

극지 클로렐라의 형질전환을 통한
면역증강단백질 CSF의 발현 체계 확립

Establishment of CSF expression in arctic
Chlorella sp. via genetic transformation



서강대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “국내 학·연 극지연구진흥프로그램(PAP사업)”에 관한 연구 “극지 클로렐라의 형질전환을 통한 면역증강단백질 CSF의 발현 체계 확립” 과제의 최종보고서(보고서명: 극지 클로렐라의 형질전환을 통한 면역증강단백질 CSF의 발현 체계 확립)로 제출합니다.



연구기관명 : 서강대학교

연구책임자 : 김 성 룡

참여연구원 : 신 준 혜

“ : 전 지 형

“ : 이 주 현

요 약 문

I. 제 목

:극지 클로렐라의 형질전환을 통한 면역증강단백질 CSF의 발현 체계 확립

II. 연구개발의 목표

:극지 클로렐라의 유전자 형질전환법을 정립하고 면역증강단백질 colony stimulating factor (CSF)의 발현 체계를 확립하여, 최종 1 mg의 CSF 단백질을 정제함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 북극 해빙에서 분리한 클로렐라 ArM0029B의 형질전환을 유전자총, PEG, 전기천공, *Agrobacterium* 공배양의 네 가지 방법을 통해 수행함
- 형질전환 방법을 정립하고, CSF 단백질의 고효율 발현 벡터를 건축함
- CSF 단백질 발현 체계를 확립하고 그 의약 역가를 확인함
- 대량 발현용 바이오리액터를 설계함

위의 연구를 수행하기 위한 방법으로,

- 본 연구실에서 확립한 *C. vulgaris* KMCC-9에 사용한 형질전환 방법 4가지를 적용하여 CaMV35S-GFP와 ArM0029B hsp70-CrCFP 리포터 유전자 2종의 고효율 형질전환법을 정립함.
- ArM0029B에서의 고효율 발현을 위하여 REA-Seq을 통한 빛유도성 유전자 2종과 질소결핍유도 유전자 4종을 분리함.
- 상기 유전자 6종 중 활용가능성이 높을 것으로 기대되는 프로모터 2종 클로닝 및 발현벡터구축
- 상기 프로모터-CSF 형질전환 및 표현형연구: 성장속도, 단백질 발현량 정량을 통한 3계통 확립
- CSF 역가 조사: CSF 단백질 정제 및 leukemia 세포 성장속도 조사를 통한 역가 확인
- 바이오리액터 설계: bubble-type 총 5 리터 이상

IV. 연구개발결과

- 극지클로렐라 ArM0029B의 형질전환 체계 확립.
- CSF 단백질 발현의 최적화를 위한 질소결핍 유도성 유전자의 프로모터 2종을 이용한

CSF 발현백터 구축함.

- 극지클로렐라로 그러한 발현백터의 도입 및 형질전환 라인 획득함.
- 그러한 형질전환라인에서 질소결핍에 의한 CSF 단백질의 생산을 확인함.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해 단백질 생산 플랫폼으로써 클로렐라의 이용 가능성을 확인하였음.

연구 결과 특허 3건을 출원하였으며, 이 특허와 다른 식물기반의 연구개발 결과들을 산업화하기 위해 주식회사 피토맵을 창립하고, 해당 특허 3건은 (주)피토맵으로 기술이전 하였음(기술료 9,460만원).

본 과제에서 개발된 기술은 더욱 발전시켜 클로렐라 기반의 생물의약품 생산 시스템을 산업화하고자 함.



Summary

I. Subject

:Establishment of CSF expression in arctic *Chlorella* sp. via genetic transformation

II. Purpose

:By establishing a transformation system for an arctic *Chlorella* sp., final 10 mg of an immunization reinforcement protein colony stimulating factor (CSF) will be purified.

III. Contents

- Transformation of *Chlorella* ArM0029B isolated from Arctic sea ice is carried out through methods of gene gun, PEG, electroporation and Agrobacterium co-culture.
- Establish transformation methods and construct a high-efficiency expression vector of CSF protein
- Establish the CSF protein expression system and identify its drug activity
- Design bioreactor for mass expression

As a method for carrying out the above study,

- High efficiency transformation method of two genes of CaMV35S-GFP and ArM0029B-CrCFP reporter genes are established by applying 4 kinds of transformation methods used in *Chlorella vulgaris* KMCC-9 established in this laboratory.
- Separation of two light inducible genes and four nitrogen deficiency inducible genes through RNA-Seq for high efficiency expression in ArM0029B.
- Cloning and expression vector construction of two kinds of promoters expected to be highly utilizable among the four genes
- Transforming the above promoter-CSF and characterization of the phenotype
: Establishment of three lines through growth rate and protein expression quantification
- CSF activity study: Determination of potency through CSF protein purification and leukemia cell growth study
- Bioreactor design: bubble-type total 5 liters or more

IV. Results

- Establishment of transformation for arctic Chlorella (ArM0029B).
- Optimization of CSF expression in Chlorella:
Isolation of promoters of two genes induced under nitrogen starvation condition and construction of CSF expression vector controlled by two promoters.
- Transformation of arctic Chlorella using the CSF expression vectors and obtainment of transgenic lines.
- CSF were successfully produced under nitrogen starvation condition in the transgenic lines.

V. Future plan for application of the result

Our results indicate that Chlorella can be used as a platform for pharmaceutical production. Three applied patents derived from the results were transferred to a private company, PhytoMab, with a value of approximately \$80,000. PhytoMab, was established to develop and commercialize the expression system in Chlorella.

극지연구소

목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌



제 1 장 서론

1. 연구의 필요성

- 미세조류 형질전환 연구는 2002년 *Chlorella ellipsoidea*에서 넙치 성장호르몬 유전자를 발현시켰다는 부경대의 보고 이후, 후속 연구는 찾을 수 없음. Pubmed에서 Korea *Chlorella* transformation 검색어로 검색한 결과한 편도 찾을 수 없었음.
- 미국의 Cyanotech, Omeratech, Martech 등과 같은 기업들이 이미 스탠포드, 메릴랜드, 버클리 대학과 산학연구체제를 구축하여 해양미세조류 유래 기능성 물질을 개발하고 있으며 일본에서도 바이오연료 뿐만 아니라 화장품 및 서플리먼트와 같은 건강산업의 분야에서 상업화의 기대가 큼.
- 이렇듯 기존의 연구는 임의의 돌연변이체를 선발하여, 대량 배양 및 대량 추출에 초점이 맞추어져 있으며, 산업화 부가가치가 매우 높은 의료용 단백질 생산을 위한 체계는 국제적으로 아직 미성숙 단계임. 따라서, 본 연구에서 제안된 사시사철 배양 가능한 극지 클로렐라를 이용한 재조합 단백질 생산 체계 확립은 우리나라의 국제경쟁력 제고에 크게 기여할 것으로 사료됨.
- 재조합 단백질 의약품에 대한 수요는 산업계, 진단 및 치료에서 광범위한 사용으로 증가하고 있으며, 그 생산을 위한 생물반응기는 단백질에 대한 대량 생산 요구에 비해, 높은 비용 및 기존 숙주세포 유용성 등의 제한으로 새로운 시스템 개발의 필요성이 높음.
- 본 연구에서 사용하는 극지 ArM0029B 클로렐라는 상온(25도)에서 기존의 클로렐라 UTEX265와 성장속도가 비슷할 뿐 아니라, 섭씨 4도에서도 생장이 가능하므로 우리나라에서 사시사철 배양이 가능하고 유전체 서열이 일부 알려져 있어, 의료용 재조합 단백질 생산의 생물반응기로 유망한 미세조류임. 또한 이전의 연구에서 극지 클로렐라 ArM0029는 다양한 온도 조건에서 UTEX395 보다 빠른 성장을 보였으며 세포 내에 많은 양의lipid를 축적하는 특징을 가진 것으로 보고됨. 따라서 단백질 생산플랫폼으로써 극지 클로렐라를 이용했을 때 좀 더 단시간 내에 효율적인 단백질 생산이 가능할 것으로 예상됨.
- 2015년 서아프리카에서 창궐한 Evola 바이러스 치료제 ZMapp은 담배 식물에서 생산되어 광합성 생명체에서 의약품 개발 가능성을 확인시켰으며, 전 세계적으로 문제가 되는 사스나 메르스의 주범인 코로나바이러스에 대한 치료제도 멀지 않은 시기에 가능할 것으로 판단됨. 이러한 시기에 극지 클로렐라를 사용하여 CSF를 생산하는 연구는 기반 연구로 그 필요성을 아무리 강조해도 지나치지 않음.

○ 최초 항암제 투여 후 호중구 수치가 낮은 암환자의 과립구(granulocyte) 생산을 자극하여 호중구 수를 증진시키는 약물인 granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)는, 항암치료에 의한 호중구 감소증 치료제로 전체시장 규모는 대략 \$6,500 M(약 7조원)에 이릅니다. 시판중인 G-CSF는 Amgen사의 제품이 시장을 주도하며 전체시장의 약 90%를 차지함(2014년).

○ 폐쇄시스템에서 저온성 *Chlorella*의 높은 성장성을 이용하여, 재조합 의료 단백질 생산의 숙주세포로 사용할 목적으로 본 연구실의 형질전환기술을 이용하여 재조합 단백질의 효율적 발현을 위한 형질전환 기법 구축은 절실함.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 연구동향 및 기존연구의 문제점

- (국내) 현재, KAIST 차세대바이오매스연구단에서는 미세조류 형질 변환으로 지질함량이 증대되고, 온도, 빛 등의 스트레스에 대한 형질개량 및 배양공정시스템 연구가 추진 중이나 클로렐라의 형질전환은 아직 성공하지 못했음.
- 2015년부터는 한국해양과학기술원과 인하대학교에서 해양미세조류의 안정적 확보, 확보된 원료의 형질전환 및 효율적 전환기술 확립, 대규모 해양광생물반응기 기술개발, 해양-육상의 하이브리드 배양시스템 개발 등 원천기술 개발 연구를 진행하고 있음.
- 미세조류 형질전환 연구는 2002년 *Chlorella ellipsoidea* 에서 넘치 성장호르몬 유전자를 발현시켰다는 부경대의 보고 이후, 후속 연구는 찾을 수 없음. Pubmed에서 Korea Chlorella transformation 검색어로 검색한 결과한 편도 찾을 수 없었음.
- (국외) 당근세포에서 고셔병 치료제인 glucocerebrosidase가 생산되고 있으나 미세조류를 이용한 재조합 단백질의 생산 관련 연구는 실험실규모로 *C. reinhardtii* 에서 성장인자, 혈액응고인자 등이 보고된 바 있고 클로렐라에서는 defensin 단백질이 11mg/L로 보고된 바 있음.
- 미국의 Cyanotech, Omeratech, Martech 등과 같은 기업들이 이미 스탠포드, 메릴랜드, 버클리 대학과 산학연구체제를 구축하여 해양미세조류 유래 기능성 물질을 개발하고 있음. 대표적인 예로는, (1) Sapphire Energy, Inc. 2008년에 뉴멕시코주에 세계 최대 규모의 본격적인 실증 플랜트(약 120ha의 부지)를 가동하여 제트연료 및 경유용으로 미세조류로부터 생산하고 있음. (2) Algenol Biofuel, Inc. 텍사스주와 플로리다주 두 곳에서 미세조류로부터 연간 40만 갤런의 에탄올을 생산함. 텍사스주의 플랜트에서는 Dow Chemical과 연대하여 인근 화학공장에서부터의 이산화탄소를 이용하여 광합성을 실시함. (3) Solazyme, Inc. 세계에서 최초로 조류 유래의 제트연료를 개발함.
- 미국 다음으로 일본의 경우 (1) 쓰쿠바대학에서 개발된 미세조류는 스쿠알렌(squalene) 및 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic acid, DHA)이라는 고부가가치의 오일도 생산할 수 있기 때문에 바이오연료 뿐만 아니라 화장품 및 서플리먼트와 같은 건강산업의 분야에서 상업화의 기대가 큼. (2) 고베대학에서는 보트리오코커스(Botryococcus) 미세조류에서 증식속도가 상당히 빠른 품종을 개발하고, IHI와 연대하여 연료의 대량제조를 위한 기술개발을 추진중임. (3) 2005년에 설립한 도쿄대학의 벤처기업 “유글레나”에서는 미세조류 “유글레나”의 대량 배양기술을 개발하여 쿠키, 라면 등 다양한 식품에 적용하는데 성공하였으며, 제트연료의 개발도 추진중임.
- 이렇듯 기존의 연구는 임의의 돌연변이체를 선발하여, 대량 배양 및 대량 추출에 초점이 맞추어

져 있으며, 산업화 부가가치가 매우 높은 의료용 단백질 생산을 위한 체계는 국제적으로 아직 미성숙 단계임. 따라서, 본 연구에서 제안된 사시사철 배양 가능한 극지 클로렐라를 이용한 재조합단백질 생산 체계 확립은 우리나라의 국제경쟁력 제고에 크게 기여할 것으로 사료됨.

2. 관련 연구동향 및 독창성(창의성)

- 현재 극지연구소의 과제 <극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석과제가 수행중이며, 본 연구는 의료 단백질 생산 기반을 확립하는 것으로 차별성이 있음.
- 미세조류를 이용한 유용단백질 생산은 아직 초보적인 단계이나, 본 연구실에서는 안정적인 유전자형질전환방법을 바탕으로 고효율 발현 시스템을 개발하여, 그 발현 효율을 증진시킬 수 있을 것으로 기대함.
- 현재까지 보고된 클로렐라에서의 재조합 단백질의 최대 생산량은 *C. ellipsoidea*에서의 rabbit neutrophil peptide 1 (NP-1) 11.4 mg/L 이며(Bai 등, 2013), 이 경우에는 옥수수ubi-ubiquitin 프로모터를 사용하였으므로 그 발현이 최적화되어 있지 않는 것으로 판단되나, 본 연구에서는 이미 확보한 ArM29B *hsp70* 프로모터를 사용할 뿐 아니라, 발현 최적화와 고효율 발현을 위한 프로모터 및 발현 체계를 개발하여 사용할 예정이므로, 재조합 단백질 생산량에서 큰 진전이 있을 것으로 기대함.

극지연구소

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 연구내용

본 연구실은 현재 3600개의 contig로 되어있는 클로렐라 유전체 서열을 Linux를 이용하여, 검색 및 활용할 수 있는 여건을 갖추었다. 따라서 이 유전체 정보를 이용하여, 해당 유전자의 서열 등을 클로닝할 수 있다. 본 연구의 전반적인 내용은 아래 4가지로 정리된다.

1) 극지 Chlorella(*Chlorella vulgaris*)의 대량 배양을 위한 조건 확립

- 극지 Chlorella의 효율적인 종속영양증식 및 대량 증식 조건을 확립하기 위하여 BG11(Blue-Green Medium) 기본배지에 Glucose 첨가에 따른 성장량을 비교 분석하고 배양 조건을 비교한다.

① 당 첨가량에 따른 성장률의 차이 검정

기본배지인 BG11에 당을 0%, 0.5%, 1%, 4% 첨가한 배지와 당이 4% 함유되어 있는 종속영양 배지에 배양하여 비교. 당이 첨가되지 않은 대조군은 독립영양배양조건이며, 당을 포함한 실험군의 경우 혼합영양배양조건에서 배양

② 성장률 측정

pH, 온도, 광도 및 CO₂ 공급에 따른 성장률을 분광분석계를 이용하여 흡광도 680 nm에서 측정하고 현미경 검경. Hemocytometer를 이용하여 세포수를 세고 각 배지에서 배양된 *C. vulgaris* 성장률을 확인

③ 5 리터 bubble-type 바이오리액터 제작 및 성장 조건 확립을 통한 CSF scale-up 생산

2) 극지 Chlorella의 형질전환 시스템 확립

- GFP와 CFP 리포터를 이용하고, 선발 마커로써 hygromycin과 kanamycin을 이용하여 다음의 네 가지 방법으로 형질전환

① Electroporation을 이용한 Chlorella 형질전환

② *Agrobacterium*-mediated Transformation을 이용한 Chlorella 형질전환

③ Particle bombardment를 이용한 Chlorella 형질전환

④ PEG를 이용한 Chlorella 형질전환

- 최적 방법을 이용한 CSF 형질전환 및 형질전환체의 성장률 등 특성 규명

① gPCR 과 IPCR을 통한 유전자 삽입 확인

② RT-PCR과 qRT-PCR을 통한 transcript level 확인

3) 극지 Chlorella의 CSF 최적 발현을 위한 뉴백터 시스템 확립

- 발현 최적화 프로모터 2종 개발

① 발현 최적화를 위하여 명암 조건과 질소 유무 조건에서 RNA-Seq을 수행하고 후보 유전자 6

종 선발

- ② 후보 유전자의 발현을 RT-PCR 및 qRT-PCR로 확인 후 최적 유전자 2종 선발
- ③ 최적 유전자 2종의 해당 프로모터 약 1.5 클로닝

- CSF 발현용 뉴백터 시스템 구축

- ① 최적화 프로모터 2종
- ② 5' UTR 및 3' UTR 선발
- ③ CSF 코돈 최적화 유전자 합성
- ④ pJKS136 벡터로 뉴백터 2종 건축

- 최종 고효율 형질전환체 3계통 선발

4) 극지 Chlorella 생산 CSF 단백질 특성 분석

- CSF 형질전환 ArM29B의 CSF 역가 분석

- ① 대조구 CSF와 Western blot을 통한 정량
- ② 백혈구 세포생장률 조사를 통한 역가 확인

- 형질전환 ArM29B로부터 CSF 단백질 정제 1 mg 생산

- ① DEAE-cellulose 및 Sepharose 컬럼을 이용한 음이온/양이온 컬럼 크로마토그래피
- ② 최종 CSF 정제 단백질 1 mg 생산

나. 실험적 접근방법



구분	연구개발 목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용*
2017년도	ArM29B의 최적 배양 시스템 구축	- 최적 배양 온도 확립 - 최적 당 배양 조건 확립	-극지 클로렐라 ArM29B의 보다 나은 배양조건 확립을 위해 온도별(4°C 와 25°C) 생장 곡선을 비교함. -BG11(Blue-Green Medium) 기본배지에 Glucose 을 0%, 0.5%, 1%, 4% 첨가한 배지와 당이 4% 함유되어 있는 종속영양배지에 배양하여 비교하여 최적농도 확립.
	KMMCC-9의 CSF 형질 전환체 특성 규명	- 서던과 IPCR에 의한 유전자 삽입 확인 - 29B hsp70 프로모터 및 코돈 최적화 CSF벡터를 사용한 형질전환 및 단백질 정량	-클로렐라의 형질전환을 위해 전기천공법(Electroporation)의 조건을 구축함 -이러한 형질전환방법을 통해 1개 이상의 유전자가 삽입됨을 확인함.
	ArM29B의 CSF 형질전 환 체계 구축	- 최적 방법을 이용한 형질 전환 및 형질전환체 특성 규명	-고체배지, 액체배지에 첨가할 항생제 최적농도 조사 -선행실험의 KMMCC-9의 원형질화 조건을 바탕으로 전기천공법 조건 확립
2018년도	발현 최적화 프로모터 2 종 개발	- 질소결핍조건에서 발현이 증가되는 유전자의 선별과 해당 유전자의 프로모터 확 득	-발현 최적화를 위하여 명암 조건과 질소 유무 조건에서 얻어진 microarray 데이터로부터 후보 유전자 6종 선발 -후보 유전자의 발현을 RT-PCR 및 qRT-PCR 확인후 최적 유전자 2종 선발

			-최적 유전자 2종의 프로모터 클로닝
	CSF 발현용 뉴백터 시스템 구축	-클로렐라에서 효과적인 CSF 발현을 위한 백터개발	- 최적화 프로모터 2종 - 5' UTR 및 3' UTR 선발 - CSF 코돈 최적화 유전자 합성 - pSK398/399 뉴백터 2종 건축
	뉴백터 시스템을 이용한 ArM29B의 CSF형질전환	-CSF 발현백터를 이용한 형질전환	- Electroporation을 이용한 형질전환
	CSF 형질전환 ArM29B 3계통 획득 및 역가확인	- 최종 고효율 형질전환체 3계통 선정	- Western blot을 통한 고발현 형질전환체 선발
2019년도	극지 Chlorella 생산 CSF 단백질 특성 분석	-클로렐라에서 CSF의 합성 및 활성 조사	- 대조구CSF와 면역블롯팅을 통한 정량 - 이량체형성 억제를 위한 CSF 유도조건 확립 - 백혈구 세포생장률 조사를 통한 역가 확인
	형질전환 ArM29B로부터 CSF 단백질 정제 1 mg 생산	- 음이온 교환 컬럼을 이용한 CSF 정제	- Hitrap Q HP column (GE Health care)를 사용하여 정제 - 정제 과정 중에 Glutathione 사용하여 단량체 수득



다. 연구결과

-2017년도 정성적 연구결과

○ ArM0029B의 최적배양 시스템 구축

- 온도별 성장곡선

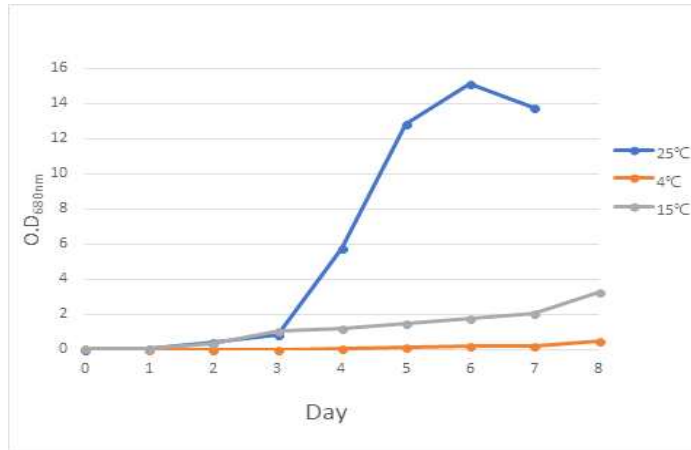


그림 1 Arm29B의 온도별 성장곡선

- 극지 클로렐라 ArM0029B의 보다 나은 배양조건 확립을 위해 온도별 성장 곡선을 비교해 본 결과, 4°C 와 25°C 에서 모두 성장 가능하였음.
- ArM0029B의 최적 성장 온도 조건은 25°C에서 가장 빠른 속도로 자랐으며, 성장 밀도도 OD₆₈₀=14 정도까지 왕성히 성장하였음.

○ KMMCC-9 의 형질전환체 구명

- 클로렐라의 형질전환을 위해, *Chlorella vulgaris* KMCC-9을 통해 높은 효율의 전기천공법 (Electroporation)의 조건을 구축하였으며 여러 가지 형질전환 방법 중 전기천공법의 형질 전환이 효율적으로 잘 이루어지고 있음이 확인되었음.
- 전기 충격을 주기 전, 효소 전처리를 하여 세포의 원형질화 조건을 검정하였음.

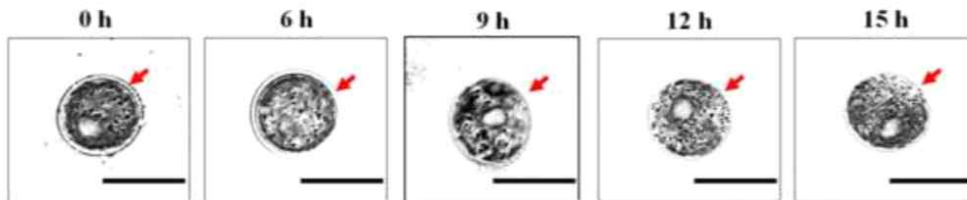


그림 2 KMMCC-9의 세포 원형질화 조건

- 위의 그림과 같이 시간이 지남에 따라서 세포벽이 점점 얇아지는 것이 확인되었으며, 12h 동안 효소 전처리(lysozyme, sulfatase, chitinase)를 하였을 때 가장 적합하였으며, 형질전환 효율 또한 좋았음.

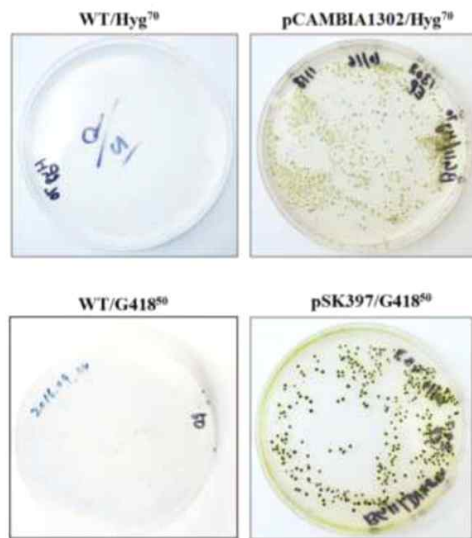


그림 3 형질전환된 KMMCC-9 콜로니

- 형질전환체 선별에 사용된 선발 마커로, Hyg⁷⁰/G418⁵⁰ 이용하여 위의 그림과 같은 고효율의 형질전환된 콜로니를 얻을 수 있었음.

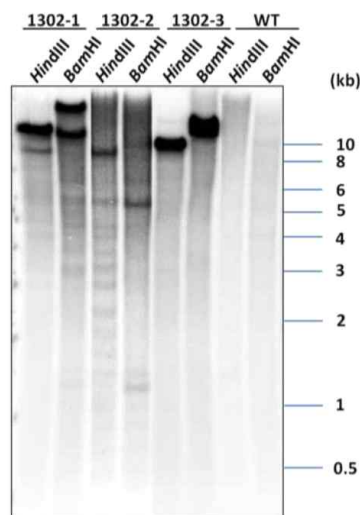


그림 4 Southern blot을 이용한 KMMCC-9의 형질전환체 확인

- 전기 천공법을 이용하여 얻은 형질전환체가 제대로 만들어졌는지 확인하기 위해 위와 같이 Southern blot을 이용하였음.
- 대조군과 형질전환체의 genomic DNA에 유전자 삽입 여부를 비교 분석하였다. 그 결과, 각 형질전환체에서 최소 1개 이상의 유전자들이 삽입되었음이 확인되었음.
- 이러한 결과를 바탕으로, “Rapid and efficient genetic transformation of the green microalga *Chlorella vulgaris*” 논문을 발표하였음 (Manu et al., 2018).

○ CSF 형질전환체 구명

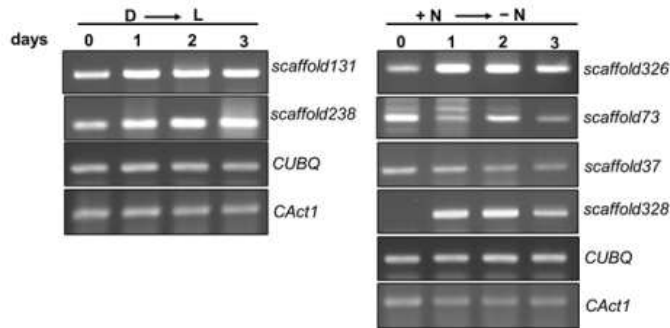


그림 5. RT-PCR을 이용하여 Nitrogen-deficiency 유전자 발현량 확인

- RNA-Seq을 통해 얻은 빛과 질소결핍 조건에서 유도되는 유전자들의 발현 검정을 통해 프로모터 2종인 CvNDI1 (scaffold326), CvNDI2 (scaffold328)을 pJKS136의 RAmY3D 프로모터에 치환하여 건축하였음.

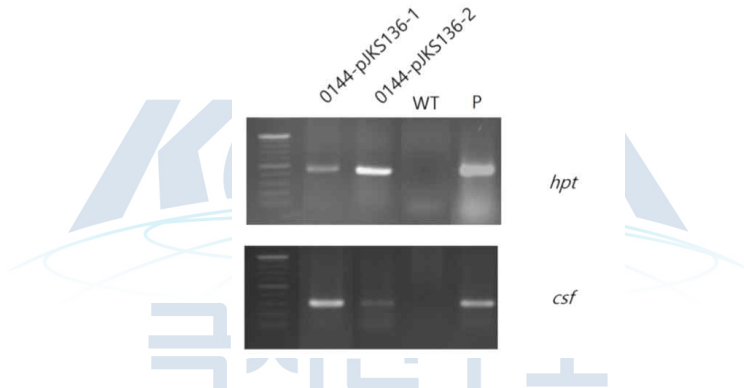


그림 6 CSF 유전자 형질전환체 확인.

WT, LIMS-PS-0144; P, positive control; hpt, hygromycin resistance gene; csf, csf gene

- 면역증강 단백질인 G-CSF를 포함하는 형질전환체를 만들기 위해, 위에서 제작된 당결핍 유도성 프로모터인 RAmY3D 프로모터에 연결된 벡터 pJKS136을 사용하여 형질전환체를 얻을 수 있었음.
- 그 결과, KMMCC-9 보다 성장속도가 빠른 *C. vulgaris* LIMS-0144 strain으로부터 RAmY3D:CSF 형질전환체 2개 (0144-pJKS136-1 과 0144-pJKS136-2)를 얻었으며 genomic DNA를 이용한 PCR을 통해 유전자 삽입을 확인하였음.

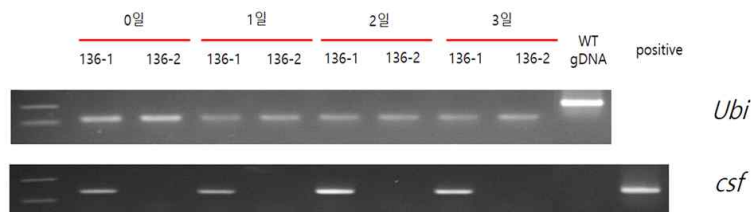


그림 7 RT-PCR을 이용한 RNA 발현 확인

- gDNA를 통해 유전자 삽입이 확인된 형질전환체를 RAmy3D 발현 배지에서 0일부터 3일간 배양 후, CSF의 유도를 RT-PCR로 확인하였음.

- 그 결과, 136-1번 형질전환체에서 0일과 1일의 CSF 유전자 발현량은 비슷하였으나, 배양 후 2일째 유전자 발현이 많이 되었으며 3일째에는 발현량이 다소 감소함을 알 수 있었음.

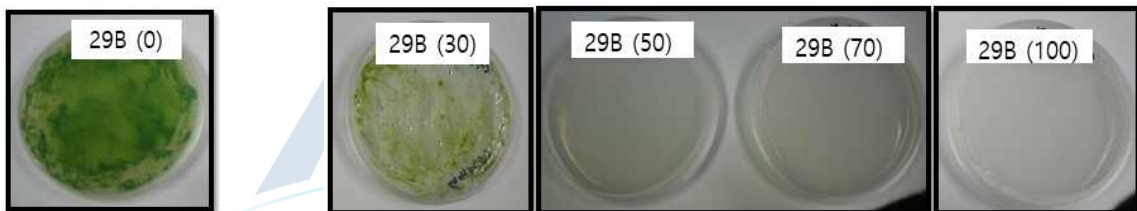
-136-2번 형질전환체는 gDNA를 이용한 PCR에서는 유전자 삽입이 확인되었으나, RNA 발현은 확인할 수 없었음.

○ ArM0029B의 CSF 형질전환체계 구축

- ArM0029B의 형질전환체 선별 조건 확립을 위해 항생제를 이용한 배지를 고체배지와 액체배지로 나누어서 진행하였음.

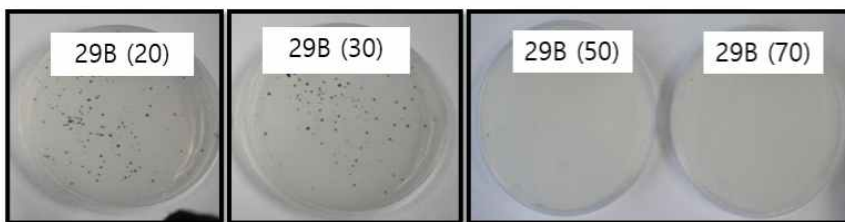
1) 고체 배지

대조구(항생제 0) <G418 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)>



- 다양한 농도의 G418 항생제가 포함된 고체 배지에서 Arm29B는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 자라지 못하였음. 따라서 G418 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 선별 가능하였음.

<Hygromycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$) >



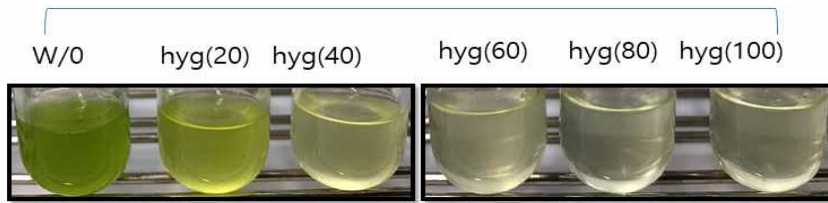
- 다양한 농도의 hygromycin이 포함된 항생제 배지에서는 hygromycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 선별 가능함.

- 그 밖에, PPT 와 Km 항생제의 경우 각각 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 내성이 강하여 항생제 선별에 적합하지 않은 것으로 나타남.

2) 액체배지

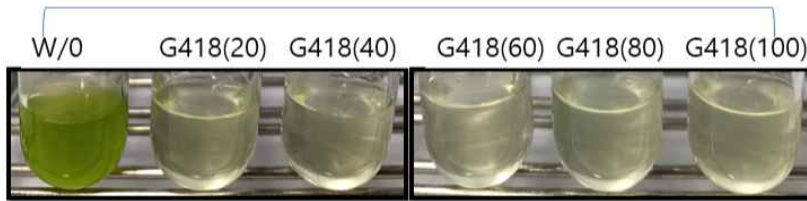
고체배지의 결과를 바탕으로 하여, 액체배지의 경우 2가지 종류의 항생제인 G418과 hygromycin 항생제를 이용하여 수행.

<Hygromycin>



- 액체 배지의 경우 고체 배지보다 더 낮은 농도인 30 µg/ml에서 선별 가능.

<G418>



- G418 항생제도 고체 배지보다 더 낮은 농도인 20µg/ml에서 선별 가능.

3) ArM0029B의 형질전환법 구축

- 형질전환을 위해 세포벽을 제거하는 원형질화 조건을 검정하고자 위의 형질전환 구축을 위해 수행했던 KMMCC-9의 원형질화 조건(Manu et al. 2018)을 바탕으로 수행함.
- 원형질화 조건을 아래와 같이 12h~15h 사이에서 세포벽의 변화를 관찰할 수 있었음.

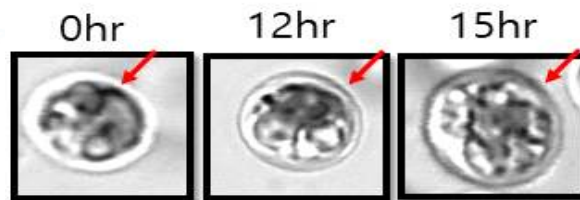


그림 8 ArM0029B의 세포 원형질화

- 세포벽 제거를 위해 3가지 효소 (Lysozyme, sulfatase, Chitinase)를 처리한 결과 12hr부터 세포벽이 다소 얇아지는 경향을 볼 수 있었음.
- 따라서 KMMCC-9 strain처럼 ArM0029B 도 12hr 동안 전처리 후 전기천공법을 사용하여 형질전환함.

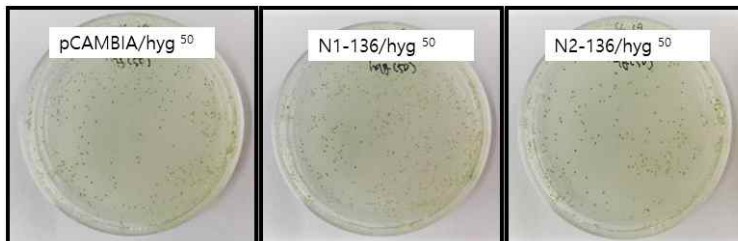


그림 9 Electroporation을 이용한 Chlorella 형질전환

- 650V, 3.5s/ms의 Electroporation 조건을 이용하여 형질전환하여, pCAMBIA1302 벡터와 pJKS136 벡터에 RNA seq을 통해 확인된 nitrogen-deficiency inducible 유전자 promoter를 삽입한 플라스미드의 형질전환체가 선별됨.
- 현재, 형질전환체 확인을 위해 각 콜로니를 액체배양 중이며 유전자 삽입 검정을 진행중임.

4) 분비 단백질 확인을 위한 secretome 분석

- 클로렐라의 secretome을 분석하여 재조합 단백질 대량 생산을 위한 기반을 닦기 위해, 유전체 서열이 3,700 contig로 존재하는 클로렐라 UTEX395를 대조군으로 이용하여 ArM0029B의 secretome과 비교 분석함.
- 그 결과, UTEX395에서 총 427개, ArM0029B에서는 53개의 단백질이 각각 분석됨.

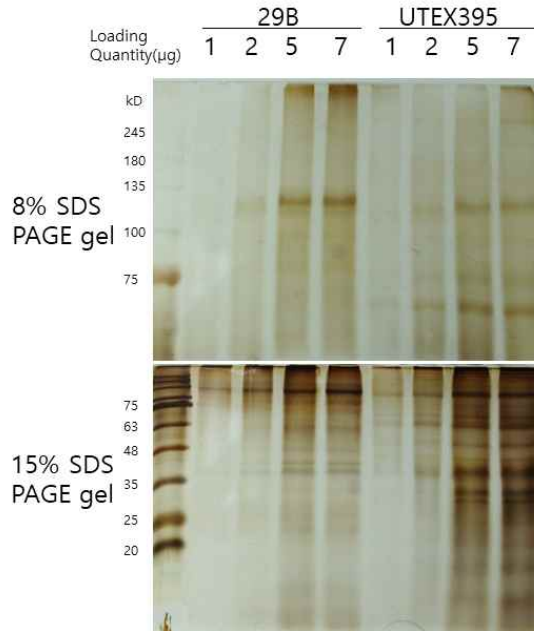


그림 10 Silver staining 분석결과

- UTEX395의 경우 총 427개 중 128개의 단백질이 Taget P program에서 세포밖으로 분비되는 것으로 예측되었고, 115개의 단백질이 signal P program에서 signal peptide를 갖고 있는 것으로 분석됨. 또한, 질량분석 데이터 값과 silver staining 결과를 통해 분석한 결과, serine/threonine-rich protein이 가장 많이 분비되는 것으로 나타남.
- ArM0029B의 경우 질량분석 데이터 값과 silver staining 결과를 통해 분석한 결과, oxidative stress defense domain이 들어있는 26kDa immunogenic protein이 가장 많이 검출됨.

5) 분비 단백질의 N-glycosylation 분석

분비 단백질의 N-당질화를 이해하기 위하여 secretome에 대한 분석을 수행하였으며, 그 결과 UTEX395(대조군) 과 ArM0029B(극지종) 모두에서 methylation 된 당사슬이 검출되었고 두 종 사이에 아래와 같이 차이가 나타남을 알 수 있었음.

- ① 29B- core와 hybrid type 당사슬에 xylose w/wo fucose가 결합된 당사슬이 검출되었고 Major 당사슬은 m/z 1387.54 [M+Na]⁺ 의 mannose4_GluNAc2_Fucose1_Xylose1_methylation1 으로 분석되었음.
- ② UTEX395- High mannose 당사슬에 메틸화된 당사슬이 검출되었고 Major 당사슬은 m/z 1743.58 [M+Na]⁺ 의 mannose8_GluNAc2 당사슬로 분석되었음.

- 현재 이들 두 종의 당질화 패턴을 자세히 분석중임.

-2018년도 정성적 연구결과

○ 발현 최적화 프로모터 2종 개발

- 발현 최적화를 위한 6종의 유전자 발현 조사 및 최적화 프로모터 2종 클로닝

- 지난 연차에 빛과 질소결핍 조건에서 유도되는 microarray 데이터(KRIBB 정원중 박사 제공)로부터 그림 5와 같은 각각의 유전자에 대한 발현 확인 실험 후 질소결핍 유도성 유전자 2종을 확보하여 CvNDI1(scaffold326), CvNDI2(scaffold328)로 명명하였으며, 각 유전자의 염기서열을 결정하고 해당 유전자의 전장서열을 동정하였음. 해당 유전자의 ATG 상류 1kb를 pJKS136의 RAmy3D 프로모터에 치환하여 이 프로모터를 이용하는 클로넬라에서 CSF발현 벡터 각각 pSK398과 pSK399를 건축하였다(그림 11).

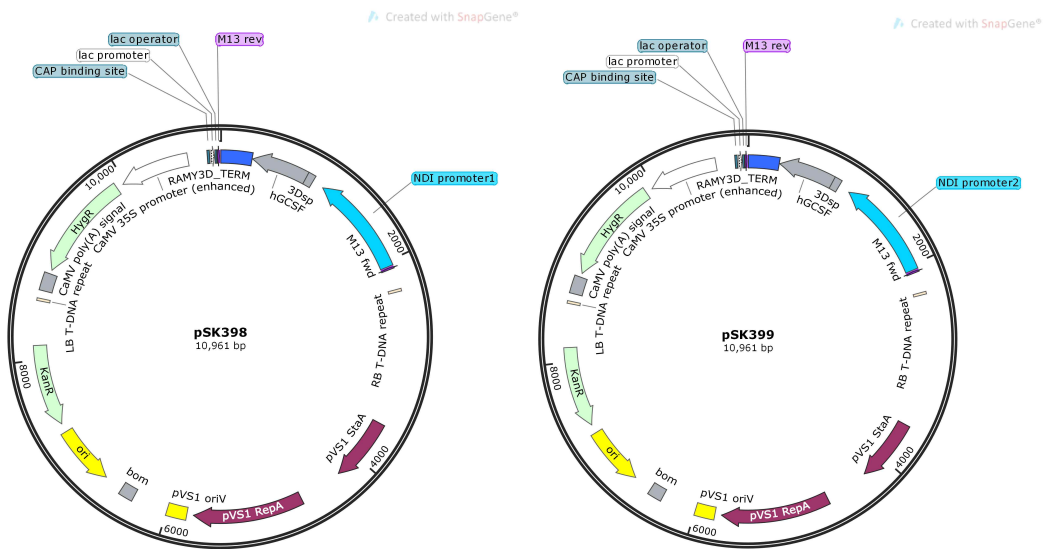


그림 11. 질소결핍 조건에서 유도되는 유전자들의 발현 검정을 통해 프로모터 2종을 갖는 pSK398과 pSK399을 제작함

○ CSF 발현용 뉴백터 시스템 구축

- 지난 연차에 분석되었던 클로렐라 분비체 분석을 통하여 다량 분비 단백질을 Mass spectrometry를 이용하여 NSAF와 EMPAI 정량화 지수를 비교하여 최다 분비단백질 총 3종을 발굴하였음.
- *Chlorella vulgaris*의 Codon usage table을 이용하여 코돈 최적화된 CSF 유전자를 합성하였고 이를 NDI1 프로모터하에 삽입한 발현 벡터 pSK401/402와 NDI2 프로모터하에 삽입한 pSK403/404 제작.
- 사람 CSF 유전자와 식물에서의 발현에 사용되었던 pJKS136 벡터의 CSF 유전자는 클로렐라의 코돈 사용 빈도와 비교하였을 때 번역 효율이 크게 떨어질 것으로 예측되었다(CAI<0.3). 따라서 *Chlorella vulgaris*의 코돈에 최적화된 CSF 유전자를 합성하였고(그림 12), 2종의 NDI 프로모터와 예측된 분비되는 단백질의 signal peptide와 terminator를 갖는 벡터 4종을 제작하였음.

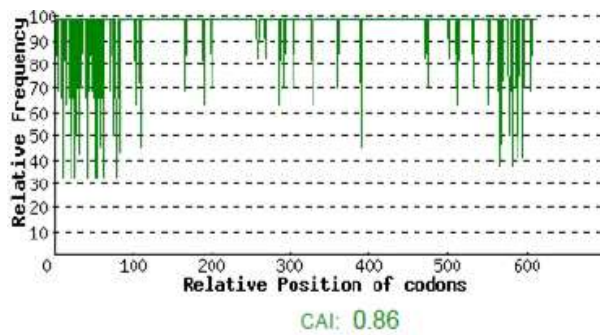


그림 12. *Chlorella vulgaris*의 코돈 사용빈도대로 코돈 최적화한 CSF의 최적화도.

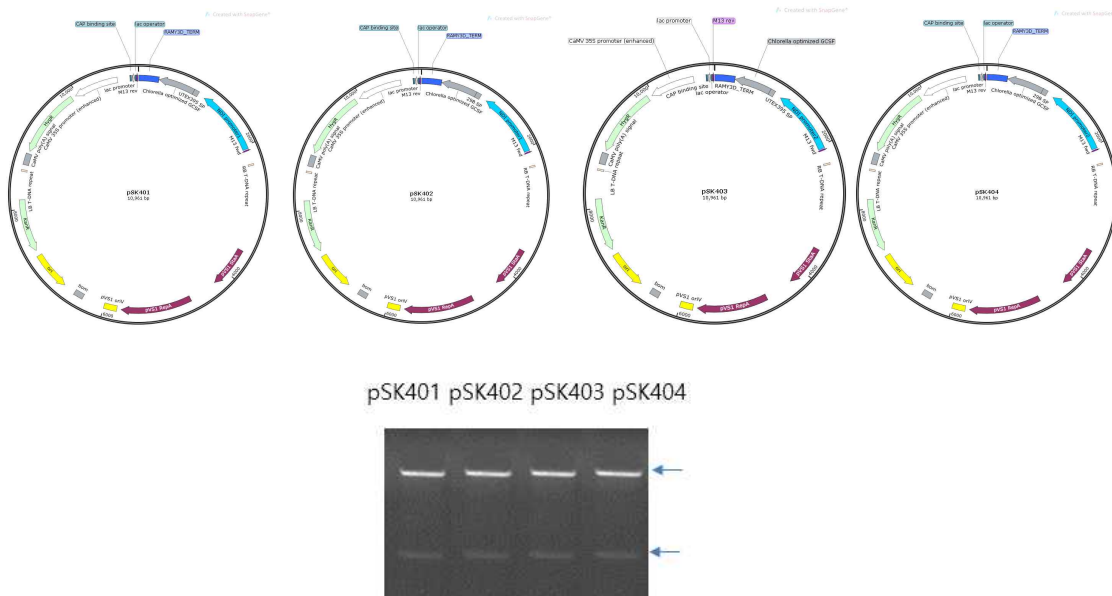


그림 13. 질소결핍 유도 프로모터(NDI1, NDI2)에 코돈 최적화 CSF가 삽입된 CSF발현 벡터 pSK401, 402, 403, 404의 벡터맵과 각각의 제한효소 *Bam*HI/*Hind*III 절편.

○ 뉴백터 시스템을 이용한 ArM29B의 CSF형질전환

- 제작한 pSK398과 pSK399를 ArM29B에 전기천공법을 이용하여 형질전환 하였으며 그림 14와 같이 csf유전자의 삽입을 확인하였음. 또한 그림 15에서와 같이 질소결핍조건에서의 발현 유도를 RT-PCR로 조사하였으며, 3일차에 발현이 크게 증가함을 확인하였음.

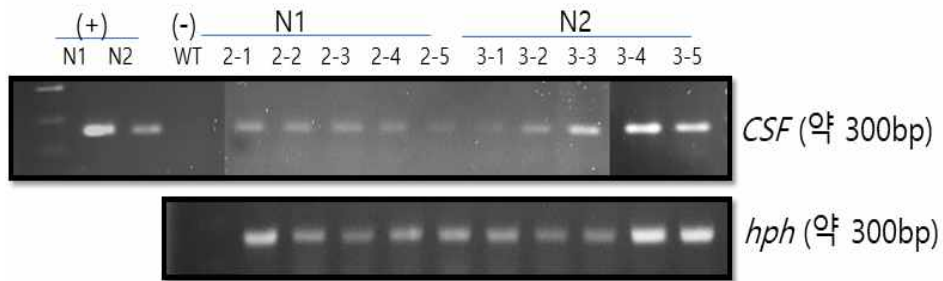


그림 14. pSK398과 pSK399의 극지 클로렐라 29B에 삽입을 확인한 gDNA PCR.

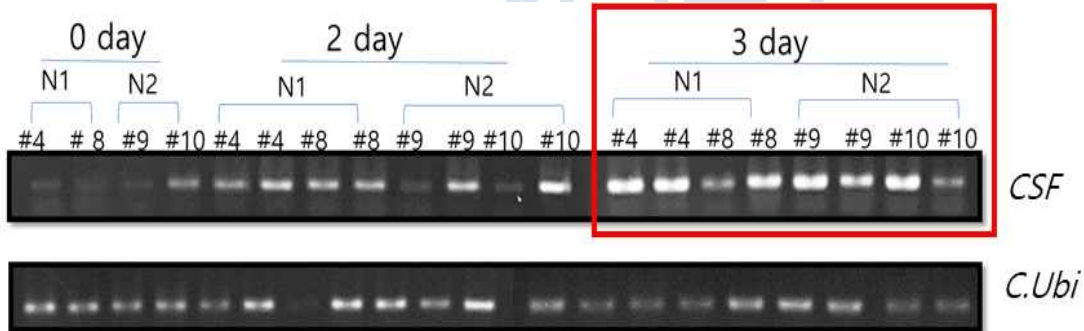


그림 15. 형질전환 클로렐라의 질소결핍 시간에 따른 CSF 발현량.

○ CSF 형질전환 ArM29B 3계통 획득 및 역가확인

- 코돈 최적화가 된 CSF를 함유하는 pSK403, 404로부터 각각 최소 3계통의 형질전환체를 얻어 내었으며 현재 단백질 분석을 위한 대량배양을 진행중임.

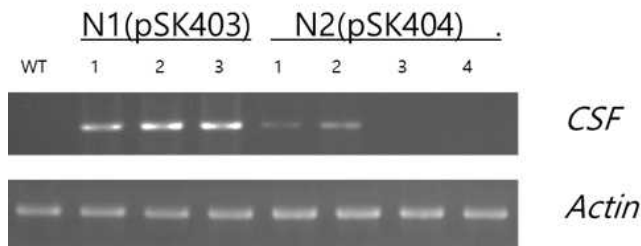


그림 16. pSK403과 pSK404를 전기천공법으로 형질전환된 ArM29B의 CSF RT-PCR

- 그림 16의 CSF 발현유도된 ArM29B 형질전환체 각각 한 계통을 정상배지에서 키운 후 질소원을 함유하지 않은 유도배지로 옮겨 하루 동안 배양 후 성장 배지와 세포를 분리하였음. 우선 이들 형질전환체들에서 CSF 단백질 합성을 확인하기 위하여, Chlorella 세포에서 추출된 단백질을 이용하여 western blot 하였으며, 그 결과 그림 17에서와 같이 대조구 (NC)와 달리 이들 형질전환체에서 CSF 단백질이 검출되었음. 이 결과는 질소결핍 시 형질전환체에서 CSF의 합성이 유도됨을 보여줌.

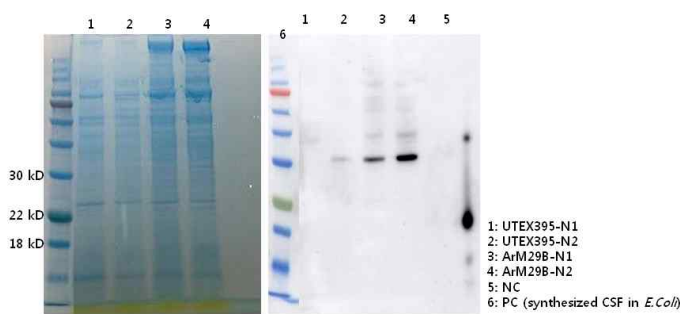


그림 17. 질소결핍배지에서 NDI1과 NDI2 프로모터에 의해 발현유도된 CSF의 단백질 합성 확인.

-2019년도 정성적 연구결과

○ 극지 *Chlorella* 생산 CSF 단백질 특성 분석

- CSF 발현유도된 ArM29B 형질전환체 각각 한 계통을 정상배지에서 키운 후 질소원을 함유하지 않은 유도배지로 옮겨 하루 동안 배양 후 성장 배지와 세포를 분리하였음. 우선 이들 형질전환체들에서 CSF 단백질 합성을 확인하기 위하여, *Chlorella* 세포에서 추출된 단백질을 이용하여 면역블롯팅하였으며, 그 결과 그림 17에서와 같이 대조구(NC)와 달리 이들 형질전환체에서 CSF 단백질이 검출되었음. 이 결과는 질소결핍 시 형질전환체에서 CSF의 합성이 유도됨을 보여줌. 또한 UTEX395에서 보다 ArM0029B에서의 단백질 발현이 더 효율적으로 일어남.

- ArM0029B-N1과 N2 라인에서 생산된 CSF가 배지로 분비되는지를 조사함. 그러한 클로렐라 라인들을 정상배지에서 7일 동안 성장시킨 뒤 유도배지로 옮겨 1일 간격으로 배지를 회수함. 회수된 배지에서 500배 농축과정을 거쳐 단백질을 회수하여 면역블롯팅을 수행함. 그림 18에서 보는 것처럼, 두 라인 모두 3일째에 가장 많은 양의 CSF가 검출됨. 29B-N1의 경우, 2일째부터 발현이 검출되었고 3일째에 가장 높게 나타남. 그러나 CSF의 양은 매우 약하게 검출됨. 반면에 29B-N2 라인은 유도 1일째부터 단백질이 검출되었고 2일째에 급격하게 증가되기 시작하여 3일째 가장 높게 나타남. 그러한 결과는 질소결핍조건에서 N2 프로모터의 활성이 N1 프로모터에 비해 효과적임을 나타냄. 또한 분비를 위해 사용한 신호펩타이드가 성공적으로 합성된 CSF를 분비함을 나타냄. 이러한 결과를 바탕으로 이 후의 CSF 발현 실험을 위해 29B-N2 라인을 최종적으로 선발함.

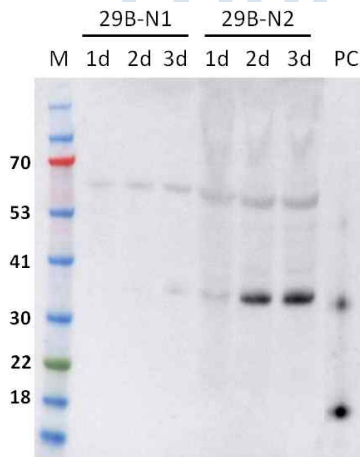


그림 18. 질소결핍배지에서 회수된 *CvNDI1*과 *CvNDI2* 프로모터에 의해 발현 유도된 CSF.

- 배양기간이 길어짐에 따라 배지에서의 영양분 결핍이 일어나므로 정상배지에서의 배양기간을 늘려 질소결핍 유도성 프로모터의 구동여부를 조사함. 이를 위해 29B-N2 라인을 정상배지에 11일 동안 배양하면서 각각 3, 5, 7, 11일째(C3, C5, C7, C11)의 클로렐라 세포를 회수하여 단백질

을 추출함. 또한 11일동안 생장을 위해 사용된 배지(M11)를 회수하여 200배 농축시킨 후, 이를 이용한 면역블롯팅 결과 배양 7일차에서 CSF가 세포에서 검출되었으며, 배양 11일째 회수된 배지에서도 미량의 CSF가 확인됨(그림 19). 이는 단백질 생산을 위한 이러한 프로모터 시스템의 간편성을 시사함.

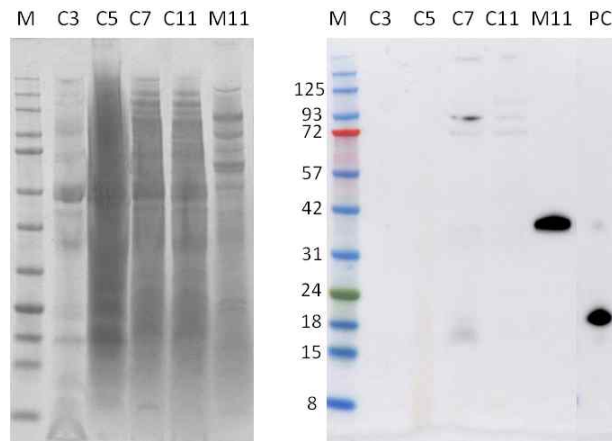


그림 19. 정상배지에서의 성장기간 동안 CSF의 발현패턴 확인.

- 면역블롯팅결과 대부분의 CSF는 모두 예상된 크기(19 kDa)의 두 배 정도(36 kDa)로 검출되었고 이는 CSF 단백질간의 중합반응에 의해 형성된 이량체 때문으로 보임. 서열 분석(<https://www.uniprot.org/>) 결과 1차 서열 내에 총 5개의 시스테인 잔기가 존재하며(그림 20A) 이 중 4개의 잔기는 이황화 결합에 참여함(그림 20B). 그러나 47번째 시스테인 잔기는 그러한 결합에 참여하지 않음(그림 21B). 따라서 이러한 시스테인 잔기가 단백질 사이의 이량체 형성에 작용할 것으로 예상되며, 그 가능성은 이전 연구에서 보고됨.

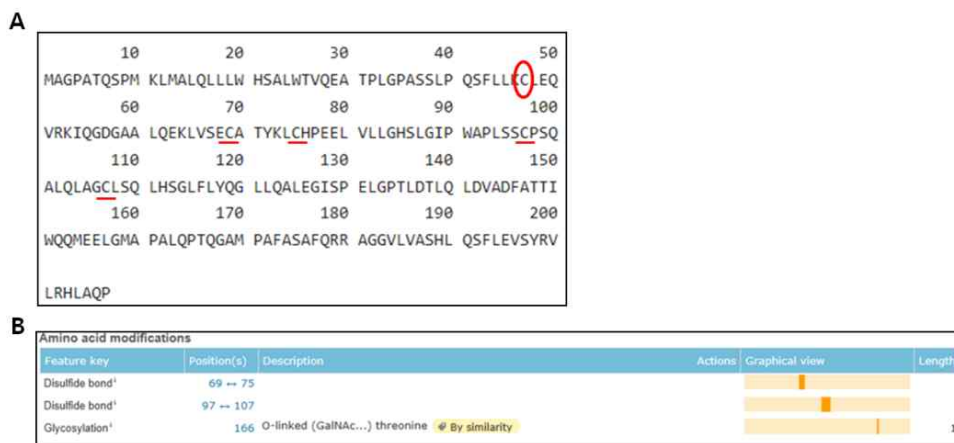


그림 20. CSF의 아미노산 서열분석 (A) 아미노산 서열과 시스테인 잔기의 위치 (B) 이황화결합에 참여하는 시스테인 잔기.

- 따라서 형성된 이량체 형태의 CSF의 단량체로의 회복을 위한 방법을 모색함. CSF는 완충용액의 온도 및 pH 상태에 따라 쉽게 구조적 변화가 일어나며 이러한 변화된 구조를 가진 상태는 쉽게 응집이 일어나는 특성을 가지게 됨. 따라서 우선적으로 농축용액을 이용하여 pH와 온도 조건을 조사함. 농축용액을 pH 3, 4, 5, 6, 7의 조건 4°C에서 2시간 처리 후 면역블롯팅을 수행함. 그 결과 단량체로의 회복은 어떠한 pH 조건에서도 발생하지 않음(그림 21A). 또한 이량체 단백질을 DTT의 첨가와 함께 섭씨 100°C에서 10분 처리 후 4°C에서 0, 6, 12, 24, 48 시간 처리하여 그 효과를 관찰함. 그 결과 열처리 후 4도에서 6시간 둔 샘플에서 매우 약하게 단량체가 검출되었으나 대부분이 이량체로 검출됨(그림 21B).

- 추가적으로 단백질의 구조적 안정성을 주는 것으로 알려진 sucrose 와 아르기닌, 그리고 글루타민의 첨가에 의한 효과를 조사하였으나 이미 형성된 이량체를 단량체로 회복시키지는 못하였음(그림 21C). 따라서 이러한 결과는 이미 형성된 이량체 CSF형태는 단량체로의 회복이 매우 어려움을 가리키며 이는 이량체의 구조적 안정성을 의미할 수 있음.

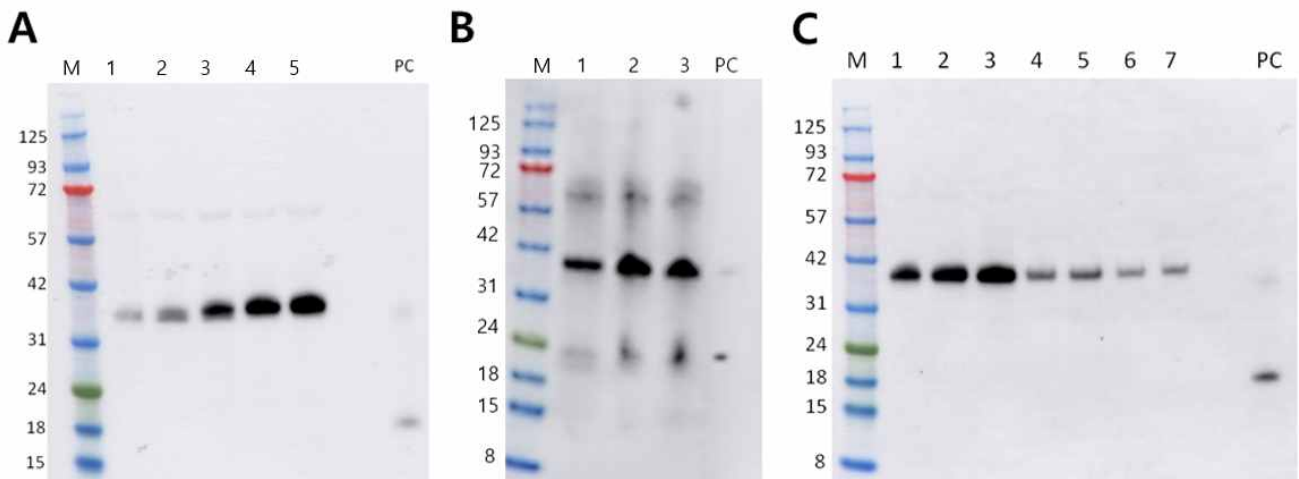


그림 21. 배지에서 추출된 이량체 CSF의 단량체로의 회복을 위한 조건 조사. (A) pH 조건에 따른 immunoblot 결과. (B) 열처리 후 4°C 배양한 시료의 immunoblot 결과. (C) sucrose와 아르기닌 및 글루타민 첨가 결과. 1, NC(어떠한 처리를 하지 않은 샘플); 2, 50mM Arg + 25mM Glu at 4°C for 1 d; 3, 50 mM Arg + 25mM Glu at RT for 1 d; 4, 0.5 M Sucrose (pH 3.5) at 4°C for 1 d; 5, 0.5 M Sucrose (pH 3.5) at RT for 1 d; 6, 0.75 M Sucrose (pH 3.5) at 4°C for 1d; 7, 0.75 M Sucrose (pH 3.5) at RT for 1d; PC, 합성된 CSF.

- 따라서, CSF의 유도 및 생산과정에서 이량체 형성을 막기 위한 방법을 모색함. 우선, CSF의 유도배양기간 동안 발생할 수 있는 산화에 의한 단백질 응집현상을 막기 위해 유도배양 조건을 변경하였음. 즉, 이제까지의 혼합영양(mixotroph) 조건(M)인 광배양 조건에서 종속영양(heterotroph) 조건인 암배양 조건(H)에서 수행하였으며, 그 결과 암배양 조건에서 성장시킨 뒤 암 조건에서 CSF 생산을 유도한 환경(H/H)에서 단량체의 형성을 확인하였음(그림 22A).

- 또한 Tween 80이 배지 내로 분비된 단백질의 구조적인 안정성을 높임으로써 단백질의 비정상적인 응집을 저해하는 것으로 알려져 있으므로, 그 효과를 조사하였음. 이를 위해 정상배지에 다른 농도의 Tween 80을 첨가한 후 7일 동안 생장시킴. 그 결과 대조구(0%)와 다르게 Tween 80을 첨가했을 때, 단량체가 검출되었음(그림 22B). 이러한 두 결과들은 단량체의 CSF의 획득을 위해서는 알맞은 생장 조건의 중요성을 의미함.

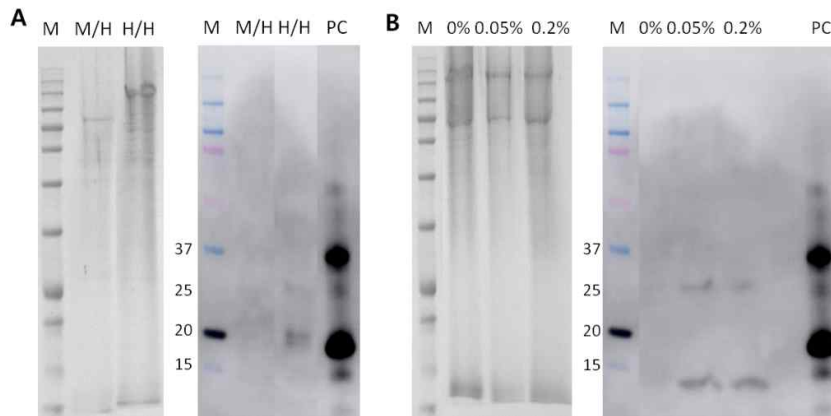


그림 22. 유도배양 기간 동안 단량체 CSF 발현 조건 조사. (A) 암 조건에서 유도 후 immunoblot 결과. M/H, 4일 동안 명 조건에서 생장 후 3일 동안 암 조건에서 유도배양; H/H, 암 조건에서 생장 후 암 조건에서 유도배양; PC, 합성된 CSF. (B) 정상배지 생장 후 유도배양 조건에서의 Tween 80 첨가 효과.

- 위의 결과를 바탕으로 종속영양 생장을 한 배양액을 암조건에서 CSF 발현을 유도하였으며, 이때 환원제인 글루타치온의 효과를 조사하였음. 그 결과 CSF 유도기간 동안 2 mM로 처리했을 때 단량체가 검출되었음(그림 23).

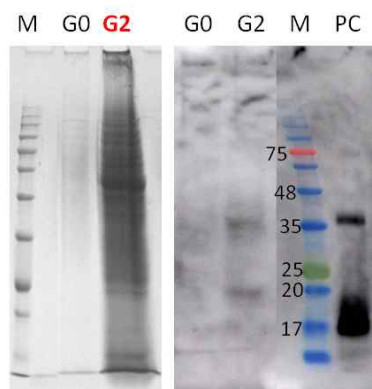


그림 23. CSF 유도배양시 단백질 응집을 막는 글루타치온의 효과. G0, 글루타치온 0 mM; G2, 글루타치온 2 mM; PC, 합성된 CSF.

- 이러한 결과를 바탕으로 클로렐라의 CSF 발현 배양 시스템을 확립하였고 이를 이용하여 CSF

의 분리 및 정제를 수행하였음.

○ 클로렐라 CSF의 정제

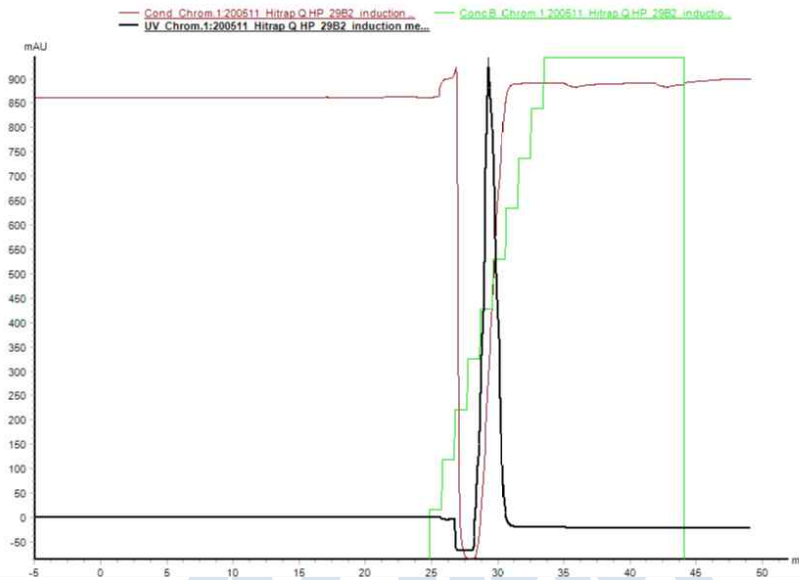


그림 24. 음이온크로마토그래피를 이용한 CSF의 정제. 녹색선, Elution buffer의 1M NaCl gradient; 검은색, UV로 검출된 CSF

- 정상배지에서 성장한 ArM0029B-N2 클로렐라를 2.0mM glutathione을 포함하는 유도배지로 옮긴 후 3일 간 CSF 발현을 유도하였음. 유도배지를 원심분리에 의해 클로렐라 세포로부터 분리한 후, β -ME(12mM)와 DTT(1mM)를 넣고, Ammonium sulfate를 50%가 되도록 첨가한 후, 밤새 Salting out을 함. 30,000 x g에서 20분간 centrifuge 하여 pellet을 얻고, 이를 Tris-HCl (pH6.0) + 20mM glutathione + 12mM β -ME + 1mM DTT 10ml에 녹임. 녹인 용액을 최종 0.22 μ m 필터링 후 AKTApure FPLC에서 Hitrap Q HP (GE Healthcare) column을 사용하여 정제하였음. Start buffer는 Tris-HCl(pH6.0) + 20mM glutathione, Elution buffer는 Tris-HCl(pH8.5) + 1M NaCl + 20mM glutathione 사용하였으며, 5CV Start buffer로 equilibration -> Sample 10ml loading -> 5CV start buffer로 Washing -> 10CV Elution buffer로 Step Elution(0%-100%, 10%씩 증가)하여 정제하였음. Peak 부분의 Elution fraction을 얻어내어 후속 실험에 사용하였음.

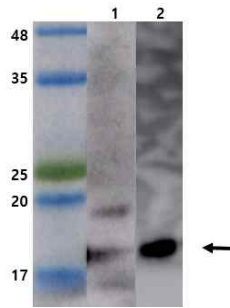


그림 25. 정제 후 Elution fraction의 western blot. 1, After purification; 2, Positive control (rhG-CSF synthesized from CHO cell)

- 위에서 얻은 peak 부분의 elution fraction을 Western blot을 수행하였음(그림 25). 1번 레인에서 단량체의 CSF가 검출이 됨. 이는 정제를 통해 얻은 peak fraction이 CSF가 맞다는 것을 의미함. 따라서 위의 정제 방법을 사용하여 CSF의 단량체를 얻을 수 있음. 정제된 단백질을 이용하여 CSF 역가 측정을 위해 세포 실험 예정임.

3차년도	1							1
------	---	--	--	--	--	--	--	---

나. 목표달성도

구 분	%	성취도 판단			특기사항 (우수성 또는 부진사유 등)
		부진	정상	우수	
2017년도 목표 달성도	100		√		
2018년도 목표 달성도	90		√		논문게재는 2018년 4월 조기게재되었고, 특허 1건이 등록되었으며, 1편이 출원되었음. 논문 2편이 작성중임. 그러나 CSF 단백질 발현의 어려움으로 역가분석이 이루어지지 않았음.
2019년도 목표 달성도	80		√		생산된 CSF 단백질의 강력한 이량체 형성으로 인해 단량체 분리에 어려움이 있어 이를 해결하는데 많은 시간이 소요됨. 따라서 이후 실험 들이 계획에 비해 연기되었고 최종 목표한 1 mg의 CSF를 획득하지는 못했음.
최종목표 대비 달성도	100		√		극지클로렐라의 효율적인 형질전환을 새로 확립하였고 이를 바탕으로 극지클로렐라에서 CSF의 발현 시스템과 정제과정을 구축하였음. 이러한 연구에서 3건의 특허를 출원하였고 이 중 1종은 해외출원을 진행중이며, 산업화를 위하여 회사(피토맵)를 설립하였고, 얻어진 특허는 피토맵으로 기술이전(기술료 약1억원)되었음.

1) 정성적 성과

- 2017년도 정성적 성과

연구개발목표	달성내용	달성도	증빙자료 설명/제출 (필요시)
○ ArM29B의 최적 배양 시스템 구축	- 최적 배양 온도/pH 확립 - 최적 당 배양 조건 확립 - 최적 배양 광/CO2조건 확립	100 %	
○KMMCC-9의 CSF 형질전환체 특성 규명	- 서던과 IPCR에 의한 유전자 삽입 확인 - 29B hsp70 프로모터 및 코돈 최적화 CSF백터를 사용한 형질전환 및 단백질 정량	100 %	
○ArM29B의 CSF 형질전환 체계 구축	- 유전자 총 등의 방법을 이용한 형질전환 - 최적 방법을 이용한 형질전환 및 형질전환체 특성 규명	100 %	

- 2018년도 정성적 성과

당해연도 연구개발목표	달성내용	달성도	증빙자료 설명/제출 (필요시)
○발현 최적화 프로모터 2종 개발	- 발현 최적화를 위한 6종의 유전자 발현 조사 - 최적화 프로모터 2종 클로닝	100 %	

○CSF 발현용 뉴백터 시스템 구축	- 프로모터, UTR 및 코돈 최적화 CSF 등을 포함하는 뉴 백터 2종 제작	100 %	
○뉴백터 시스템을 이용한 ArM29B의 CSF형질전환	- 뉴 백터 2종을 이용한 ArM29B의 CSF 형질전환	100 %	
○CSF 형질전환 ArM29B 3계통 획득 및 역가확인	- 형질전환 ArM29B의 CSF 역가확인 - 최종 고효율 형질전환체 3계통 선정	50 %	

- 2019년도 정성적 성과

연구개발목표	달성내용	달성도	증빙자료 설명/제출 (필요시)
○ 극지 Chlorella 생산 CSF 단백질 특성 분석	- 대조구 CSF와 Western blot을 통한 정량 - 백혈구 세포생장률 조사를 통한 역가 확인	50 %	
○ 형질전환 ArM29B로부터 CSF 단백질 정제 1 mg 생산	- DEAE-cellulose 및 Sepharose 컬럼을 이용한 음이온/양이온 컬럼 크로마토그래피 - 최종 CSF 정제 단백질 1 mg 생산	80 %	

2) 정량적 성과

- 2017년도 정량적 성과

구 분	목표(건)	달성 실적(건)	주저자 실적	달성도	증빙자료(제출)*	비고
국외 논문	SCI	0	0	%		
	SCIE			%		
국내 논문	SCI			%		
	SCIE			%		
특출 허원	1	1		100 %		특허 1건 등록됨.
기 타						

- 2018년도 정량적 성과

구 분	목표(건)	달성 실적(건)	주저자 실적	달성도	증빙자료(제출)*	비고
국외 논문	SCI	1	0	0 %		
	SCIE			%		
국내 논문	SCI			%		
	SCIE			%		

특허 출원	1	1		100	%		특허 1건 등록됨.
기타							

- 2019년도 정량적 성과

구분		목표(건)	달성 실적(건)	주저자 실적	달성도		증빙자료(제출)*	비고
국외 논문	SCI	1	1	주저자 1	100	%		Scientific Reports 논문게재 (2020년 7월 29일)
	SCIE					%		
국내 논문	SCI					%		
	SCIE					%		
특허 출원		1	1		100	%		
기술이전		0	1					(주)피토맵 기술이전(기술료 9,460만원)

다. 인력양성 추진 내용



1. 연도별 목표대비 달성내역

- 2017년도 인력양성 추진실적

(명)

구분	석사(석사과정)		박사(박사과정)		계	
	목표	달성	목표	달성	목표	달성
인원	1	1	1	1	2	2

- 2017년도 달성 및 활용실적

과제 참여연구원				주요 활용실적
소속	이름	전공	학위	
서강대학교 생명과학	전지형	생명과학	학사	① 과제 수행을 통해 클로렐라 형질전환체 구명 및 체계 구축 관련으로 논문을 게재함. ② 해당연구인력의 석사학위 수료 및 졸업을 앞두고 있으며, 클로렐라 형질전환 체계구축에 기여하였음.
서강대학교 생명과학	Manu Kumar	생명과학	박사	① 과제 수행을 통해 클로렐라 형질전환체 구명 및 체계 구축 관련으로 논문을 게재함. ② 해당연구인력의 박사학위 취득, 클로렐라 형질전환 체계구축에 기여하였음.

- 2018년도 인력양성 추진실적

(명)

구 분	석사(석사과정)		박사(박사과정)		계	
	목표	달성	목표	달성	목표	달성
인 원	1	0	0	0	0	0

- 2019년도 인력양성 추진실적

(명)

구 분	석사(석사과정)		박사(박사과정)		계	
	목표	달성	목표	달성	목표	달성
인 원	1	0			1	0

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 활용방안

본 연구를 통해 단백질 생산 플랫폼으로써 클로렐라의 이용 가능성을 확인하였음. 연구 결과 특허 3건을 출원하였으며, 이 특허와 다른 식물기반의 연구개발 결과들을 산업화하기 위해 주식회사 피토맵을 창립하고, 해당 특허 3건은 (주)피토맵으로 기술이전 하였음(기술료 9,460만원). 본 과제에서 개발된 기술은 더욱 발전시켜 클로렐라 기반의 생물의약품 생산 시스템을 산업화하고자 함.

나. 기대효과

해양생명공학은 1980년대에 이르러서야 비로소 본격적인 연구가 시작된 성장가능성이 높은 태동기의 신산업 분야임. 본 연구 수행을 통하여 극지 미세조류에 생명공학 기술을 접목하여 재조합단백질 생산 및 산업화의 기반이 될 수 있을 것으로 기대됨.

- 인류가 식용 목적으로 상업적으로 폐쇄 생산시설에서 대규모 생산하여 유통되는 클로렐라를 재조합 단백질 생산의 숙주세포로 사용함으로써 현행 CHO 세포생산체계의 인간 감염질병에 대한 병원균의 오염을 극복할 수 있어 상업화 가능성이 높음
- 형질전환 클로렐라를 이용한 재조합 단백질은 저렴한 생산비용으로 경제적인 재조합 단백질 개발 및 공급이 가능하여 의료산업 활성화
- 극지 클로렐라 형질전환은 저렴한 배양 비용 및 높은 재조합 단백질 생산 능력 등 많은 이점을 가지고 있어 고부가가치 재조합 단백질 시장에서 경쟁력을 갖출 수 있음
- 클로렐라 형질전환에 관한 원천기술은 생리활성 재조합 단백질 외에 다양한 항체, 백신 및 산업용 효소 등 산업에서 유용한 재조합 단백질 생산에 적용할 수 있음
- 극지 클로렐라를 이용한 형질전환시스템 개발은 처음 시도된 연구로 향후 극지 생물의 가치와 활용성을 높일 수 있을 것으로 기대됨

다. 연구종료후 성과창출 계획

구분	주요내용	의의(시사점)	비고
논문			
지적재산권	특허출원 1건 (출원번호 : 10-2019-0138178호)	클로렐라에서 유용단백질의 새로운 생산 시스템 개발	
인력양성			

기타			



제 6 장 참고문헌

- Ahn, J. *et al.* A new Arctic *Chlorella* species for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 125, 340 - 343 (2012).
- Bai LL *et al.* A New Strategy to Produce a Defensin: Stable Production of Mutated NP-1 in Nitrate Reductase-Deficient *Chlorella ellipsoidea*. *PLoS ONE* 8(1): e54966 (2013).
- Cha, T.S., Yee, W. & Aziz, A. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1771 - 1779 (2012).
- Chen, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L. & Li, W. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr. Genet.* 39, 365-70 (2001).
- Demetri, G.D. & Griffin, J.D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78, 2791-2808 (1991).
- Fox, J. First plant-made biologic approved. *Nat Biotechnol* 30, 472 (2012).
- Hawkins, R.L. & Nakamura, M. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Curr. Microbiol.* 38, 335-341 (1999).
- Jeong, H. *et al.* Plastid and mitochondrion genomic sequences from Arctic *Chlorella* sp. ArM0029B. *BMC Genomics.* 16, 286 (2014).
- Koo, J., Park, D. & Kim, H. Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Algae* 28, 379 - 387 (2013).
- Kim, D. *et al.* Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Mar. Biotechnol.* 4, 63 - 73 (2002).
- Kumar, M., Jeon, J., Choi, J. & Kim, S.R. Rapid and efficient genetic transformation of the green microalga *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 30, 1735-1745 (2018).
- Lefrère, F. *et al.* Comparison of Lenograstim vs Filgrastim administration following chemotherapy for peripheral blood stem cell (PBSC) collection: A retrospective study of 126 Patients. *Leukemia Lymphoma* 35, 501-505 (1999).
- Lumbreras, V., Stevens, D.R. & Purton, S. Efficient foreign gene expression in *chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.* 14, 441 - 447 (1998).
- Mehta, H.M. & Malandra, M. & Corey, S.J. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J. Immunol.* 195, 1341-1349 (2015).
- Niu, Y.F. *et al.* A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. *Genet. Mol. Res.* 10, 3427 - 3434 (2011).
- Ren, X.Y., Wang, H.Q., Zhu, J.B. & Kong, Q.J. Selection of *Chlorella* transformed with rotavirus VP4-ST fusion gene. *Vet. Sci. China* 40, 41 - 44 (2010).
- Souza, L.M. *et al.* Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232, 61 - 65 (1986).
- Yang, B. *et al.* Development of a stable genetic system for *Chlorella vulgaris*—a promising

green alga for CO₂ biomitigation. *Algal Res.* 12, 134 - 141 (2015).

Yang, B., Liu, J., Jiang, Y. & Chen, F. *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: progress, challenge and perspective. *Biotechnol. J.* 11, 1244 - 1261 (2016).

