PD - 2

포유동물유래의 세포를 이용한 열목어 유전자재조합형 생식선자극호르몬 (LH)의 생산

고혜연 · 최은주 · 진덕희 · 손영창
강릉대학교 해양생명공학부

서론

포유동물과 같이 경골어류의 뇌하수체에서도 두 종류의 생식선자극호르몬 (GTHs; FSH와 LH)이 생산되고 분비된다고 알려져 있다.. 이들 호르몬들은 공통적인 α 쇄와 특이적인 β 쇄로 구성된 이량체 당단백질이다 (Querat, 1995; Querat et al., 2000). 연어과 어종들에서, FSH는 난황형성과 정자형성의 역할을 하며, LH는 배우자의 최종성숙을 유도한다 (Swanson and Dittman, 1997).

한편, 대부분의 어종에서 GTH 정제 제품이 없으며 생물학적 활성을 연구할 수 있는 재료가 부족하다. 본 연구에서는 냉수성 고유어종인 열목어의 멸종을 방지하고 번식시키기 위한 목적으로 우선 포유세포유래의 세포시스템에서 유전자재조합 LH 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 뇌하수체 샘플링 및 cDNA 합성

본 연구에 이용한 열목어는 성숙초기의 암컷 개체로부터 뇌하수체를 적출 한 뒤 액체질소에 급속 냉동 한 후 -80℃에서 mRNA 추출 전까지 보관하였고, 뇌하수체로부터의 mRNA 추출 및 cDNA 합성은 각각 QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit 및 First-strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech., UK)로 수행하였다.

2. GTHα 및 LHβ 호르몬 영역의 polymerase chain reaction (PCR)

근연종인 산천어의 GTHα 및 LHβ 염기서열을 기초로 하여 oligo primer를 제작하였고, 전술의 뇌하수체에서 합성한 cDNA를 주형으로 사용하여 PCR 방법으로 GTHα 및 LHβ를 각각 증폭하였다.

3. 단백질발현 construct 재조합

PCR 증폭산물의 염기서열을 확인한 후 signal peptide를 포함하는 LHβ와 포함하지 않는 GTHα를 overapping PCR법으로 연결하여 2량체 단백질을 단일쇄화 하였다.

그리고, histidine tag를 성숙단백질의 아미노기말단 및 카복시기말단에 각각 포함하는 단편을 제작하여 mammalian expression용 plasmid인 pcDNA3 (Invitrogen life technologies, USA) vector에 삽입하였다. 모든 construct은 염기서열을 결정하여 frame shift 또는 PCR error의 유무를 확인하였다.

4. 포유세포내 형질도입 및 유전자발현

Chinese hamster ovary cell (CHO-K1)을 도입세포로 활용하였고 형질도입은 liposome complex-based chemical (Lipofectamine, Invitrogen)을 사용하였으며 형질도입된 세포의 LH 분비는 24시간 간격으로 His-tag 항체 (Santa Cruz Biotech., CA, USA)를 이용한 Western blotting 방법으로 조사하였다. 또한 지속적인 분비형 세포를 생산하기 위해 Geneticin (1000 ug/ml, Gibco, USA) 처리후 3주간 세포를 배양한 다음 배양액을 Ni-NTA column으로 추출하여 Western blotting 방법으로 단백질을 조사하였다.

결과 및 요약

열목어 GTH의 번역부위는 GTHα, LHβ 각각 350, 429 bp 이었으며, 산천어와의 상동성이 높았다 (84, 98%). overapping PCR법으로 histidine tag가 성숙단백질의 아미노기말단 및 카복시기말단에 포함된 단일쇄 LH 생산용 유전자를 확보하였다. His-tag 항체를 이용한 Western blot법의 결과, 배양액중으로 분비된 단백질은 3-4일 째에 확인되었다. 성숙단백질이 추출된 상대적인 양은 아미노기말단에 histidine tag이 삽입된 형태에서 많았다.

참고문헌

Querat B., 1995. Structural relationships between 'fish' and tetrapod gonadotropin. In: Goetz F.W., Thomas P. (Eds.), Proc. 5th Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish FishSymp 95, University of Texas, Austin, TX, USA, pp. 7-9.

Querat B, Sellouk A, Salmon C. 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. Biol Reprod. 63(1):222-8.

Swanson P., Dittman A., 1997. Pituitary gonadotropins and their receptors in fish. In: Kawashima S., Kikuyama S. (Eds.), Advances in Comparative Endocrinology XIII International Congress of Comparative Endocrinology, Yokohama, Japan, pp. 841-846.