

Mammaglobin 유전자 재조합 및 발현에 관한 연구

이 재 학
서일대학 식품영양과

Cloning and Expression of Mammaglobin Gene

Jae-Hag Lee

Dept. of Food and Nutrition, Seoil College

Abstract

In this study, I attempted to develop the expression and purification system of human mammaglobin proteins in *Escherichia coli* and to produce anti-human mammaglobin rabbit antibody for the detection of human mammaglobin protein in the peripheral blood of breast cancer patients. Human mammaglobin gene was cloned and sequenced from m-RNAs purified from donated breast cancer tissues using RT-PCR. The cloned gene was inserted into pET30, pET22, and pET32 plasmid. The cloned gene in pET30 yields insoluble proteins which was difficult to purify from the cells extracts. The mammaglobin gene in pET32 was strongly expressed soluble proteins which were isolated using Ni-NTA affinity chromatography and DEAE-ion exchange chromatography, followed by enterokinase digestion of the purified proteins. The isolated proteins had enough purity to use as a antigen for the production of anti-mammaglobin antibody in rabbits. The polyclonal antibody produced against the isolated mammaglobin showed a specificity to mammaglobin after Westernblot immuno assay. In conclusion, the isolated mammaglobin protein and the anti-mammaglobin rabbit antibody may be used for diagnosis of breast cancer as well as development of anti-breast cancer drug.

Key words : mammaglobin, breast cancer, diagnosis, expression.

서 론

유방암은 여성에게 가장 많이 발병되는 암 중의 하나로 최근에 mammaglobin이 일부 유방암세포에서 과량 발현됨이 발견되었다¹⁻³⁾. Mammaglobin 유전자는 인간 염색체 11q12-13에 위치하며 정상 유방상피세포에서도 일부 약하게 발현되나 다른 조직 내에서는 거의 발현되지 않는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 이 단백질은 분자량 10,000 정도의 당단백질로 94개의 아미노산으

로 이루어져 있다. 분비단백질의 특징으로 18개의 신호펩타이드 (signal peptide)를 N-말단에 가지고 있으며 분비 시 이 신호펩타이드는 잘려져 성숙된 mammaglobin이 되는 것으로 생각된다¹⁾. Mammaglobin의 세포학적 기능은 알려진 것이 없으나 토끼의 Uteroglobulin, 백서의 전립선 스테로이드 결합 단백질 및 Clara cell 10 kD단백질과 상동성이 있다⁵⁾. uteroglobulin의 기능은 알려지지 않았지만 Bu101 단백질과 결합하여 heterocomplex를 형성하고, 이 complex 상태로 세포 밖

본 논문은 2002년도 서일대학 학술연구비에 의해 연구되었음.

† Corresponding author : Jae-Hag Lee, Department of Food and Nutrition, Seoil College, 49-3 Myunmok8-dong, Chungryang-Ku, Seoul, 131-702, Korea.

Tel : 02-490-7509, Fax : 02-490-7508, E-mail : wijson@seoil.ac.kr

으로 분비되며 다른 세포의 수용체를 통해 어떤 기능을 수행하지 않을까 추측하고 있다⁶⁻⁷.

Carcinoembryonic antigen, cytokeratin-19, β hCG, Muc-1과 같은 여러 가지 분자 표식자가 유방암을 진단하는데 사용될 수 있다. 그러나 민감도의 한계나, 다른 세포에서도 발현된다는 사실로부터 진단용으로 사용하기에는 부적절한 면이 있다⁸⁻¹⁰. Mammaglobin은 여러 유방암세포 주 및 유방암 조직에서 과 발현되어 유방암의 진단, 전이 정도의 진단, 또는 수술 및 항암치료 후 재발 정도의 검색을 위한 하나의 표식자로 가능성을 내포하고 있다¹¹. 특히 이 mammaglobin을 생산하는 암세포를 mammaglobin RT-PCR 법으로 peripheral blood에서 검색할 수 있다고 보고되어 암전이 및 재발의 지표로 사용될 가능성이 보고되었다¹²⁻¹⁴. 그러나 이 방법은 높은 민감도로 인해 잘못된 양성을 나타낼 수 있으며 전이되지 않은 유방암 환자에서 확인은 어려운 상황이다.

본 연구에서는 mammaglobin 항체를 이용한 혈중 mammaglobin을 검사하는 방법을 개발하기 위해 mammaglobin 유전자를 클로닝하고, 다양한 발현벡터를 이용하여 클로닝된 mammaglobin 단백질을 발현시키고, 발현된 단백질을 분리 정제하는 방법을 확립하고, 분리된 mammaglobin 단백질을 이용하여 토끼에 접종한 후 mammaglobin에 대한 항체를 생산하였다. 생산된 anti-mammaglobin rabbit polyclonal 항체를 부분적으로 분리한 후 Westernblot immuno assay를 수행하여 항체의 mammaglobin에 대한 특이성을 확인하였다. 이후 이 항체를 이용한 ELISA 검사 방법의 개발하여 유방암 세포에서 분비되는 mammaglobin을 검출하여 암의 진행, 전이 및 재발 정도를 진단해 낼 수 있을 것이다. 기초 연구로서 mammaglobin 항체를 이용하여 mammaglobin의 생리적 기능을 연구할 수 있다.

재료 및 방법

1. 사용시약

NaCl, Sodium phosphate, $MgCl_2$, Acrylamide, bis-acrylamide, IPTG, agarose, Urea, Coomassie Blue 등의 화학약품은 Sigma사 제품을 사용하였고 NcoI, EcoRI, BamHI, XhoI 등의 제한 효소와 Taq polymerase는 TaKaRa사와 Promaga 제품을 사용하였으며 Trypton, Bacto-agar, Pepton, Yeast-extract 등의 미생물의 배양용 배지는 Difco사 제품을 사용하였다.

2. 인간 mammaglobin 유전자 분리

인간 mammaglobin 유전자를 얻기 위하여 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)법으로 mammaglobin유전자를 클로닝하였다. RNeasy commercial kit와 RT-PCR kit(Ambion Inc, Austin, Texas, USA)가 사용되었다. 유방암 환자의 조직을 얻은 후 이 조직에서 RNA를 분리한 후 이 RNA에서 Reverse transcriptase를 이용하여 cDNAs를 합성하였다. 합성된 cDNAs $1\mu l$, mammaglobin 특이 primer(primer 1 :5'-GGCCATGGG CTCTGGCTGCCCTTATTG-3', primer 2 :5'-GACC TCGAGAAAGTTAAATAAATCACAAAGAC-3', $10\text{pmol}/\mu l$) 각각 $1\mu l$, 2.5mM dNTPs $4\mu l$, taq polymerase(2.5unit) $1\mu l$ 와 10X Taq pol. buffer $5\mu l$ 에 3차 증류수를 넣어 총 $50\mu l$ 의 부피가 되도록 하였다. 94°C 에서 3분 동안 반응시켜 단일가닥으로 분리한 다음 98°C 에서 30초, 67°C 에서 1분 30초간 반응을 30 cycles, 72°C 에서 10분으로 반응하였다. 증폭된 유전자를 NcoI과 XhoI으로 절단한 후 pCDNA3 벡터에 끼워 넣은 후 대장균에 형질전환시키고, 형질전환 균주로부터 다량의 벡터 DNA를 분리(plasmid miniprep. kit, Atmanbio Co.)하여 DNA염기 서열을 확인하였다. 기존의 mammaglobin 유전자의 서열과 비교하여 mammaglobin 유전자로 확인하였다.

3. Mammaglobin 발현

Mammaglobin의 발현을 위해 3가지 다른 발현 벡터를 사용하였다. 세포 내 발현을 위해 pET30, pET32를 벡터 이용하였고, 신호 펩타이드를 이용한 periplasmic 공간으로의 분비 발현을 위해 pET20 벡터를 이용하였다. Hexahistidine Tag, S Tag와 enterokinase recognition 부위는 삽입되는 유전자의 N 말단에 위치한다. 각각의 염기서열 및 특징은 www.novogene.com에서 확인할 수 있다.

4. 단백질 정제

발현 후 단백질의 분리를 위해 Ni-NTA 레진(Quiagen)을 이용하여 affinity chromatography 방법으로 1차 정제를 수행하였다. 2차 정제는 DEAE-ion exchange chromatography 방법을 이용하였다. Mammaglobin 단백질이 들어 있는 fraction을 확인한 후 농축(10배)시키고 SDS-PAGE를 수행하였다. 젤을 Coomassie Blue staining하고 그 후에 Westernblot immuno assay를 수행하여 순도를 확인할 수 있었다. 불용성 발현의 경우 urea를 이용하여 용해시키고 refolding 과정을 거쳐 사용하였다. Mammaglobin 단백질 N-말단 앞에 mammaglobin과 같이 발현된 thioredoxin 단백질을

제거하기 위해 enterokinase(Novagene)로 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 분석에 이용하였다.

5. 항체 생산

Anti-mammaglobin rabbit antibody를 만들기 위해 complete adjuvant (Sigma)와 pET30 벡터에 클로닝된 유전자로부터 발현된 후 분리된 mammaglobin 단백질을 혼합하여 토끼의 등에 한달 간격으로 3번 피하 접종하였다. 토끼의 혈액은 주기적으로 채취한 후 혈청을 분리하고 혈청 속에 존재하는 Immunoglobulin G를 Protein A linked Agarose column(Pierce Chemical)을 이용하여 분리한 후 Westernblot immuno assay 시 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 사람 mammaglobin 유전자의 분리 및 확인

유방암 환자의 조직에서 total RNA를 분리하고 RT-PCR로 증폭된 유전자를 pCDNA3 벡터에 끼워 넣은 후 대장균에 형질전환시키고 형질전환 균주로부터 플라스미드 DNA를 모아 DNA 염기 서열을 밝혔다. 유전자의 염기서열은 기존의 mammaglobin 유전자의 서열과 비교하였을 때 완전히 일치하였다.

2. Mammaglobin 발현

대장균에서 발현하기 위해 단백질의 N 말단에 histidine이 융합적으로 발현되는 대장균 발현 벡터를 이용하였다. 먼저 고발현을 위한 목적으로 대장균 세포 내에서 발현되는 pET30 벡터를 이용하였는데 이는 hexahistidine-S·Tag-mammaglobin의 단백질 형태로 발현된다. Fig. 1에서 보듯이 대부분의 발현된 mammaglobin 단백질이 lane 3에 있는 불용성 단백질에서 발견되었다. 이러한 불용성을 이룬 mammaglobin 단백질은 affinity chromatography 분리법을 이용한 순수 분리 방법의 사용이 불가능하였다.

수용성 발현을 위해 thioredoxin 단백질을 mammaglobin 단백질의 N-말단에 융합적으로 발현하는 벡터 pET32 벡터를 이용하였다. 발현된 단백질은 thioredoxin-His, S·Tag-mammaglobin 형태로 발현되며 IPTG로 유도 발현되었고 수용성이 확인되었다. Fig. 2는 Ni-NTA affinity column을 이용하여 분리한 후 분리된 단백질을 enterokinase로 처리하고 난 후 SDS-PAGE 분석한 결과이다. 첫 번째 lane은 분리된 단백질이고, enterokinase로 절단한 후 반응액을 lane 2에 추가하였다. 전기영동 후 Coomassie Blue staining한 것은 Fig.

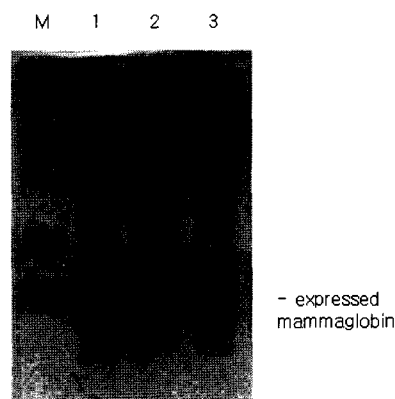


Fig 1. Analysis of mammaglobin expressed from the transformant with pET30-mammaglobin vector.

The transformant with pET30- mammaglobin vector was induced with 0.25mM IPTG. After 3hrs, the cells were collected and resuspended and boiled for 5min in SDS-PAGE extraction buffer. The extract was simply spined. The supernatant and the pellet were collected and the pellet was resuspended. The samples were loaded in the SDS-polyacrylamide gel and the gel was stained with Coomassie blue.

M lane : molecular weight marker.

Lane 1: Total cell extract.

Lane 2: Supernatant(soluble protein).

Lane 3: Resuspension of Pellet(insoluble protein).

2(a)이고 그것을 부분적으로 분리된 anti-mammaglobin rabbit antibody로 Westernblot한 결과는 Fig. 2(b)에 나타내었다. 그 결과 enterokinase로 반응한 후 mammaglobin 단백질이 thioredoxin-HisTag- mammaglobin형태로 발현된 것으로부터 분리됨을 관찰하였다.

세포 외 발현을 위해 pET20 벡터를 이용하였는데 이는 세포막을 통과하는 pelB 단백질의 신호펩타이드를 융합적으로하여 발현되면 분비 시 신호펩타이드가 잘려나가 mammaglobin만 주로 periplasmic 공간에 발현된다. 이 경우도 발현을 확인하였으며 특이하게 세포막뿐만 아니라 세포벽도 통과하여 배양 배지에 존재함을 확인하였다(Fig. 3). 그러나 이 경우 단일 밴드를 보여주지 않아 발현 상에 문제점이 있음을 알게 되었다. 상기의 결과로부터 mammaglobin 단백질을 생산 분리하기 위해 pET32 벡터를 이용하였다.

3. 발현된 mammaglobin 단백질 정제

항체를 생산하거나 ELISA에 대조단백질 등으로 사용하기 위해 정제된 mammaglobin이 필요한데 대장균에서 발현됨에도 불구하고 불순물이 많이 존재하여 직접 사용하는 데는 어려움이 있다. 따라서 정제가 필

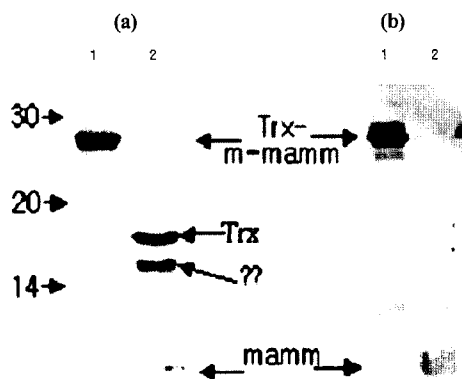


Fig 2. Analysis of mammaglobin expressed from the transformant with pET32-mammaglobin vector. Mammaglobin was overexpressed in the transformant with pET32-mammaglobin vector and purified using Ni-NTA affinity chromatography followed by DEAE-ion exchange chromatography. The eluent from the column was collected and treated with enterokinase to separate N-terminal thioredoxin part from the thioredoxin-mammaglobin conjugate. (a) SDS-PAGE analysis followed by staining with Coomassie blue. (b) The gel was blotted and reacted with anti-mammaglobin rabbit antibody partially purified.

lane 1. The eluent from DEAE-ion exchange chromatography had thioredoxin-mammaglobin conjugate.
lane 2. Thioredoxin-mammaglobin conjugate was treated with enterokinase which may cleaved away the N-terminal thioredoxin part from the conjugate.

요한데 pET30 발현 벡터에서 발현된 수용성 단백질인 thioredoxin-mammaglobin을 Ni-NTA affinity chromatography를 통해 분리한 후 DEAE-ion exchange chromatography로 한번 더 분리하였다. 분리된 단백질을 enterokinase로 처리하고 전기영동 분석한 결과가 Fig. 4(a)에 보여주고 있으며 그 겔을 Nitrocellulose 막에 전달한 후 항체를 이용하여 발현된 mammaglobin 단백질과의 반응성을 확인한 결과는 Fig. 4(b)에 나타내었다. DEAE-ion exchange chromatography 분리 후 많은 혼합물들이 제거되었음을 확인할 수 있다. 만들어진 항체와 발현된 mammaglobin 사이에 항원항체반응을 갖고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 이 항체를 이용하여 유방암 환자의 mammaglobin 발현 정도를 측정함으로써 유방암에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

4. Anti-mammaglobin rabbit antibody 분리

위에서 분리된 mammaglobin 단백질을 complete adjuvant와 혼합하여 토끼에 피하주사하고 한달 간격

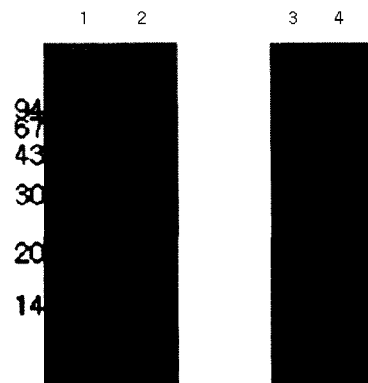


Fig 3. Analysis of secretion of mammaglobin expressed from the transformant with pET20-mammaglobin vector. The transformant with pET20-mammaglobin vector may express mammaglobin with pelB signal peptide which was supposedly oriented to periplasmic space. The periplasmic fraction and the culture medium were collected and analyzed using Westernblot immuno assay with anti-mammaglobin rabbit antibody partially purified.

Lane 1. The periplasmic fraction of the cells under reducing condition.
Lane 2. The supernatant of the culture under reducing condition.
Lane 3. The periplasmic fraction of the cells under non-reducing condition.
Lane 4. The supernatant of the culture under non-reducing condition.

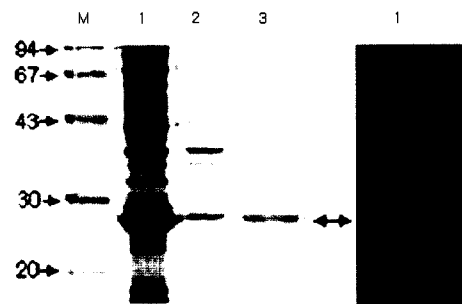


Fig 4. Purification of mammaglobin from the transformant with pET30-mammaglobin vector. Thioredoxin-mammaglobin expressed from the transformant was first purified with Ni-NTA affinity chromatography followed by DEAE-ion exchange chromatography.

(a) SDS-PAGE analysis : m : marker

Lane 1. Crude extract.

Lane 2. Sample obtained after purification of affinity chromatography.

Lane 3. Sample obtained after purification of DEAE- ion exchange chromatography.

(b) Westernblot analysis using anti-mammaglobin rabbit antibody partially purified.

으로 두 번 boosting하였다. 혈청으로부터 항체를 분리하기 위해 Protein A-linked Agarose column을 이용하였다. 분리된 항체의 항원항체 반응성을 확인하기 위해 Westernblot immuno 분석을 수행하였다. Fig. 2, 3, 4는 토끼로부터 생산, 분리된 항체를 사용하여 얻은 결과로써 분리된 항체는 대장균에서 발현된 mammaglobin과 특이적으로 반응함을 확인하였다.

요 약

Mammaglobin은 uteroglobin 유전자와 상동성을 가지는 분비 단백질로 인체 유방암 조직에서 과발현된다. 이 단백질은 유방암의 진단, 전이 정도의 진단, 또는 수술 및 항암치료 후 재발 정도의 검색을 위한 하나의 표식자로 가능성을 갖는다. 본 연구는 mammaglobin 유전자를 클로닝하여, 대장균으로부터 발현하고, 발현된 mammaglobin 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 이용하여 항체를 생산하고, 분리된 항체가 mammaglobin에 대한 특이 반응을 갖는지를 확인하였다. 유방암 환자의 조직을 얻은 후 이 조직에서 RNA를 분리한다. 이 RNA로부터 RT-PCR법으로 mammaglobin 유전자를 클로닝하였다. 증폭된 유전자를 NcoI과 XhoI으로 절단한 후 벡터에 끼워 넣은 후 대장균에 형질전환시키고 DNA 염기 서열을 결정하였고, 기존의 mammaglobin 유전자의 염기서열과 비교한 결과 동일한 유전자임을 확인하였다. Mammaglobin의 세포 내 발현, 신호 펩타이드를 이용한 분비발현을 위해 pET30, pET20, pET32 벡터를 각각 이용하였다. 3개의 발현시스템으로부터 단백질이 과 발현됨을 확인할 수 있었다. pET30 벡터를 이용하여 성공적으로 발현된 mammaglobin 단백질을 분리할 수 있었다. Ni-NTA affinity chromatography에 이은 DEAE-ion exchange chromatography 분리 방법에 의해 수용성 발현 단백질인 thioredoxin-mammaglobin을 정제할 수 있었고 이 융합 단백질로부터 enterokinase를 이용하여 mammaglobin 단백질을 분리하였다. 토끼에 분리된 mammaglobin을 complete adjuvant와 혼합하여 면역한 후 두 번 boosting하여 polyconal 항체를 얻었다. Westernblot immuno 분석을 한 결과 생산된 항체가 mammaglobin 단백질과 특이적 항원항체반응을 보임을 관찰하였다. 향후 이 항체를 이용하여 진단용 시약의 개발이나 항암제 개발 등을 위해 연구가 진행될 것이다.

참고문헌

1. Watson, M. and Fleming, T. : Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer, *Cancer Reserach*, **56**. 860~865(1996)
2. Watson, M., Dintzis, S., Darrow, C.M., Voss, L.E. and DiPersio, J. : Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer, *Cancer Research*, **59**. 3028~3031(1999)
3. Aihara, T., Fujiwara, Y., Miyake, Y., Okami, J., Okada, Y., Iwao, K., Sugita, Y., Tomita, N., Sakon, M., Shiozaki, H. and Monden, M. : Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers, *Cancer Letters*, **150**. 79~84(2000)
4. Watson, M., Darrow, C., Zimonjic, N. and Fleming, T. : Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13, *Oncogenes*, **16**. 817~824 (1994)
5. Zhao, C., Nguyen, T., Yusifov, T., Glasgow, B.J. and Lehrer, R.I. : Lipophilins: human peptides homologous to rat prostatrin, *BBRC*, **256**. 147~155(1999)
6. Colpitts, T.L., Biling-Medel, P., Friedman, P., Granados, E.N., Hayden, M., Hodges, S., Menhart, N., Roberts, L., Russel, J. and Stroupe, S.D. : Mammaglobin is found in breast tissue as a complex with Bu101, *Biochemistry*, **40**. 11048~11059(2001)
7. Carter, D., Douglass, J.F., Cornellison, C.D., Retter, M.W., Johnson, J.C., Bennington, A.A., Fleming, T.P., Reed, S.G., Houghton, R.L., Diamond, D.L. and Vedvick, T.S. : Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin complex, a promising diagnostic marker for breast cancer, *Biochemistry*, **41**. 6714~6722(2002)
8. Ethier, S.P., Terry, V.H., Roth, M.S., Trudeau, W.I. and Field, K.K. : High sensitivity detection of minimal residual breast carcinoma using PCR for cytokeratin-19, *Duagn Mil. Pathol.*, **5**. 173~180 (1966)
9. Gerhard, M., Juhl, H., Kalthoff, H., Schreiber, H.W., Wagner, C. and Neumaier, M. : Specific detection of carcinoembryogenic antigen-expression tumor cells in bone marrow aspirate by PCR, *J. Clin. Oncol.*, **12**. 725~729(1994)
10. Hu, X.I., and Chow, W.C. : Detection of circulating

1. Watson, M. and Fleming, T. : Mammaglobin, a

- breast cancer cells with multiple marker RT-PCR assay, *Anticancer*, **21**. 421~424(2001)
11. Cerverira, N., Torres, L., Rocha, P., Bizarro, S., Pereira, D., Abreu, J., Henrique, R., Teixeira MR., and Castedo, S. : Highly sensitive detection of the MGB1 transcript(mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients, *Int. J. Cancer*, **108(4)**. 592~595(2003)
12. Zach, O., Kasparu, H., Krieger, O., Hehenwarter, W., Girschikowski, M. and Lutz, D. : Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast patient via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA, *J. Clin. Onco.*, **17**. 2015~2019(1999)
13. Raj, G.V., Moreno, L.G. and Gomella L.G. : Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumor, *Cancer*, **82**. 1419~1422(1998)
14. Houghton, R.L., Dillon, D.C., Molesh, D., Zehentner, BK., Xu, J., Jiang, J., Schmidt, C., Frudakis, A., Repasky, E., Maltez, F.A., Zhang, X., Roche, P., Persing, D.H. and Reed, S.G. : Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells, *Mol. Diagn.*, **6(2)**. 79~91(2001)
-
- (2004년 2월 6일 접수)