

Helicobacter pylori urease subunit A 단백질의 식물체내에서의 발현

이효정¹ · 이만형 · 신동일¹ · 정일경¹ · 최성진¹ · 박희성^{*}

대구효성가톨릭대학교 약학대학, ¹대구효성가톨릭대학교 생명자원학부

Expression of *Helicobacter pylori* Urease Subunit A in Plant

LEE, Hyo Jung¹ · LEE, Man Hyung · SHIN, Dong Il¹ · CHUNG, Il Kyung¹ · CHOI, Seong Jin¹ · PARK, Hee Sung^{1*}

College of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan, 712-701, Korea

¹Division of Life Resource, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan, 712-701, Korea

ABSTRACT *Helicobacter pylori*, an etiologic agent of gastritis and peptic ulceration, produces urease which elicits a powerful immunoglobulin response in *H. pylori*-infected individuals. To establish a model plant vaccine against *H. pylori*, 750 bp *-ureA* DNA amplified by polymerase chain reaction from pH808 plasmid harboring urease gene cluster was cloned and manipulated to be expressed in tobacco plants. From the regenerated transgenic tobacco plants, *ureA* DNA integration, its mRNA expression and protein synthesis were analyzed and confirmed by standard molecular techniques. The CaMV 35S promoter-driving *ureA* construct was expressed to produce a 30 kDa protein which was identical with bacterial UreA in size when detected on immunoblot of SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: *Helicobacter pylori*, transgenic plants, urease

서 론

1983년 *Helicobacter pylori*의 발견 이래 이 균은 위염, 위궤양, 위암 등의 원인성 균으로 (Marshall and Warren 1983) 많은 주목을 받아 왔다. 이 세균의 특성은 높은 활성의 urease이며 이는 전체 세포의 6%까지 합성된다 (Hu and Mobley 1990). 한편, urease작용에 의해 생성되는 ammonia와 위 내의 HCl이 반응하여 생성된 monochloroamine은 면역세포들을 위 점막으로 결집시키고, urease자체도 염증반응세포를 결집시킴으로써 위점막 내피세포에 대한 손상을 야기한다 (Suzuki et al. 1992). Urease는 550 kDa의 multimeric enzyme으로서 66 kDa의 UreB와 30 kDa의 UreA subunit으로 구성되어 있다 (Hu et al. 1992). *H. pylori*의 urease는 표면 단백질로서 강력한 면역원으로 작용하며 위염, 위궤양

환자의 혈청에서는 urease에 대한 IgG와 IgA의 양이 감염 전보다 훨씬 그 양이 증가되어 있음이 관찰되고 있다 (Mobley et al. 1995). 따라서 *H. pylori*의 urease는 주요 항원성 결정인자 중의 하나로 백신 개발물질로서 주목을 받아 왔다. 이에 따라 urease에 대한 재조합 단백질의 생산과 경구 백신효과에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 재조합 urease를 쥐에 경구 투여한 후, *H. felis*로 감염시키면 예방 및 치료효과가 확실히 나타나는 것으로 관찰되고 있으며, urease를 생성하지 않는 *H. pylori*는 위 내에서 군락을 형성하지 않는 것으로 보고되었다 (Lee et al. 1995; Takahashi et al. 1993). *H. pylori* 감염환자를 대상으로 재조합 urease의 경구 투여에 의한 그 효과와 안전성에 대한 연구가 진행되고 있다.

근래 형질전환식물체를 식용백신으로 이용하는 연구가 상당한 진척을 보이고 있는 현 시점 (Arakawa et al. 1998; Haq et al. 1995; Mason et al. 1998)에서, 본 연구에서는 기왕의 *H. pylori*의 재조합 urease 경구투여에 의한 백신효과의 연구 등을 토대로 하여 식물체를 이용하는 식용백신의 개발 가능

*Corresponding author. Tel 053-850-3245

E-mail hspark@cuth.cataegu.ac.kr

성을 시험하기 위하여 urease subunit UreA 유전자를 담배식물체에 도입하여 그 발현과 UreA의 식물체내 생산을 검정하였다.

재료 및 방법

UreA 유전자의 PCR 증폭을 위한 DNA template로서 *H. pylori* urease gene cluster를 함유하는 pH808 (Hu et al. 1992; Hu and Mobley 1993)을 사용하였다. Primer1은 5'CCATCTAGAACGACATGGTACTCACC3', primer2는 5'AAGAGCTCACTTATC를 사용하였다. Primer1에는 Kozac box와 *XbaI* 부위를 포함시켰으며, primer2에는 *SacI*를 포함시켰다. PCR반응은 94°C 30초, 48°C 30초, 72°C 1분 반응을 30회 반복 시행하였다. PCR에 의한 750 bp DNA산물은 1.2% agarose gel로부터 Gene-Clean법 (HB101, USA)으로 추출하여 pT7Blue (Novagen, USA)에 접합시켜 (pTUREA), *E. coli* DH5 α 에 도입하였으며 (Cohen et al. 1989), LBamp 고체배지에서 선발하였다. pTUREA plasmid는 *XbaI* 및 *SacI*으로 절단 후, 750 bp의 DNA 절편을 reporter 유전자를 제거시킨 식물발현 vector인 pBI121 Δ GUS에 접합하였다 (pBIUREA). pBIUREA는 Freeze-thaw 방법에 의해 (Gelvin and Schilperoort 1988) *Agrobacterium tumefaciens* A136에 형질전환 시켰으며 kanamycin과 streptomycin이 각각 50 μ g/mL 첨가된 LB고체배지에서 선발한 후, pBIUREA의 도입여부를 제한효소처리와 전기영동으로 확인하였다.

pBIUREA의 식물체 도입은 담배 (*Nicotinana tabacum* var. Xanthi)의 엽편과 *Agrobacterium*을 동시배양하여 (An et al. 1988) 실시하였으며, 형질전환 식물체의 선발 및 재분화는 BA 2.0 mg/L, IAA 0.2 mg/L, kanamycin 100 mg/L가 포함된 MS 고체배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 수행하였다. 재분화체의 발근은 식물호르몬이 첨가되지 않은 MS 고체배지에서 시행하였다. 식물체내 유전자 도입은 CTAB을 이용한 genomic DNA를 분리 (Taylor et. 1993)한 후, 이로부터 pH808로부터의 *ureA* 유전자의 PCR cloning과 같은 조건에서의 PCR을 수행하여 1.2% agarose 전기영동으로 확인하였다. *ureA* 유전자의 발현은 guanidine-thiocyanate를 이용하여 total RNA의 분리 (Strommer et al. 1993) 후, 역전사 및 PCR에 의해 검색하였다. UreA 단백질의 추출을 위하여 2 \times SDS-loading buffer를 앞에 첨가하여 1.5 mL tube용의 pestle로 갈아 추출된 것을 사용하거나 혹은 액체질소로 급게간 후 extraction buffer (KHPO $_4$ pH 7.6, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM)에 녹여 원심분리 후 그 상등액을 사용하였다. 식물 추출액은 SDS polyacrylamide gel 전기영동 (SDS-PAGE)에 이어서 단백질의 PVDF membrane이전 후, immunoblotting으로 확인하였다. 이를 위하여 *E. coli*로부터

의 재조합 urease에 대한 토끼 항체를 1차 항체로, 2차 항체는 염소로부터의 anti-rabbit IgG (HRP-conjugated)를, 기질은 ECL (Amersham, England)을 사용하여 autoradiography를 실시하였다.

결과 및 고찰

ureA 유전자의 cloning과 담배 식물체내 도입

H. pylori urease 유전자 cluster를 포함하는 pH808의 구성 중에서 717 bp의 *ureA* DNA를 포함한 750 bp의 DNA 절편을 PCR에 의하여 증폭하고 이를 식물발현 vector로 cloning을 실시하여 pBIUREA를 제조하였다. PCR cloning을 위한 primer의 디자인은 식물발현 vector인 pBI121의 cloning 위치인 *XbaI*과 *SacI* 제한효소 위치와 또한 진핵세포에서의 단백질합성을 위한 개시 codon (ATG) 및 주변의 보존염기서열 그리고 primer GC content를 고려하였다. 즉, *ureA*의 sense 쪽은 원래의 5'-AATAGGAGAATGAGATGAAACTCAC-3' 서열을 *XbaI* 위치와 Kozac box를 도입한 5'-CCATCTAGAACGACATGGTACTCACC-3'로 변형하였고 stop codon에 이어진 antisense 쪽의 5'-CTCACTTATCGC-3'에는 *SacI* 위치를 첨가하여 5'-AAGAGCTCACTTATCGC-3'로 디자인하였다. Cloning 과정을 거쳐 얻어진 pBIUREA (Figure. 1A)는 제한효소 처리 및 agarose 전기영

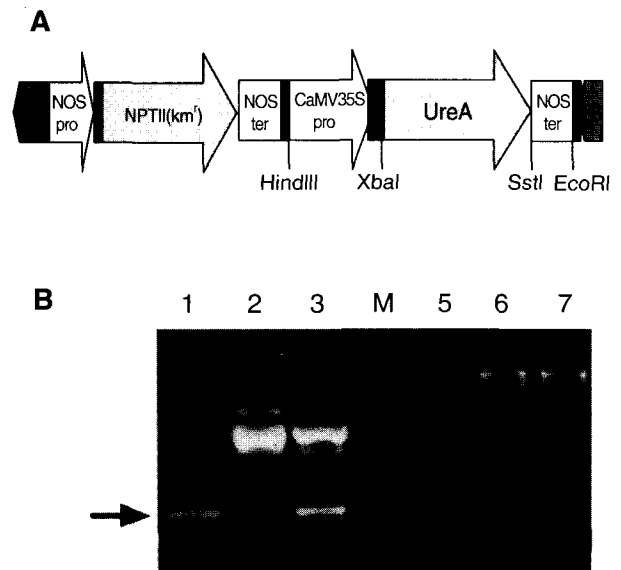


Figure 1. *ureA* construct and its restriction enzyme analysis. (A) pBIUREA: *ureA* construct in plant expression vector pBI121; (B) lane 1, *ureA* DNA by PCR (pointed by arrow); lane 2, UreA in PCR cloning vector pT7Blue (pTUREA); lane 3, pTUREA cut with *XbaI/SacI*; lane M, molecular weight marker; lane 5, pBIUREA; lane 6 and 7, pBIUREA cut with *XbaI/SacI* and *HindIII/SacI*, respectively.

동에 의해서 확인하였으며, 그 결과는 figure 1B에서 보여주고 있다. 1B에서의 lane 1은 최초의 PCR 산물로서 750 bp ureA의 크기를 보여주고 있다. 이는 재조합 vector인 pTUREA 또는 pBIUREA를 각각 *Xba*I/*Sac*I 처리를 한 경우 정확히 이들에 도입되었음을 나타내고 있다 (lane 3과 lane 6).

식물체로 *ureA* 유전자 도입은 MS배지를 이용하여 기내 배양한 담배 식물체로부터 5 mm 정도 크기의 엽편에 pBIUREA를 지니는 *Agrobacterium tumefaciens* A136과 2일간 동시배양을 하여 수행하였다. 5~6주 경과 후에 kanamycin (50 mg/L)이 첨가된 shooting medium (BA 2.0 mg/L와 IAA 0.2 mg/L가 포함된 MS고체배지)에서 잎의 형성이 충분히 이루어졌을 때, 호르몬이 첨가되지 않은 MS고체배지에서 발근을 유도하였다. 재분화된 식물체는 화분으로 옮겨 6~8주 정도 경과했을 때 이들의 잎을 채취하여 유전자 도입과 발현에 대한 검정 실험을 실시하였다.

ureA 유전자의 식물체내 도입과 발현검정

식물체에서의 *ureA*의 도입과 발현검정에 앞서 제한효소 및 부분적인 염기서열결정으로 확인한 pBIUREA로부터 단백질 발현이 정상적으로 진행되는가를 확인하기 위하여 *Agrobacterium*의 추출액을 이용한 western blotting을 수행하였다. 여러 *Agrobacterium* transformant를 24시간 28°C에서 진탕배양한 후, 이로부터의 bacterial pellet을 SDS-loading buffer와 함께 끓여 이로부터의 상등액을 UreA 단백질 확인에 이용하였다. 그 결과 *A. tumefaciens* A136 또는 pBI121를 지닌 것에서는 나타나지 않는 30 kDa의 단백질이 pBIUREA를 지닌 형질전환 균주에서는 나타나고 있다 (Figure. 2). 이로써 재조합 DNA의 UreA 단백질 발현을 일차 확인할 수 있었다.

선발된 재분화 식물체의 *ureA* 유전자의 도입을 확인하기 위하여 이들의 genomic DNA를 분리한 후, *ureA* cloning에 사용하였던 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다 (Figure. 3). 비형질전환 담배식물체에서는 200 bp 정도의 비특이적 DNA 증폭만을 보이고 있으나, 형질전환 식물체들 (lane 1-5)에서는 750 bp 크기의 DNA 산물이 확연히 나타남으로써 *ureA* DNA가 담배식물체에 도입되어 있는 것을 1차적으로 확인할 수 있었다.

Genomic DNA를 이용한 PCR 분석에 의하여 확인한 *ureA* 유전자도입 확인 식물체에 대하여 *ureA* mRNA 발현을 검정하였다. 즉, 식물체의 total RNA를 분리 후 이로부터 poly(A)+mRNA를 분리하고 oligo dT_{15mer}를 primer로 사용한 역전사반응 (RT)을 이용하여 1차 cDNA를 제조하였다. 역전사물과 *ureA* cloning에 사용한 sense 및 antisense primer를 이용하여 PCR (RT-PCR)을 실시하였으며 그 결과는 figure 4에 나타나고 있다.

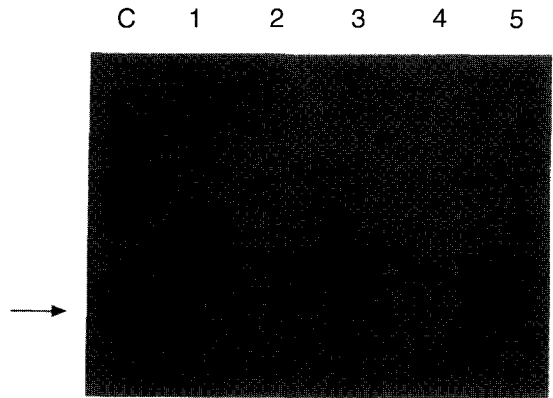


Figure 2. Western blotting of pBIUREA-transformed *Agrobacterium*. Lane 1, *Agrobacterium tumefaciens* A136; lane 2, pBI121-transformed; lanes 3, 4, 5 are independent pBIUREA-transformed *Agrobacterium*.

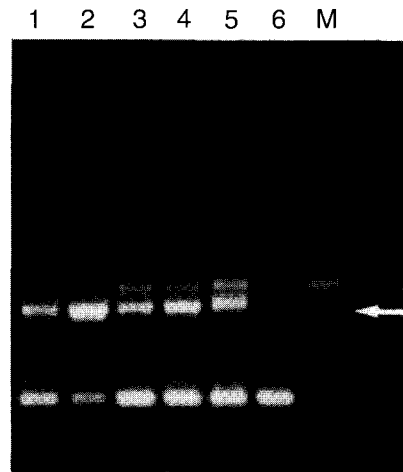


Figure 3. PCR detection of *ureA* DNA from transgenic tobacco plants. Lane 6 is from nontransgenic plant. The others are transgenic lines 2, 11, 13, 15, 16 (lane 1-5, respectively).

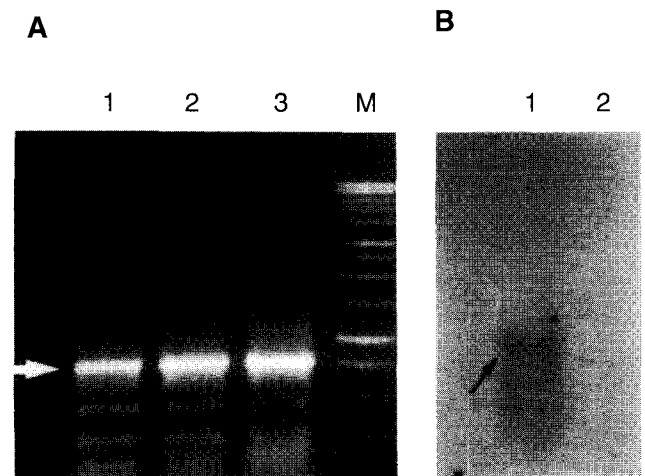


Figure 4. RT-PCR and northern hybridization of *ureA* transgenic plant. (A) RT-PCR for transgenic lines 2, 11, 13 (lane 1, 2, 3). M represents DNA molecular weight marker; (B) Arrow indicates *ureA* mRNA from transgenic line 2 (lane 1). Lane 2 represents the nontransgenic plant.

Lane 1, 2, 3 (각 transgenic line 2, 11, 13)에서 모두 확인하게 750 bp 크기의 PCR산물이 확인됨으로써 *ureA* mRNA 생성이 있음을 보여주고 있다. RT-PCR에 의해서 확인된 형질 전환체 중에서 transgenic line 2에 대한 northern blot hybridization을 실시하였다. 즉, total RNA를 formamide agarose (1.2%) 전기영동 후, hybridization을 실시하였을 때 비형질전환체 (lane 2)와는 대조적으로 transgenic line 2 (lane 1)에서는 750 bp 정도의 hybridization signal이 나타났으며 이로써 *ureA* DNA의 식물체내 mRNA 발현을 재차 확인할 수 있었다.

식물체내 *UreA* 단백질 생산

ureA 유전자로부터 그 전사가 RT-PCR 또는 northern blot hybridization에 의해 확인된 식물체로부터 *UreA* 단백질생산이 정상적으로 합성되고 있는가를 확인하였다 (Figure. 2). 형질전환 식물체 line 2, 11, 13의 잎으로부터의 단백질 추출액을 정량한 후 이를 western blotting에 사용하였다. 단백질 추출 과정에서의 2×SDS-loading buffer를 사용한 경우와 액체질소 및 extraction buffer사용하였을 때나 western blotting의 결과에는 별 차이는 없었으나, 상당수의 비특이적 단백질이 autoradiography에 의해서 관찰되었다. 더욱이 30 kDa의 *UreA* 단백질의 위치에서도 비특이적 단백질이 강하게 나타났다. 이러한 현상을 제거하기 위해 다음과 같은 immunoclearing (Sambrook et al. 1989)과 함께 다단계의 처리 과정을 통하여 *UreA*의 생성을 확인할 수 있었다. 즉, extraction buffer를 사용하여 추출한 상등액에 토끼로부터의 preimmune serum을 첨가하여 4°C에서 1시간 반응시키고 이어서 *Staphylococcus aureus* CowanX의 고정화된 세포를

첨가하여 1차 immunoclearing을 실시하였다. 이로부터의 상등액은 urease 항체와 반응시킨 후, 새로운 *S. aureus* CowanX를 첨가하여 반응시키고 원심분리를 실시하여 항원과 항체가 결합된 *S. aureus* CowanX 침전물로 회수하여 이를 SDS-PAGE에 사용하였다. 또한 1차 urease항체는 비형질 전환 담배식물체로부터의 추출단백질만의 PVDF membrane blot과 30분 정도 실온에서 반응시킨 후 western blotting에 사용하였다. 또한 형질전환 식물체로부터의 추출단백질의 membrane blot은 H₂O₂ 10% 용액으로 실온에서 10분 처리하여 사용하였다. 이러한 과정을 거쳐 상당부분의 비특이적인 반응을 제거할 수 있었다 (Figure 5). Lane C는 30 kDa의 *E. coli*로부터의 재조합 *ureA* 단백질을 보여주며 같은 위치에 transgenic line 2, 11, 13 (각각 lane 2, 3, 4)로부터의 *ureA* 단백질이 확인되고 있다. 그러나, 비형질전환 담배 식물체 (lane 2)에서는 전혀 관찰되지 않고 있다. *UreA* 단백질의 생산량에서는 transgenic line 11이 상대적으로 2~4배 높게 나타나고 있다. 단백질 양은 *E. coli*로부터의 재조합 *UreA* 단백질량 (lane 1)과 비교시, 3~5 ng 정도로 계산이 되었는데, 이는 식물체 전체 단백질량의 0.01% 정도를 차지하는 것이다.

Western blotting을 통한 *UreA* 단백질이 확인됨으로써 *H. pylori*의 주요항원으로서의 urease subunit가 식물체에서 생산이 가능하다는 것을 보여주고 있으며 담배식물체가 아닌 실제 식용 식물체로의 *ureA* 유전자 도입과 발현가능성을 제시하고 있다. 식용백신으로서의 효과를 갖기 위해서는 식물체 내에서의 발현량이 충분히 이루어져야 하는데 이를 위해 promoter의 선택, *ureA* 유전자구조의 변환 또는 signal sequence, ER retention sequence (Schouten et al. 1996) 등의 첨가에 의한 단백질의 식물체내 안정성 증진 등이 고려되어야 할 것이다.



Figure 5. Western blotting of transgenic plants. C lane means bacterial recombinant urease protein where *UreA* being pointed by arrow. Lane 1, nontransgenic; lane 2, 3 and 4 from transgenic lines 2, 11 and 13, respectively.

적 요

위염과 위궤양을 일으키는 *Helicobacter pylori*는 그 감염 환자에서 강한 항체형성을 유도하는 urease를 생산한다. 식물체를 이용하여 *H. pylori*에 대한 식용백신 모델을 제조하기 위하여 *H. pylori*의 urease 유전자를 지니고 있는 pH808 plasmid로부터 750 bp의 *ureA* DNA를 PCR에 의해서 증폭한 후 이를 담배식물에서 발현이 되도록 조작하였다. 재분화된 형질전환 식물체로부터 *ureA* 유전자의 도입과 mRNA 발현 및 단백질합성을 분석하였다. CaMV35S promoter에 의한 *ureA* 유전자의 발현은 SDS polyacrylamide 전기영동 및 immunoblot 실험에서 박테리아로부터의 재조합 단백질과 같은 크기의 30 kDa *UreA* 단백질이 생산되었음을 확인할 수 있었다.

사사 - 본 연구는 1997~1999년도 농림기술개발사업의 지원

에 의한 것입니다.

인용문헌

- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary Vectors. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (ed). Plant Molecular Biology Manual pp A3/1-A3/19 Kluwer Academic Publishers
- Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH (1998) A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. Nat Biotechnol 16:934-938
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. Science 268:714-716
- Hu LT, Foxall PA, Russell R, Mobley LT (1992) Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by *ureA* and *ureB*. Infect Immun 60:2657-2666
- Hu LT, Mobley HLT (1993) Expression of catalytically active recombinant *Helicobacter pylori* urease at wild-type levels in *Escherichia coli*. Infect Immun 61:2563-2569
- Hu LT, Mobley HLT (1990) Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. Infect Immun 58:992-998
- Lee A, Fox JG, Otto G, Murphy J (1995) A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. Gastroenterol 99:1315-1323
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. Vaccine 16:1336-1343
- Marshall BJ, Warren JR (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1:1331
- Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP (1995) Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev 59:451-480
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497
- Schouten A, Roosien J, van Engelen FA, de Jong GAM, Borst-Vrensens AWM, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J (1996) The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. Plant Mol Biol 30:781-793
- Strommer J, Gregerson R, Vayda M (1993) Isolation and Characterization of plant mRNA. In: Glick BR, Thompson JE (ed). Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology pp 49-66 CRC Press
- Suzuki MS, Miura M, Soematsu M, Fukumura D, Kurose I, Suzuki H, Kai A, Kudoh Y, Ohasi M, Tanchiya M (1992) *Helicobacter pylori* -associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. Am J Physiol 263:G719-G725
- Takahashi S, Igarashi H, Nanamura K, Masubuchi N, Saito S, Aoyagi T, Itoh T, Hirata I (1993) *Helicobacter pylori* and urease activity-comparative study between urease positive and negative mutant strains. Nippon Rinsho 51:3149-3153
- Taylor BH, Manhart JR, Amasino RM (1993) Isolation and characterization of plant mRNA. In: Glick BR, Thompson JE (ed). Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology pp 37-48 CRC Press

(접수일자 2000년 8월 12일)