한국생물공학회지 제17권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 17, No. 6, 577-581(2002)

형질전환 백합화분을 이용한 UreB단백질의 발현분석

†박 희 성 · 박 인 혜
대구가톨릭대학교 생명자원학부
(접수 : 2002. 11. 11., 게재승인 : 2002. 12. 21.)

Analysis of UreB Protein Synthesis from Transgenic Lily Pollen

Hee Sung Park† and In Hae Park
Division of Life Resource, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea
(Received : 2002. 11. 11., Accepted : 2002. 12. 21.)

In an attempt to produce recombinant proteins using the pollen enriched in some plant species, a 1.7 kb DNA encoding urease subunit B (UreB) amplified by PCR from *Helicobacter pylori* urease gene cluster in pH808 plasmid was cloned to be expressed under CaMV35S promoter in lily (*Lilium longiflorum*) pollen tubes elongated *in vitro*. Lily pollen at early germinating stage was transformed with the *ure*B DNA using *Agrobacterium via* vacuum infiltration and, incubated for a full pollen tube growth 16 - 24 h in the dark in the presence of kanamycin. DNA integration and expression in the transgenic pollen were analyzed by the standard molecular techniques and the results suggest that the pollen *in vitro* may be employed as a protein factory in a disposable fashion.

Key Words : Pollen, tansformation, vacuum infiltration, urease

서 론

식물을 이용한 재조합단백질의 생산은 형질전환식물체나 식물세포를 이용하여 활발히 연구가 이루어지고 있으며 이는 식물을 이용하는 경우, 재조합단백질 생산을 위한 시간과 비용면에서 상대적으로 매우 경제적일 수 있고 생산되는 단백질의 glycosylation이나 folding이 사람의 것과 유사하다는 점 또한 정제단백질에서의 병원성 오염원에 대한 우려가 없다는 점 등이 그 장점으로 꼽히고 있다. 그러나 식물체를 이용하는 경우 생육주기가 길어 단기간 내에 그 생산이 어렵다는 점이나 식물세포의 경우 bioreactor의 사용에 따른 비용증가가 취약점으로 지적되고 있다(1-3).

자연상태에서 식물의 화분은 수분과정과 그 수분된 화분의 신장을 통하여 정핵세포의 유전물질을 배주에 제공하여 수정이 일어나도록 하는데(5,6) 식물생명공학분야에서는 화분을 일종의 살아있는 유전자운반체로서 이용하여 형질전환과정을 거친 화분(*in vitro*)을 수정(*in vivo*)시킴으로써 단기간 내에 새로운 품종의 식물체를 용이하게 개발할 목적으로 꾸준히 연구되어 왔다(7-10). 이러한 과정에서 화분도입유전자의 확인을 위하여 일시적 유전자발현분석이 기내에서 시행되기도 하는데 화분은 설탕을 포함한 3-4 종의 단순영양원으로 이루어진 액체배지를 담은 petri dish에서 정치상태로 매우 빠르게 생장하여 1-2일 내에 수백 수천 배로 그 신장이 가능하다.

식물의 화분을 재조합단백질 생산의 목적을 위한 숙주로서 이용한 보고는 현재까지는 없었으나 대량의 화분수집이 가능함으로써, 이들에 대한 particle bombardment나 *Agrobacterium* 등을 이용한 유전자도입이 용이하게 이루어질 수 있다는 점(11,12)과 그 배양이 매우 단순하여 세포증식, 세포의 유전적 안정성의 유지, 생물반응기의 가동에 소요되는 복합적인 비용을 고려할 필요가 없다는 점 등을 고려해 볼 때, 화분을 일회성의 생물공장으로서 이용해 볼 수 있다는 가능성을 예측할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 원예산업적으로 그 재배규모가 크면서 또한 많은 양의 화분을 생산하는 백합식물을 선택하여 그 화분의 기내배양과 vacuum infiltration과 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 및 화분관신장을 통하여 항궤양 식용백신용 단백질로 잘 알려져 있는 *Helicobacter pylori*의 urease단백질의 발현을 시도하였다. 이를 토대로 재조합단백질을 초단기간내에 생산할 수 있는 가능성을 가늠하고자 하였다.

*H. pylori*는 위염, 위궤양, 위암 등의 원인성 균으로(13) 많은 주목을 받아 왔으며 이 세균의 특성은 높은 활성의 urease로서 이는 세포단백질의 6%까지 합성된다(14). Urease는 550 kDa의 multimeric enzyme으로서 66 kDa의 UreB와 30 kDa의 UreA subunit으로 구성되어 있으며(15) 이들은 표면단백질로서 주요 항원성 결정인자 중의 하나로서 식용백신 개발물질

† Corresponding Author : Division of Life Resource, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea
Tel : +82-53-850-3245
E-mail : hspark@cataegu.ac.kr

로써 그 주목을 받아왔다(16,17).

재료 및 방법

백합화분의 배양

백합(*Lilium longiflorum*)의 꽃에서 떼어낸 수술로부터 화분을 수집하였으며 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 500 mg -1 g의 백합화분을 50 mL의 화분발아배지(pollen growth media, PGM: 1.6 mM H_3BO_3, 1.8 mM $Ca(NO_3)_2$, 7% sucrose, pH 5.7)에 현탁하여 암상태로 27℃에서 기내배양하였다(18).

재조합 DNA의 제조

화분도입유전자로서 *H. pylori*의 *ure*B 유전자를 재조합한 pBI/UreB를 사용하였다. pBI/UreB의 제작을 위하여 forward primer (ATCCTAGAATGAAAAAGATTAGCA)와 reverse primer (GAGCTCCTAGAAAATGCTAAAGAG)를 준비하고 *H. pylori* urease cluster를 지니는 pH808 plasmid(대구가톨릭대 이만형 교수)를 template로 사용하여 PCR을 수행하였다(30 cycle: 94℃, 30 sec; 54℃, 40 sec; 72℃, 2 min). 결과로서 얻은 1.7 kb의 *ure*B DNA 절편은 pT7BlueR(Novagene)에 접합하여 pT/UreB를 제조하였다. pT/UreB를 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하여 얻은 1.7 kb *ure*B DNA는 식물발현벡터인 pBI121(Clonetech)을 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하여 GUS 유전자를 제거한 위치에 대체 삽입하였다(pBI/UreB).

화분의 형질전환

재조합 DNA는 freeze-thaw방법에 의하여 *Agrobacterium tumefaciens* A136에 도입 후(19) kanamycin(km)을 포함하는 LB agar 배지에서 선발하였다. 화분으로의 유전자도입을 위하여 pBI/UreB로 형질전환시킨 *Agrobacterium*을 1-2 시간 미리 배양한 백합화분과 섞어 vacuum infiltration을 실시하였다. 즉, km과 streptomycin(sm)이 각각 50 mg/L가 첨가된 LB 액체배지에서 *Agrobacterium*을 배양하고 배양액 1 mL을 원심분리 (13,000 rpm, 2 min)하여 수집한 균체를 PGM 1 mL에 재현탁한 후 백합화분의 배양액 (500 mg/50 mL)에 균일하게 섞었다. 이를 진공장치에 옮겨 진공(-80 Pa, 20 min)을 가한 후, 화분을 멸균수로 세척하고 cefotaxime(cf, 250 mg/L) 및 km(50 mg/L)이 포함된 50 mL의 PGM으로 이전하였으며 27℃에서 16-24 hr 발아신장시켰다.

유전자도입의 확인

Vacuum infiltration을 수반한 *Agrobacterium*에 의한 형질전환과정을 거쳐 발아배양시킨 화분은 액체질소를 이용하여 곱게 분말로 만든 후, CTAB추출방법(20)으로 genomic DNA를 분리하였으며 이에 대하여 1.7 kb *ure*B DNA의 제조를 위하여 사용한 primer를 이용하여 PCR을 수행하고 1.2% agarose gel상에서 확인하였다.

Northern blot hybridization

*ure*B mRNA발현을 측정하기 위하여 pT/UreB의 *Xba*I과 *Sac*I처리에 의한 1.7 kb DNA를 준비하고 [α-^{32}P]dCTP를 이용한 random primed DNA labelling kit (Roche Molecular Biochemicals)의 지침에 따라서 probe를 제작하였다. 신장화분으로부터의 RNA는 액체질소를 이용하여 분말화한 화분을 guanidine isothiocyanate를 포함하는 RNA extraction buffer를 이용하여 추출하였다(20). 이는 1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동으로 분리한 후 nytran membrane(Schleicher & Schuell)으로 옮기고 hybridization을 실시하였다. 즉 probe DNA를 hybridization 용액(5x SSC, 0.1% N-lauryl Sarcosine, 0.02% SDS, 2% blocking agent, 30% formamide)에서 42℃, 24 hr 반응시킨 후 세척(0.5xSSC, 0.5% SDS)하여 autoradiography를 행하였다(21).

Western blotting

배양화분을 액체질소를 첨가하여 분쇄하고 이를 buffer(50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.1% Tween 80, 2 mM PMSF)에 녹인 후 원심분리(14,000 rpm, 15 min, 4℃)하고 그 상등액을 SDS-10%PAGE 및 Western blotting에 이용하였다. UreB 단백질은 토끼에서 생산된 박테리아로 정제한 재조합 UreB 단백질에 대한 다중항체(22)에 반응시킨 후 ECL detection system (Amersham)에 따른 autoradiography에 의하여 결과를 얻었다.

결과 및 고찰

*ure*B의 cloning

H. pylori urease유전자 cluster를 포함하는 pH808 plasmid를 이용한 PCR에 의하여 1.7 kb ureB DNA절편을 pT7BlueR vector에 cloning 후 이를 GUS DNA를 제거한 pBI121에 subcloning하여 pBI/UreB를 제조하였다(Figure 1). PCR cloning을 위한 primer제조 시에는 pBI121의 cloning위치인 *Xba*I (*ure*B start condon을 지닌 forward primer의 upstream부위에 포함)과 *Sac*I (*ure*B stop codon에 이어서 포함시킨 reverse primer를 제작)위치를 포함시켜 실행하였다. pT/UreB의 경우 제한효소 및 부분적인 양방향 DNA sequencing에 의하여 *ure*B 염기서열을 확인하였고 pBI/UreB가 도입된 *A. tumefaciens* A136에서도 그 재조합 plasmid를 다시 분리하여 제한효소 처리에 의한 확인을 실시하였다.

백합화분의 수집, 형질전환 및 유전자도입 확인

백합화분은 그 양적인 면에서 하나의 백합꽃으로부터 대략 30 mg 정도를 수집할 수 있었으며 하나의 백합식물로부터 3-5개의 꽃을 지님으로써 100 m^2의 백합재배지로부터 1 kg 가까이의 화분수집을 예측할 수 있었다. 근처 농원에서 수집한 개화시기의 백합은 절화상태로 조직배양실(26℃, 16 hr day-light)로 옮겨 개화를 촉진하였으며 이들의 꽃밥이 성숙하여 화분이 상당부분 노출되었을 때 꽃밥을 수집하고 staineless sieve에 통과시킴으로써 화분을 따로 모을 수 있었다. 화분의 저장은 꽃밥상태로 -70℃에 보관하였고 저장기간이 길어짐으로써 발아율이 약간 감소하는 것을 관찰할 수 있었으나 일년 정도의 경과 시에도 70-80%의 발아율은 유지되었다. 기내에서의 배양을 위하여 화분을 7% sucrose가 첨가된 PGM에서 발아/신장을 시켰을 때 정상적으로 16-24 시간내에 충분한 화분관신장이 이루어지는 것을 관찰하였다

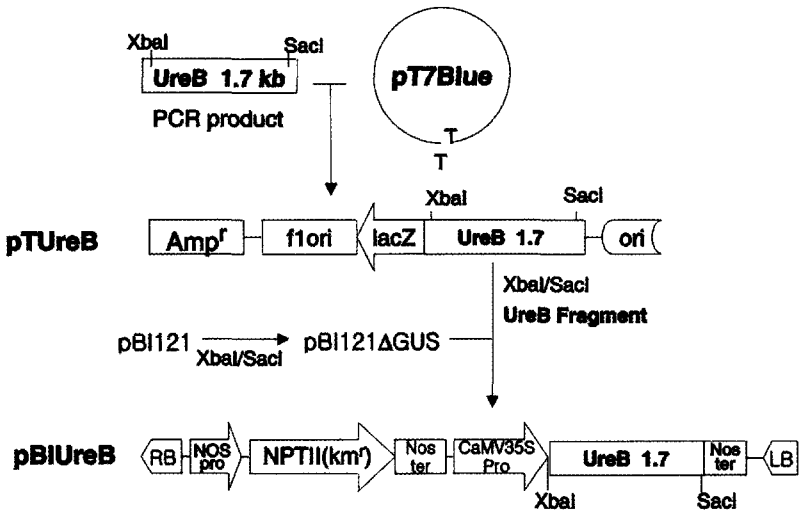

Figure 1. Construction of pBI/UreB.

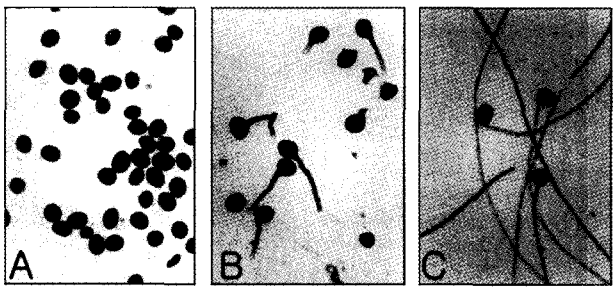

Figure 2. Pollen tube growth *in vitro*. A, B, and C represent the growth for 0, 4, and 16 hr, respectively.

(Figure 2). 화분의 형질전환을 위하여 500 mg의 화분을 PGM에 조심스럽게 현탁시킨 후 27℃에서 1-2 시간을 배양시킨 후 현미경 하에서 발아부위가 형성될 시기에 이르러서 이를 Agrobacterium 배양액과 섞어 vacuum infiltration과정을 거치는 형질전환에 사용하였다. 즉, pBI/UreB를 지니는 *A. tumefaciens* A136 세포를 PGM으로 재현탁하여 화분배양액에 첨가하였는데 이들 혼합배양액은 20분 간의 진공처리와 이어서 화분세척을 거친 후 50 ml의 PGM에 옮겨 16-24 hr 배양을 지속하였다. 이 때, 배지에는 형질전환화분의 선발적 생장을 위하여 km을 그리고 Agrobacterium의 제거를 위하여 cf를 첨가시켰다. 한편, 비형질전환 화분의 기내생장은 50-100 mg/l 농도의 km이 첨가되는 경우에서도에서 화분관신장이 크게 영향을 받지 않았으나 그 이상에서는 화분의 신장이나 신장형태에 대한 독성이 나타났다. 화분관 신장이 완성된 경우 이들은 배지에서 보통 서로 엉켜있음으로 수집하기가 용이하였는데 이들을 유전자도입 및 발현분석에 사용하였다. 유전자도입의 확인을 위하여 화분에서 유전체 DNA를 분리하고 이를 주형 DNA로 이용하여 PCR을 실시하였으며 1% agarose gel에서 그 산물을 확인하였다(Figure 3). pBI/UreB를 형질전환시킨 화분의 DNA에서는 성공적으로 1.7 kb의 DNA단편이 합성되는 것을 확인하였으며 비형질전환시킨 화분 또는 pBI121형질전환화분에서는 결과가 나타나지 않았다 (Figure 3). 이로써 Agrobacterium을 통한 vacuum infiltration

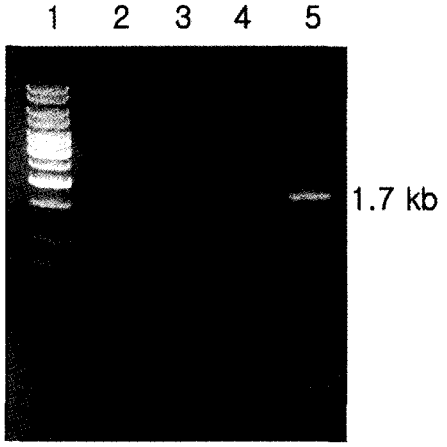

Figure 3. A PCR-amplified 1.7 kb DNA fragment from pollen genomic DNA. Lane 1 is DNA size marker. Lanes 2-5 represent the no transformed, Agrobacterium-treated, pBI121 transformed, and pBI/UreB trasnformed pollen, respectively.

에 의하여 화분으로의 유전자도입이 확인되었는데 다만 화분의 특성상 화분관의 핵으로의 도입 또는 화분관내 정핵세포 핵으로의 도입인지는 규명하지는 않았다. 그러나 기타의 식물체를 이용한 형질전환연구의 경우 양쪽 모두에 도입되는 것으로 추정하고 있는 바, 본 연구실에서의 pBI121의 도입 및 X-Gluc을 이용한 GUS유전자의 histochemical staining(23)을 이용한 발현분석에서는 신장화분에 골고루 그 푸른 색의 결과가 나타남으로써 적어도 화분관의 핵내에 *ure*B유전자가 성공적으로 도입되는 것으로 추정하였다.

형질전환 백합화분에서의 UreB의 발현: Northern blot hybridization

pBI/UreB를 도입한 화분에서의 *ure*B 유전자의 발현을 통한 mRNA의 생성은 northern blot에 의하여 확인하였다 (Figure 4). Vacuum infiltration과정을 모두 거친 비형질전환 화분, *A. tumefaciens* A136 처리화분, *A. tumefaciens* A136/pBI121을 도입한 화분에서의 total RNA를 분리하여 이

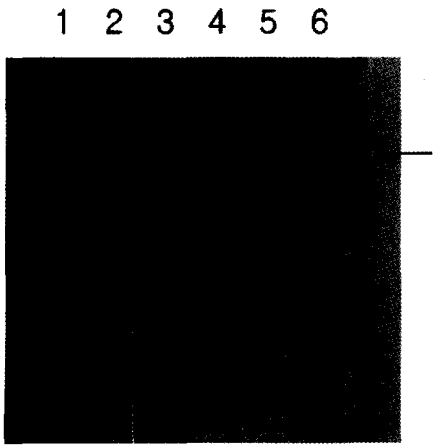

Figure 4. *ure*B mRNA expression in pollen. Lnae 1 is RNA size marker. Lanes 2-6 are *ure*B DNA, the non-transformed pollen, Agrobacterium-treated, pBI121 transformed, and pBI/UreB trasnformed, respectively. Arrow indicates the *ure*B mRNA.

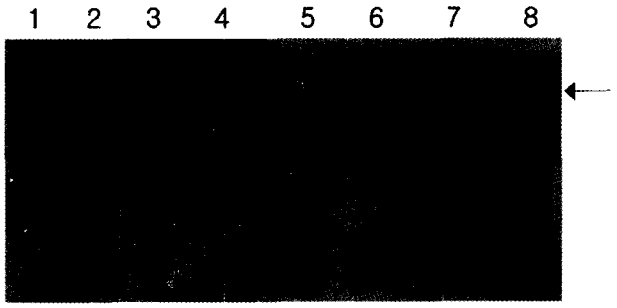

Figure 5. Western blot analysis of UreB protein synthesis from pollen. Lane 1-4 are the non-transformed pollen, pBI121 transformed, pBI/UreB transformed (5 μL of total protein sample loaded), pBI/UreB transformed (20 μL). Lane 5-8 represents the purified UreB-containing urease protein at the amounts of 15, 10, 5, 100 μg, respectively. Arrow indicates UreB protein.

를 30 μg 정도를 1% formaldehyde gel에서 분리하여 Northern blot hybridization을 통한 분석을 실시하였는데 이들로부터의 *ure*B mRNA생성은 관찰되지 않았다. 그러나 pBI/UreB도입화분으로부터의 RNA에서는 1.7 kb *ure*B mRNA의 생성을 관찰할 수 있음으로써 CaMV35S promoter에 의한 유전자발현이 신장화분 내에서 정상적으로 일어남을 확신할 수 있었다.

Western blotting에 의한 UreB 단백질생성의 확인

화분으로부터 추출한 단백질을 UreB 단백질분석에 이용하였다. 추출단백질은 SDS-10%PAGE로 분리 후 Hybond-P membrane에 단백질을 옮겨 Western blotting 분석에 사용하였다. 일차 항체는 토끼의 anti-*H. pylori* urease IgG, 2차 항체는 염소의 anti-rabbit IgG HRP-conjugate를 사용하여 ECL system으로 그 결과를 관찰하였다(Figure 5). *E. coli*로부터 정제한 *H. pylori*의 재조합 urease단백질을 표준으로 사용하였으며(UreB, 67,000 Da) 그 비교로서 vacuum infiltration과정을 모두 거친 비형질전환 화분, *A. tumefaciens* A136 처리화분, *A. tumefaciens* A136/pBI121 처리화분에서는 유사한 위치에 항체인식단백질이 포착되지 않았으며 *A. tumefaciens* A136/pBIUreB도입 화분에만이 관찰될 수 있었다. 따라서 UreB단백질의 생성이 확인되었는데 다만 그 발현량에 있어서 densitometry 분석에 의할 경우 화분관의 전체 수용성단백질의 0.01-0.05% 정도로 나타남으로써 발현증대방법이 강구되어야 할 것으로 본다. 한편, 식물체로부터의 조추출단백질을 이용한 western blotting과 비교 시, 신장화분의 단백질은 거의 비특이적 항원항체반응이 관찰되지 않았다.

본 연구에서는 백합화분의 형질전환과 기내배양을 통한 항궤양백신으로의 개발이 기대되는 *H. pylori*의 UreB 단백질의 생성을 확인함으로써 화분을 일회성의 단백질생산공장으로의 이용 가능성을 제시하였다. 현재까지 개발된 생물공장의 개념은 모두 형질전환된 세포나 생물체를 지속적으로 유지하면서 세심한 관리 및 조절을 통한 이들의 증식과 생장에 따라 그로부터 재조합단백질을 생산하는 것이었다. 그러나 자연상태의 화분은 필요한 경우에서만 형질전환을 실시하고 1-2일 내에 모든 배양작업을 마침으로써 지속적인 관리가 전혀 필요치 않다. 본 연구에서는 백합화분을 이용하였으나 화분을 대량으로 생산할 수 있는 식물도 충분히 재조합단백질의 생산을 위한 일회성 공장으로의 사용이 가능할 것으로 예측하고 있다.

요 약

풍부한 식물의 화분을 이용하여 재조합단백질의 생산연구를 위하여 UreB 단백질 정보를 지닌 1.7 kb DNA를 *Helicobacter pylori* urease gene cluster를 지니는 pH808로보터 PCR을 통하여 증폭하고 이를 CaMV35S promoter에 연결하여 백합(*Lilium longiflorum*)화분내로 도입하고 기내배양을 실시하였다. 발아초기의 화분을 Agrobacterium과 함께 진공침윤시켜 *ure*B DNA를 형질전환시키고 kanamycin을 지니는 화분배지에서 16-24시간 배앙하여 완전한 화분관신장을 이루도록 하였다. 이들 형질전환화분의 유전자도입 및 발현을 분석하였으며 그 결과 기내배양하는 하분을 일회성의 단백질공장으로 이용할 수 있다는 가능성을 제시하였다.

감 사

본 연구는 2002년도 대구가톨릭대학교의 일반연구비지원에 의하여 수행하였음.

REFERENCES

1. Doran, P. M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures, *Curr. Opin. Biotech.* **11**, 199-204.
2. Giddings, G. (2001), Transgenic plants as protein factories, *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 450-454.
3. Giddings, G., G. Allison, D. Brooks, and A. Carter (2000), Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals, *Nature Biotechnol.* **18**, 1151-1155.
4. Mercenier, A., U. Wiedermann, and H. Breiteneder (2001), Edible genetically modified microorganisms and plants for improved health, *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 510-515.

5. McCormick, S. (1993), Male gametophyte development, *Plant Cell* **5**, 1265-1273
6. Taylor, L. P. and P. K. Helper (1997), Pollen germination and tube growth, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 461-491.
7. Aronen, T. S., T. O. Nikkanen, and H. M. Haggman (1998) Compatability of different pollination techniques with microprojectile bombardment of norway spruce and scots pine pollen, *Can. J. For. Res.* **28**, 79-86.
8. Bethtold, N., J. Ellis, and G. Pelletier (1993), *In Planta Agrobaterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, *CR. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**, 1194-1199.
9. Haggman H, M., T. S. Aronen, and T. O. Nikkanen (1997), Gene transfer by particle bombardment to norway spruce and scots pine pollen, *Can. J. For. Res.* **27**, 928-935.
10. Hess, D., K. Dressler, and R. Nimmrichter (1990), Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelete of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Sci.* **72**, 233-244.
11. Fernando, D. D., J. N. Owens, and S. Misra (2000), Transient Gene Expression in Pine Pollen Tubes Following Particle Bombardment, *Plant Cell Rep.* **19**, 224-228.
12. Hamilton, D. A., Y. H. Schwarz, J. Rueda, and J. P. Mascarenhas (2000), Comparison of transient and stable expression by a pollen-specific promoter: the transformation results do not always agree, *Sex. Plant Reprod.* **12**, 292-295.
13. Marshall, B. J. and J. R. Warren (1983) Unidentified curved Bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* **1**, 1331.
14. Hu, L. T. and L. T. Mobley (1990), Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*, *Infect. Immun.* **58**, 992-998.
15. Hu, L. T., P. A. Foxall, R. Russell, and L. T. Mobley (1992), Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by *ure*A and *ure*B. *Infect. Immun.* **60**, 2657-2666.
16. Lee, A., J. G. Fox, G. Otto, and J. Murphy (1995), A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis, *Gasteroenterol.* **99**, 1315-1323.
17. Takahashi, S., H. Igarashi, K. Nanamura, N. Masubuchi, S. Saito, T. Aoyagi, T. Itoh, and I. Hirata (1993), *Helicobacter pylori* and urease activity-comparative study between urease positive and negative mutant strains, *Nippon Rinsho* **51**, 3149-3153.
18. Yokota, E., K. Takahara, and T. Shimmen (1998), Actin-bundling protein isolated from pollen tubes of lily, *Plant Physiol.* **116**, 1421-1429.
19. Gelvin, S. B. and R. A. Schilperoort (1988), Plant Molecular Biology Manual, pA3/1-A3/19, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
20. Glick, B. R. and J. E. Thompson (1993), Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, p37-64, CRC Press, Florida.
21. Sambrook J. and D. W. Russell (2001), Molecular Cloning: a Laboratory Manual, p7.4, Cold Spring Harbor Lab Press, New York.
22. Lim, Y. M. (1997), Purification of Active Recombinant *Helicobacter pylori* Urease and Purification of Polyclonal Antibody, M. S. Thesis, Dept. of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Kyungbuk.
23. Jefferson, R. A. (1987), Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system, *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.