and Wang, H. Agrobacterium T-DNA: A silver bullet for filamentous fungi Nat. Biotechnol. 16, 817-818. 1998.

D. L. Domondon, W. He, N. De Kimpe, M. Höfte and J. Poppe. β-Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. Phytochemistry, Vol.65: 2, 181-187. 2004.

Eger G. Biology and breeding of Pleurotus. In The biology and cultivation of edible mushroom. Chang ST, Hayes WA, eds. Academic Press, New York. 1978.

EmporiadouM, HatzistilianouM, Haidopoulou K, Aggouridaki C, Reklity A, Magnisali C, et al. Procalcitonin and inflammatory cytokines in children with asthma. Eur J Inflamm;3:75-81. 2005.

Eun Jae Cho, Jung Young Oh, Hyun You Chang and Jong Won Yun. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom Tremella fuciformis. Journal of Biotechnology, Vol.127:1, 129-140, 2006.

Feld, S., Hirschberg, R. Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. Endocr Rev. 17, 423-480. 1996.

Florini, J. R., Ewton, D. Z., Coolican, S. A. Growth hornone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. Endocr. Rew. 17, 481-517. 1996.

Fungaro, M.H.P., Rech, E., Muhlen, G.S., Vainstein, M.H., Pascon, R.C., de Queiroz, M.V., Pizzirani-Kleiner, A.A. and de Azevedo, J.L. Transformation of Aspergillus nidulans by microprojectile bombardment on intact conidia. FEMS Microbiol. Lett. 125, 293-298. 1995.

Georgiou, G. Expression of proteins in bacteria, In Principles and practice of protein engineering J. L. Cleland and C. S. Craik, Eds., p101, Betterworths, New York, 1995.

Granado JD, Kertesz-Chaloupkova K, Aebi M, Kues U. Restriction enzymemediated DNA integration in Coprinus cinereus. Mol Gen Genet. 256(1):28-36. 1997.

Gouka, R.J., Gerk, C., Hooykaas, P.J.J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C.T. and de Groot, M.J.A Transformation of Aspergillus awamori by Agrobacterium tumefaciens-mediated homologous recombination. Nat. Biotechnol. 17, 598-601. 1999.

H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Frarr et al, Protein measurement with the folin phenol reagent, The Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275, 1951.

Hanif, M., Pardo, A.G., Gorfer, M. and Raudaskoski, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus Suillus bovinus using hygromycin B as a selectable marker. Curr. Genet. 4, 183-188. 2002.

Harmsen, M. C., F. H. J. Schuren, S. M. Moukha, C. M. Van Zuilen, P. J. Punt, and J. G. H. Wessels. Sequence analysis of the glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes Schizophyllum commune, Phanerochaete chrysosporium and Agaricus bisporus. Curr. Genet. 22:447-454. 1992.

Heiser W. Optimization of Biolistic transformation using the helium-driven PDS-1000/He BioRad. US/EG bulletin 1688. 1992.

Heiser, W.C. Gene transfer into mammalian cells by particle bombardment. Anal. Biochem. 217, 185-196. 1994.

Hilber O. Valid, invalid and confusing taxa of the enus Pleurotus. Mushroom Sci 12: 241-248. 1989.

Hilber UW, Bodmer M, Smith FD, Koller W. Biolistic transformation of conidia of Botryotinia fuckeliana. Current Genetics 25, 124-127. 1994.

Hockney, R. C, Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli, TIBTECH. 12, 456-463. 1994.

Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus Pleurotus ostreatus. Curr Genet. Mar;37(3):209-12. 2000.

Irie T, Honda Y, Hirano T, Sato T, Enei H, Watanabe T, Kuwahara M. Stable transformation of Pleurotus ostreatus to hygromycin B resistance using Lentinus edodes GPD expression signals. Appl Microbiol Biotechnol.;56(5-6):707-9. 2001

Irie T, Sato T, Saito K, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M, Enei H. Construction of a homologous selectable marker gene for Lentinula edodes transformation. Biosci Biotechnol Biochem. 67(9):2006-9. 2003.

Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. Gus fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant. EMBO J. 6:3901-3907. 1987.

Johnston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC, Butow RA. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. Science 240, 1538-1541. 1988.

Joosten LA, Netea MG, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A;103:3298-303. 2006.

Kim HK, Cheong JC, Seok SJ, Kim GP, Cha DY, Moon BJ. The artificial cultivation of Pleurotus eryngii (II). The Korean J Mycology 25: 311-319. 1997.

Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford CJ, Fromm ME, Maliga P. Stable genetic tansformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process. Proceedings of the National Academy of Science 85, 8502-8506.

1988.

Knudtzon, J., Bogsnes, A. & Norman, N. Changes in prolactin and growth hormone levels during hypoxia and exercise. Hormone and Metabolism Research. 21,453-454. 1989.

Komatsu N, Okubo S, Kikumoto S, Kimura K, Satio G. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by Schizophyllum commune. Gann 60:137-144. 1969.

Kikuchi M, Kitamoto N, Shishido K. Secretory production of Aspergillus oryzae xylanase XynF1, xynF1 cDNA product, in the basidiomycete Coprinus cinereus. Appl Microbiol Biotechnol. 63(6):728-33. 2004.

Kuo CY, Chou SY, Huang CT. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and use of the gpd promoter for transformation in Flammulina velutipes. Appl Microbiol Biotechnol.;65(5):593-9. 2004.

Lanzilli G, Falchetti R, Tricarico M, Ungheri D, Fuggetta MP. In vitro effects of an immunostimulating bacterial lysate on human lymphocyte function. Int J Immunopathol Pharmacol;18:245-54. 2005.

Lee BW, Lee MS, Park KM, Kim CH, Ahn PU, Choi CU. Anticancer activities of extract from the Mycelia of Coriolus versicolor. Korean J Microbiol Biotechnol 20: 311-315. 1992.

Lee JW, Bang KW. Biological activity of Phellinus spp. Food Industry and Nutr 6: 25-33. 2001.

Lugones LG, Scholtmeijer K, Klootwijk R, Wessels JG. Introns are necessary for mRNA accumulation in Schizophyllum commune. Mol Microbiol. ;32(4):681-9. 1999.

Lillian Barros, Paula Baptista, Daniela M. Correia, Susana Casal, Beatriz Oliveira and Isabel C.F.R. Ferreira. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. Food Chemistry, Vol.105:1, 140-145. 2007.

Makrides SC. Strategies for achieving hig-level expression of genes in Escherichia coli. Microbiol Rev. 60:512-538. 1996.

Malonek, S. and Meinhardt, F. Agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete Calonectria morganii. Curr. Genet. 40, 152-155. 2001.

Mikosch, T.S.P., Lavrijssen, B., Sonnenberg, A.S.M. and van Griensven, L.J.L.D. Transformation of the cultivated mushroom Agaricus bisporus (Lange) using T-DNA from Agrobacterium tumefaciens. Curr. Genet. 39, 35-39, 2001.

Moor, A.J., Challen, M.P., Warner, P.J. and Elliotte, T.JBillistics for the delivery of t ransforming DNA to mushrooms. Mushroom Sci. 14, 63-70. . 1995.

Moore AJ, Challen MP. Elliott TJ. Ballistics for the delivery of transforming DNA to mushrooms. Mushroom Science 14, 63-70. 1995.

More JT, Uppal A, Maley F, Maley GF. Overcoming inclusion body formation in a high level expression system. Prot Expr Purif. 4:160-163. 1993.

Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, C.P., Raina, R., Geiser, D.M. and Kang, S. Agrobacterium-mediated transformation of Fusarium oxysporum: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. Phytopathology 91, 173-180. 2001.

Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Walsh M, Park JS, et al. IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1β and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A;102:16309-14. 2005.

Nakai R, Sen K, Kurosawa S, Shibai H. Cloning and sequencing analysis of Trp1 gene of Flammulina velutipes. FEMS Microbiol Lett. 1;190(1):51-6. 2000.

Novick D, Rubinstein M, Azam T, Rabinkov A, Dinarello CA, Kim SH. Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A;103:3316-21. 2006.

Olmos S, Blois S, Frecha C, Márquez G, Roux ME. Cytokines mediating inflammation in a model of secondary immunodeficiency in Wistar rats: immunomodulation triggered by thymomodulin. Eur J Inflamm;4:97-107. 2006.

Ogawa K, Yamazaki T, Hasebe T, Kajiwara S, Watanabe A, Asada Y, Shishido K. Molecular breeding of the basidiomycete Coprinus cinereus strains with high lignin-decolorization and -degradation activities using novel heterologous protein expression vectors. Appl Microbiol Biotechnol. 49(3):285-9. 1998.

Pardo, A.G., Hanif, M., Raudaskoski, M. and Gorfer, M. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by Agrobacterium tumefaciens. Mycol. Res. 106, 132-137. 2002

Park YM, Yoon SK, Park SH, Baeg NJ, Kim BS. Efficacy and safety of Coriolus versicolor polysaccharide (Licovek) in the treatment of chronic type B hepatitis. Korean J Phamacol Ther 1: 45-48. 1993.

Piers, K.L., Heath, J.D., Liang, X., Stephens, K.M. and Nester, E.W. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1613-1618. 1996.

Raben MS. Clinical of human growth hormone N Eng J Med; 266:82-86. 1962.

Rajarathnam S, Bano Z. Pleurotus mushroom. Part 1. A morphology, lifecycle, taxonomy, breeding and cultivation. CRC Crit Food Sci Nutr 26: 157-222. 1987.

Resistance marker for mushroom transformation. Cult. Mush. Newsl. 2:13-20. 1994.

Rosen T, Bengtsson B-.Premature mortality due to cardiovascular diseae in hypoituotarism. Lancet;336;285-288. 1990.

Royer, J. C., and P. A. Horgen. Towards a transformation system for Agaricus bisporus, p. 135-139. In L. J. L. D. Van Griensven (ed.), Genetics and breeding of Agaricus. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. 1991.

Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP: Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. J Clin Invest 671:361-1369, 1981.

R. M. M. Gern, E. W., J. R. R., J. L. N. and S. A. Furlan. Alternative medium for production of Pleurotus ostreatus biomass and potential antitumor polysaccharides. Bioresource Technology, Vol.99:1, 76-82. 2008.

Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allan N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Particulate Science and Technology 5, 27-37. 1987.

Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. and Allen, N. Delivery of substances into cells and tissues a particle bombardment. Part. Sci. Technol. 5, 27-37. 1987.

Sato T, Yaegashi K, Ishii S, Hirano T, Kajiwara S, Shishido K, Enei H. Transformation of the edible basidiomycete Lentinus edodes by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. Biosci Biotechnol Biochem.;62(12):2346-50. 1998.

Schillberg, S., Tiburzy, R. and Fischer, R. Transient transformation of the rust fungus Puccinia graminis f. sp. tritici. Mol. Gen. Genet. 262, 911-9115.

2000.

Scott. O. R. and A. J. Bendich. In plant molecular biology manual. D1. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort eds. Kluwer Academic Publishers. Dordercht. D1/1 - 8. 1994.

Seo, J. H, Production of proteins in recombinant Escherichia col,. In Recent Advance in Bioprocess Engineering Vol. 3, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. Y. Lee, Eds., p63 Bioprocess Engineering Research Center, Daejun, 1995.

Soo-Hyun Kim, Sun-Young Han, Tania Azam, Do-Young Yoon, and Charles A. Dinarello. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFα. Immunity. 22: 131-142. 2005.

Southern. E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophosis. J. Mol. Biol., 98:503-512. 1975.

Staben, C., B. Jensen, M. Singer, J. Pollock, M. Schechtman, J. Kinsey, and E. Selker. Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in Neurospora crassa transformation. Fungal Genet. Newsl. 36:79-81. 1989.

Sunagawa M, Magae Y. Transformation of the edible mushroom Pleurotus ostreatus by particle bombardment. FEMS Microbiol Lett. 4;211(2):143-6. 2002.

Shu-Yao Tsai, Hui-Li Tsai and Jeng-Leun Mau. Antioxidant properties of Agaricus blazei, Agrocybe cylindracea, and Boletus edulis. Food Science

and Technology, Vol. 40:8, 392-1402. 2007.

Toogood AA, O'Neill PA, Shalet SM. Beyond the somatopause: growth hormone deficiency in adults over the age of 60 years. J Clin Endocrinol Metab.; 81:460-465. 1996.

Underwood LE, Van Wyk JJ: Normal and aberrant growth. In: Wilson JD. Foster DW, eds. Textbook of Endocrinology. Philadelphia: WB Saunders, 155-205. 1985.

Van der Rhee, M. D., P. M. A. Graca, H. J. Huizing, and H. Mooibroek. Transformation of the cultivated mushroom, Agaricus bisporus, to hygromycin B resistance. Mol. Gen. Genet. 250:252-258. 1996.

Vasilkov PB. Abriss der geographischen Verbreitung der Hutpilze in der Sowjetunion. Moskau, Leningrad. 1995.

Wakita, Y., Otani, M., Iba, K. and Shimada, T. Co-integration, co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and NtFAD3 gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment. Genes Genet. Syst. 73, 219-226. 1998.

Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. Nature Biotechnol. 18: 831-833. 2000.

Yaver DS, Overjero MD, Xu F, Nelson BA, Brown KM, Halkier T, Bernauer S, Brown SH, Kauppinen S. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete Coprinus cinereus and heterologous expression of the laccase lcc1. Appl Environ Microbiol. 65(11):4943-8.1999.

YongJun Liu, Aining Zhang, Jingfen JIA and Angzhen Li. Cloning of Salt Stress Responsive cDNA from Wheat and Resistant Analysis of Differential Fragment SR07 in Transgenic Tobacco. Journal of Genetics and Genomics, Vol. (34)9: 842-850. 2007.

Zadrazil F. The ecology and industrial production of Pleurous ostreatus, Pleurotus florida, Pleurotus cornucopiae and Pleurotus eryngii. Mushroom Science |X(Part 1):621-655. 1974.

Zeef, L.A., Christou, P. and Leech, M.J. Transformation of the tropane alkaloid-producing medicinal plant Hyoscyamus muticus by particle bombardment. Transgenic Res. 9, 163-168. 2000.

Zoubenko, O. V., L. A. Allison, Z. Svab, and P. Maliga. Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. Nucleic Acids Res. 22:3819-3824. 1994.

Zeng-Yu Wang and Yaxin Ge. *Agrobacterium*-mediated high efficiency transformation of tall fescue (Festuca arundinacea). Journal of Plant Physiology, Vol. (162)1: 103-113. 2005.

고유상, 민병석, 바이오 신사업 기회와 대응 전략, 삼성경제연구소 CEO information 473호, 2004.

구영덕, 고병열, 손정훈, 2005 미래유망 사업화 아이템 이슈분석; 유용단백질 소재. 한국과학기술정보연구원. 2005. 산자부 차세대 성장동력 기획보고서, 면역 및 대사결손 질환 단백질 치료제 기술 개발에 관한 산업 분석,2006.

산자부 차세대 신기술개발 기획보고서, Glycomics를 이용한 차세대 의약품 개발에 관한 산업 분석, 2005.

감사의 글

먼저 지금까지 제 삶을 지켜주시고 함께 해주신 하나님께 감사와 영광을 드립니다. 석사를 마치고 5년만에 다시 시작했던 공부라 많이 힘들었고 사회생활을 접고 실험실 생활에 적응하기 위해 많은 시간을 들인 지난 3년동안의 대학원 생활이 한편의 드라마가 되어 제 머리속을 빠르게스쳐 지나감을 느낍니다.

지난 3년간 못난 제자이자 사적으론 조카인 저를 넘치는 사랑으로 지도해 주시고 보살펴 주신 김성준 지도교수님께 한없는 감사와 사랑을 드립니다. 대학원 생활동안 많은 가르침을 주시고 또한 논문심사를 통해서 많은 조언을 해주신 박열 교수님, 전홍성 교수님, 유진철 교수님께 감사의말씀을 드립니다. 그리고 논문의 완성도를 높이기 위해 물심양면으로 너무나도 많은 도움을 주신 ㈜캐러스 정남준 박사님께 무한한 감사의 말씀을 드립니다. 또한 대학원 생활 동안 많은 조언을 주신 생명공학과 양영기 교수님, 정현숙 교수님, 이정섭 교수님, 박윤경 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 전북대학교 김명곤 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

실험실 생활하면서 너무나도 많은 일들을 함께했던 우리 분자생물학실험 실 가족들에게 감사의 말을 전하고자 합니다. 지금은 미국에서 박사 후 과정중인 김재성 박사님, 네팔에서 연구에 전념하시고 계실 Kumar 박사님, 중국 연변의대에서 학생들을 열심히 가르치고 계시는 심명화 박사님, 새로운 도전을 준비하고 있는 Hiep 에게 이 지면을 통해 고마운 마음을 전합니다. 그리고 논문실험기간 내내 옆에서 많이 도와주고 많은 시간을함께했던 울 실험실 일꾼 봉석이에게 특별한 감사의 마음을 전합니다. 봉석아! 정말 고맙고 새롭게 시작하는 박사과정도 열심히 해서 좋은 논문으로 졸업하길 바란다. 그리고 이번에 같이 졸업하는 울 실험실 안방마님 세은이에게도 고마운 마음을 전합니다. 우리 실험실에서 제일 이쁜(?) 성격좋은 지은이와 많은 시간을 함께하진 못했지만 실험실 생활 잘 해나가

고 있는 막내 회창이에게도 고마움을 전합니다. 모두모두 고맙고 앞으로도 실험실 생활 열심히 하자!!. 그리고 내가 유일하게 만들었던 우리 실험실 사조직 뚱스클럽의 맴버들인 넘버 투 설희, 넘버쓰리 경진이에게 고마움을 전합니다. 애들아!! 우리 조직은 앞으로도 계속될거 같구나..ㅎㅎ서울에서 대학원 생활 열심히 해서 좋은 논문으로 졸업해라. 많은 시간함께 생활한 식물분자생물학 실험실의 황인덕 선생님, 기리 선생님, 딜리선생님, 이번에 같이 졸업하는 영민이, 항상 웃는 모습이 좋은 가영이에게도 고마움을 전합니다. 또한 신경분자생물학 실험실의 상용이, 홍석이, 효정이, 으뜸이에게도 고맙다는 말을 전합니다. 약학대학 약품미생물학실 햄버들인 한지만 박사님, 승관이형, 준호형, 승식이 에게도 고맙다는 말을 전합니다. 농촌진흥청에서 박사후 과정중인 최한석박사님께도 고맙다는 말을 전합니다. 농촌진흥청에서 박사후 과정중인 최한석박사님께도 고맙다는 말을 전합니다. 그리고 논문실험에 있어 정말 고마운 사람 울 현정이에게 감사의 말을 전합니다. 현정아 고맙다!!

살아오면서 고마움을 주신 분들께 이 지면을 통해 감사의 말을 전하고 자 합니다. 대학교 1학년때부터 지금까지 너무나도 많은 도움을 준 인성 이형에게 특별한 감사의 말을 전합니다. 형 정말 고마워..앞으로도 쭉 많 이 도와줘라..ㅎㅎ. 사업을 하면서 알게 되어 지금까지 계속 도움을 주고 계시는 법무법인 이수의 박경환 팀장님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또 한 물심양면으로 많은 도움을 주신 ㈜캐러스 김봉수 사장님께도 감사의 말씀을 드립니다. 실험에 쓰인 버섯을 제공해 주신 송이농산의 박기형 사 장님께도 감사하다는 말씀을 전합니다. 어려울때 많은 도움을 준 나의 오 랜 친구이자 가장 절친한 벗인 동석이 에게도 미안함과 감사의 말을 전하고 싶습니다.

지금까지 그리고 앞으로도 나에게 너무나도 큰 힘이 되어줄 가족들에게 감사의 말을 전합니다. 힘든 생활중에서도 이 못난 아들에게만큼은 너무 나도 많은 사랑을 주셨던 부모님께 말로는 다 표현할 수 없지만 이세상 누구보다도 더 크고 더 많은 감사의 말씀을 드립니다. 아버지, 어머니 감 사합니다. 그리고 사랑합니다. 두분이 계셨기에 지금의 제가 여기까지 왔 다고 자신있게 말할 수 있습니다. 다시한번 아빠,엄마 사랑해요!!! 그리고 많이 부족한 저에게 귀한 딸을 주시고 물심양면으로 도와주신 장인어른, 장모님께도 무한한 감사의 말씀을 드립니다. 아버님, 어머님 감사합니다. 광주에 계시는 작은아버지, 작은 어머니, 부산에 계시는 막내 작은아버지, 작은어머니께도 감사의 말씀을 드립니다. 앞으로 장손으로써 소임을 다할께요. 익산에 있는 매형, 누나한테도 너무나도 감사하다고 그리고 고맙다는 말을 전합니다. 형 땜에 자기가 많이 차별 받았다고 말하는 동생한테도 미안하다고 그리고 고맙다는 말을 전합니다. 사촌동생들인 휼이, 현이, 수지, 유지 사랑하는 조카 호경이, 경인이 모두들 사랑한다. 처제 소영, 미라, 처남인 대근이 에게도 고맙고 사랑한다는 말을 전합니다. 그리고 등직한 동생 경만이도 고맙다.

마지막으로 아무것도 없는 나와 결혼해서 지금까지 힘든 내색 한번 안하고 묵묵히 나를 믿고 지켜봐준 사랑하는 아내 은영이에게 이세상 그누구보다도 사랑한다고 말하고 싶습니다. 은영아 사랑해!!!! 그리고 너무고마워!! 앞으로 정말정말 잘할게. 그리고 사랑하는 딸 우리 유빈이!! 아빠가 많이 놀아주지 못해 미안하다. 그래도 아빠가 우리 유빈이 아주 많이 사랑하는거 알지. 유빈아 사랑해!!..내년 5월에 태어나는 우리 둘째 엄마 뱃속에서 건강하게 잘 지내다 내년에 만나자. 우리 둘째도 아빠가 많이 사랑한다.

길지 않은 시간동안 너무나도 많은 일들이 있었고, 그 일들을 통해서 울고 웃기도 했고, 때론 절망에 빠지기도 했지만, 이제와 돌아보니 그러한모든 일들이 나를 단련시킨 계기가 되었던걸 깨닫게 됩니다. 이제 또 나를 단련시키는 새로운 일을 경험하고자 합니다. 새롭게 하는 일들이 어렵고 힘들지라도 이제는 꿋꿋히 해 나갈수 있다는 자신감이 있습니다. 먼훗날 다시 나를 돌아봤을 때 입가에 웃음이 가득한 나를 상상하며 글을마칩니다.

끝이 아닌 새로움을 기약하는 12월을 보내며..