

기내 화분배양을 이용한 Tissue Plasminogen Activator 발현분석

박인혜 · 박희성
대구가톨릭대학교 생명자원학부
(접수 : 2002. 11. 18., 게재승인 : 2002. 12. 24.)

Analysis of Tissue Plasminogen Activator Expression using Pollen Culture *in vitro*.

In Hae Park and Hee Sung Park †
Division of Life Resource, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea
(Received : 2002. 11. 18., Accepted : 2002. 12. 24.)

In an effort to use plant biotechnology for the production of biopharmaceuticals, pollens collected from lily (*Lilium longiflorum*) were grown *in vitro* and transformed with a PCR-amplified 1.7 kb cDNA encoding human tissue plasminogen activator (tPA) using *Agrobacterium* via a vacuum infiltration process. Western blotting showed that transgenic lily pollen tubes selected on kanamycin for 16 hrs expressed a tPA protein with a size similar to the human standard, suggesting their possible use as a disposable host for rapid foreign protein production.

Key Words : Lily pollen, transformation, tissue plasminogen activator, plant biotechnology

서론

형질전환식물의 연구는 전통적으로 작물의 특성개량에 맞추어져 왔으나 근래에는 생물의약품 단백질의 생산 목적을 위해서도 활발히 진행 중에 있다. 형질전환식물체를 이용한 시스템과의 *E. coli*, 효모 또는 동물배양세포를 이용한 단백질 생산시스템과의 비교에서 시간, 비용, 유지, 독성물질의 오염 등 다양한 면에서 많은 장점이 부각되고 있으며 대량으로 요구되는 재조합단백질생산에 적합할 것으로 기대되고 있다(1-4). 그러나 식물시스템은 식물의 생장기간이 길어 신속한 생산체계로서는 부적합하며 또한 GMO의 문제점이 지속적으로 제기되고 있는 상황이다.

자연에서의 화분은 용성의 유전물질을 지니면서 이를 수분과정에서의 화분관신장의 유도개시 및 배주까지의 신장을 거쳐 난세포에 전달함으로써 수정이 가능하도록 한다(5,6). 한편, 화분을 일종의 살아 있는 vector로 인식하여 식물체를 대상으로 일반적으로 시행되고 있는 *Agrobacterium* 또는 particle bombardment-mediated transformation 방법에 의하여 외부 DNA를 도입한 형질전환화분을 암술에 인공수분시킴으로써 새로운 식물체의 개발에 이용하고 있는 바, 이러한 분자육종연구는 다양한 식물체를 대상으로 진행하여 왔다

(7-14). 이러한 과정 상에서 형질전환시킨 화분의 확인을 위하여 기내배양 및 일시적 발현분석은 필수적으로 행하여 지는데(9,15,16) 화분의 기내배양은 매우 용이하고 빠르게 그 수행이 가능하다. 화분은 1-2일 내에 적당한 온도와 sucrose, boric acid, calcium nitrate 또는 식물에 따라 1-2가지 성분이 보태어 진 배지에서 수백 - 수천 배로의 신장이 이루어진다. 이러한 기내생장의 특성과 형질전환의 용이성을 생각할 때, 화분을 필요 시에만 이러한 과정을 수행함으로써 목적하는 단백질의 생산을 가능하게 하는 일회성 용도의 biofactory로서도 예측 가능하다. 이는 생물반응기에서 지속적으로 유지배양하는 식물세포배양과는 그 의미가 전혀 다르다. 본 연구에서는 백합(*Lilium longiflorum*)으로부터 대량으로 생산되는 화분을 이용, 이를 대상으로 tissue plasminogen activator (tPA) 단백질 정보를 지니는 cDNA를 vacuum infiltration과정 및 *Agrobacterium*에 의한 형질전환을 시도하고 기내에서 신장된 화분에서의 단백질발현분석을 시도하였다. 사람의 tPA는 527 amino acid의 당화가 되어 있는 serine protease로서 이는 인체의 생리면에서 가장 중요한 plasminogen 활성인자로 대표되고 있다. 재조합 tPA 단백질의 생물공학적 생산은 CHO cells(17,18), *E. coli*(19), 형질전환동물(20)로부터 보고되어 있다.

형질전환백합화분의 분석에 앞서서 pETPFR plasmid (ATCC #40403, tPA 및 DHFR cDNA 포함)로부터 증폭한 1.7-kb DNA에 대하여 대장균발현시스템을 이용한 tPA 단백질 정보를 확인하였다. PCR(30 cycle 반응: 94°C, 30 sec; 53°C, 30 sec; 72°C, 2 min)을 위하여 forward primer(*Xba*I site를

† Corresponding Author : Division of Life Resource, Catholic University of Daegu Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea
Tel : +82-53-850-3245, Fax : +82-53-850-3459
E-mail : hspark@cataegu.ac.kr

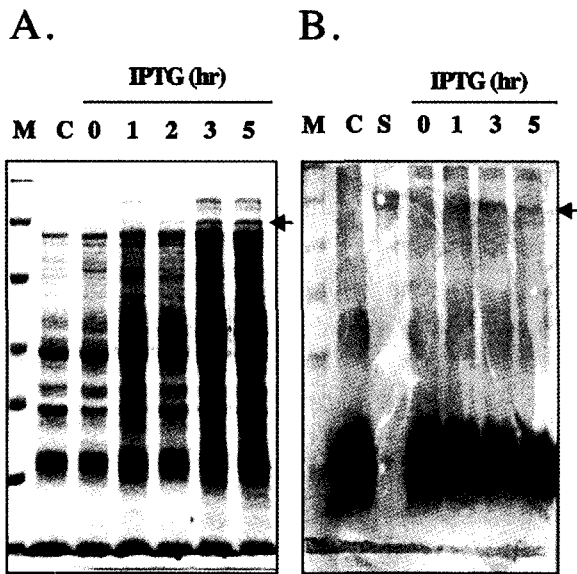


Figure 1. IPTG-induced tPA expression in *E. coli*. A. SDS-PAGE of inclusion bodies from IPTG-treated *E. coli* cells harboring pSK/tPA for 0 - 5 hrs: M, protein size marker; C, pBluescript SK II transformed B. Western blotting of the membrane-transferred bacterial proteins: S, the standard human tPA.

tPA 염기서열의 개시 codon에 연결시킨 5-AATCTAGACATG GATGCAATGAAGA-3)와 reverse primer (종결 codon에 이어 *SacI* site를 포함하는 5-ATGATCTCTGGTCACGGTCGCATG TT-3)를 사용하였다. PCR product는 pT7BlueR(Novagen, Darmstadt)에 접합시켜 *E. coli* DH5에 형질전환하도록 하였다(pT/tPA). pT/tPA의 확인은 restriction mapping과 또한 T3 및 T7 promoter지역을 primer로 이용한 양방향에서의 부분적인 DNA 염기서열분석을 통하여 확인하였는데 기존의 보고와 동일하게 나타났다(21). 이는 pBluescriptII SK (Stratagene, CA)의 *XbaI*과 *SacI* 위치에 subcloning을 실시하여 pSK/tPA를 얻었으며 이 때 숙주는 *E. coli* XL-1Blue를 이용하였다. 이러한 pSK/tPA를 지닌 박테리아세포들은 LBamp 배지에서 대수기 초기단계까지 배양한 후(OD₆₀₀ = 0.5), IPTG(2 mM)를 처리하였으며 적절한 시간까지 배양하여 원심분리 (12,000×g, 5 min)에 의하여 균체를 수집하였다. 균체는 추출 buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.1% Tween 80, 2 mM PMSF)에 현탁시킨 후 초음파분쇄 (2 min, 3x)하였다. 이로부터의 inclusion bodies는 원심분리 (12,000×g, 20 min, 4°C)를 통한 침강물질로서 수확하였으며 이를 SDS-12% PAGE와 immuno-blotting(22)에 의하여 단백질생성을 분석하였다. SDS-PAGE 분석에서는 IPTG 1 hr 처리에서 약 66,000 Da 단백질의 유도발현이 확실히 관찰되었으며 이는 실험상에서 처리된 5 hr까지 지속되었다(Figure 1). 사람의 melanoma 세포배양액으로부터 생산된 single-chain tPA standard(Sigma, Mo)는 유도발현된 단백질보다 약간 그 크기가 큰 것으로 나타났다. 제작된 pSK/tPA으로부터의 LacZ-fused tPA 단백질은 약 66,000 Da으로 계산할 수 있었다(LacZ α -fragment의 30개 amino acid와 tPA의 562개 amino acid). SDS-PAGE에서 분석한 inclusion body의 단백질은 PVDF membrane로 전이하여 tPA에 대한 단일항체(mAb-tPA, Biotest, ME)와 alkaline

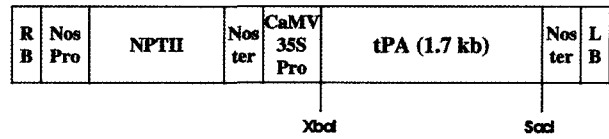


Figure 2. pBI/tPA construct. LB and RB, left border and right border sequence; NPT II, neomycin phosphotransferase II; Nos Pro and Nos Ter, nopaline synthase gene promoter and terminator.

phosphatase-reacting chromogenic substrate(Western Blue Stabilized Substrate, Promega, WI)를 이용하여 western blotting 분석을 수행하였다. 그 결과로써(Figure 1) SDS-PAGE 상에서 IPTG에 의하여 유도발현되는 66,000 Da 단백질은 그 전이된 지역에서 mAb-tPA를 인식하여 반응색깔을 나타냈다. 이로써, pETPFR을 이용하여 PCR을 실시함으로써 얻은 1.7-kb DNA가 발현단백질의 크기 및 면역반응의 결과에서 판단할 때 tPA 단백질 전체 정보를 지님을 확인할 수 있었다.

거의 성숙시기에 접어든 백합의 수술로부터 수집한 화분의 기내배양은 Yokota 등(23)이 사용한 pollen growth media를 약간 수정하여 [PGM; 1.6 mM H₃BO₃, 1.8 mM Ca(NO₃)₂, 7% sucrose, pH 5.7] 27°C, 16-24 hrs 암조건에서 실시하였다. 보통, 500 mg의 화분을 50 mL PGM에 현탁하여 배양하였다. 박테리아시스템에서 확인한 1.7-kb tPA cDNA는 식물발현벡터인 pBI121에 GUS DNA를 대체하여 *XbaI/SacI* 위치에 삽입한 후 pBI/tPA(Figure 2)를 얻었으며 이는 freeze-thaw 방법(24)으로 *Agrobacterium tumefaciens* A136에 형질전환시켰다. PGM에서 초기발아과정이 진행되고 있는 백합화분배양액에 1 mL의 pBI/tPA를 지지고 있는 *Agrobacterium*을 첨가하였는 바, 이 균은 kanamycin과 streptomycin(각 50 mg/L)를 포함한 LB 배지에서 28°C, 16-24 hrs 배양한 것을 PGM에 재현탁시킨 것이다. 화분과 균의 혼합배양액은 Aspirator (ASP-13, Iwaki Glass Co.)에서 제공되는 진공조건 상태에서 20 min 방치한 후, 배양화분은 멸균증류수로 세척하여 *Agrobacterium* 세포를 제거하였으며 kanamycin 100 mg/L과 cefotaxime 250 mg/L을 포함하는 PGM 50 mL에 재현탁하여 16-24 hr 생장시켰다. 이로써 화분관의 신장은 평균 7-8 cm에 이르렀다. 완전히 신장된 화분관으로부터의 용해단백질의 추출액은 상기한 초음파처리 및 원심분리에 의하여 분리하였으며 양적으로는 초기 배양화분량의 약 12%로 계산되었는데 (Bio-Rad Protein Assay) 이를 western blotting 분석에 사용하였다. 그 결과는 Figure 3에 나타나고 있으며 SDS-12% PAGE를 실시 후 PVDF membrane에 전이된 화분단백질들 중에서 mAb-tPA를 인식하는 단백질은 standard tPA의 위치 (약 68,000 Da)와 거의 비슷한 것을 보여주고 있다. 대조적으로 GUS DNA를 지니는 pBI121 형질전환화분에서는 mAb-tPA에 반응하는 것이 유사지역에 나타나지 않았다. 화분에서 발현되는 tPA 단백질이 그 크기가 standard와 유사하게 나타나는 것은 양적인 면에서의 당화정도가 사람과 유사한 것으로도 추측해 볼 수 있다. 형질전환화분에서의 CaMV35S promoter에 연결된 tPA DNA의 단백질 발현은 standard tPA를 기준으로 한 densitometry 분석에서 화분단백질 총량의

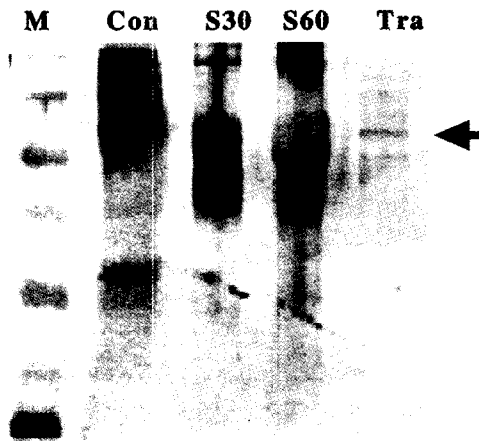


Figure 3. Western blot analysis of tPA expression in transgenic lily pollen. M, protein size marker; Con, pBI121-transformed pollen; S30 and S60, the standard tPA 30 ng and 60 ng, respectively; Tra, pBI/tPA transformed.

0.05% 정도로 계산되고 있다.

박테리아에서의 확인을 거쳐 백합화분에서 손쉽게 그 발현이 확인된 tPA 단백질의 연구를 통하여 화분을 일종의 새로운 일회성의 protein factory로 이용해 볼 수 있는 가능성을 제시하였는 바, 1-2일 내에 수행되어지는 그 간편성, 신속성과 함께 환경으로의 우전자 오염에 대한 우려도 전혀 고려할 필요가 없다는 것도 주목할만 하다. 현재까지 개발되어 온 모든 biofactory 시스템은 형질전환상태로 항상 유지되면서 증장기에 걸쳐 정교한 환경이나 시설에서 운영되고 있다는 것은 주지의 사실인데 이에 비해서 자연의 화분은 필요 시에만 유전자도입을 실시하여 간단한 환경 및 시설조건 하에서 그 목적을 이룰 수 있을 것으로 기대할 수 있다. *Pinus*, *Betula*, *Liquidambar*, *Populus* 등의 임목류는 대단히 많은 화분을 생산하며 적절한 장기 보관법을 개발한다면 본 연구에서의 백합과 마찬가지로 이들도 장래의 일회용 단백질공장으로서의 이용이 가능할 것이다.

감 사

본 연구는 대구가톨릭대학교 2002 일반연구비에 의하여 수행하였음.

요 약

백합(*Lilium longiflorum*)으로부터 수집한 화분에 대하여 기내배양, *Agrobacterium* 및 vacuum infiltration 과정을 이용한 형질전환 그리고 kanamycin배지에서 선별배양을 통하여 PCR에 의하여 증폭된 1.7 kb의 human tissue plasminogen activator(tPA) cDNA의 발현을 분석하였다. 16시간 정도 배양한 신장화분관의 western blotting 결과, human standard와 유사한 크기로서의 발현을 확인하였다. 이로써 백합화분은 신속한 단백질발현의 분석을 위한 일회성 생산숙주로서의 가능성을 제시하고 있다.

REFERENCES

- Doran, P. M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotech.* **11**, 199-204.
- Giddings, G (2001), Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 450-454.
- Giddings, G., G. Allison, D. Brooks, and A. Carter (2000), Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotech.* **18**, 1151-1155.
- Mercenier, A., U. Wiedermann, and H. Breiteneder (2001), Edible genetically modified microorganisms and plants for improved health. *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 510-515.
- McCormick, S. (1993), Male gametophyte development. *Plant Cell* **5**, 1265-1273.
- Taylor, L. P. and P. K. Helper (1997), Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 461-491.
- Aronen, T. S., T. O. Nikkanen, and H. M. Haggman (1998), Compatibility of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine pollen. *Can. J. For. Res.* **28**, 79-86.
- Bethold, N., J. Ellis, and G. Pelletier (1993), *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**, 1194-1199.
- 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.
- 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.
- Hess, D., K. Dressler, and R. Nimrichter (1990), Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* **72**, 233-244.
- Langridge P., R. Brettschneider, P. Lazzeri, and H. Lorz (1992), Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway; a critical assessment. *Plant J.* **2**, 631-638.
- Luo, Z. X. and R. Wu (1989), A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.* **7**, 69-77.
- Tjokokusumo, D., T. Heinrich, S. Wylie, R. Potter, and J. McComb (2000), Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Rep.* **19**, 792-797.
- Okada, T. and K. Toriyama (2001), Pollen vegetative cell-specific expression of *Bra r1*: useful tool for observation of the vegetative nucleus and identification of transgenic pollen by nuclear-targeted GFP. *Sex. Plant Reprod.* **13**, 301-307.
- 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.
- Hansen H. A. and C. Emborg (1994), Extra- and intracellular amino acid concentrations in continuous Chinese hamster ovary cell culture. *Appl. Micro. Biotech.* **41**, 560-564.

18. Weidle, U. H., P. Buckel, and J. Wienberg (1988), Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in Chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure. *Gene* **66**, 193-203.
19. Qiu, J., J. R. Swartz, and G. Georgiou (1998), Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Micro.* **64**, 4891-4896.
20. Ebert, K. M., J. P. Selgrath, P. Dittullio, J. Denman, T. E. Smith, M. A. Memom, J. E. Schindler, G. M. Monastersky, J. A. Vitale, and K. Gordon (1991), Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology* **9**, 835-838.
21. Harris. T. J., T. Patel. F. A. Marston. S. Little. J. S. Emtage, G. Opendakker, G. Volckaert, W. Rombauts, A. Billiau, and P. DeSomer(1986), Cloning of cDNA coding for tissue-type plasminogen activator and its expression in *E. coli*. *Mol. Biol. Med.* **3**, 279-292.
22. Park H. S. and J. W. Choi (1997), Inhibition of PKR phosphorylation *in vitro* by Lac-Z fused double-stranded RNA binding protein(RBF) produced from *E. coli*. *Kor. J. Genet.* **19**, 11-17.
23. Yokota, E., K. Takahara, and Y. Shimmen (1998), Actin-bundling protein isolated from pollen tubes of lily. *Plant Physiol.* **116**, 1421-1429.
24. An, G., P. R. Ebert, A. Mitra., and S. B. Ha (1988), Binary vector. In *Plant Molecular Biology Manual*, S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort, Eds, pp A3/1-A3/19, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.