

담배 배양세포에서 인간 히스톤 단백질 H1.5의 발현

김기연¹, 권석윤², 송재영¹, 이행순³, 곽상수^{2*}

¹삼양제넥스 생명공학연구소, ²한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, ³식물세포공학연구소

Expression of a Human Histone H1.5 in Transgenic Tobacco Cultured Cells

Kee-yeun Kim¹, Suk-yoon Kwon², Jae Young Song¹, Haeng-soon Lee³, Sang-soo kwak^{2*}

¹Samyang Genex Biotech Research Institute, Hwaam-dong 63-2, Yuseong-gu, Daejeon 305-348, Korea

²Laboratory of Environmental Biotechnology, ³Laboratory of Plant Cell Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Oun-dong 52, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2) cell lines expressing a human histone H1.5 (referred to as hH1.5), which suppress collagen-induced rheumatoid arthritis, were developed under the oxidative stress-inducible peroxidase (SWPA2) promoter. Tobacco BY-2 cells were transformed by *Agrobacterium*-mediated method. The kanamycin-resistant calli were selected on the modified MS medium containing 150 mg/L kanamycin and 300 mg/L claforan. Transgenic cell lines were confirmed by PCR and northern blot analysis. Recombinant hH1.5 (rhH1.5) protein (42 kDa) was also detected by Western blot analysis, showing a different molecular weight of human hH1.5 (32 kDa). These results suggested that a hH1.5 gene was properly introduced in tobacco cultured cells under the control of SWPA2 promoter. The further characterization of rhH1.5 protein remains to be studied.

Key words: Collagen-induced rheumatoid arthritis, cultured cells, histone H1.5, oxidative stress-inducible SWPA2 promoter

서 론

인간 histone H1 (hH1)은 염색질 (chromatin) 구조의 한 구성원이다 (Thomas 1999). hH1은 성계에서는 cytoskeleton 구조의 형성에 관여하며 (Multigner et al. 1992), leukemia 세포에서 성장 저해와 같은 생물학적 활성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Class et al. 1996; Srinivas et al. 1998). hH1은 비슷한 아미노산 구성으로 다양한 형태가 존재하며 이들의 발현은 분화나 발달에서 다양하다 (Kinkade

and Cole 1966; Ruiz-Carrillo et al. 1974; Gjerset et al. 1982). hH1은 포유류에서 5-8개의 subtype으로 나눌 수 있으며 이들의 생물학적인 기능은 유전적 재조합과 DNA의 전사에 영향을 미쳐 염색질 구조의 다양한 변화에 기여하는 것이 제안되고 있다 (Uno et al. 1995).

인간 태반으로부터 분리된 hH1의 subtype H1.5 (hH1.5)는 IL-10의 생산을 증가시켜 collagen-induced 류마티스 관절염을 저해하는 효과가 있는 것이 밝혀졌으며 (Jung et al. 2000), 이 단백질을 대장균에서 대량 배양하여 발현된 단백질의 특성을 분석한 바 있다 (Pyo et al. 2001). 그러나 대장균은 고등생물에서 일어나는 glycosylation 과정이 없으며 이로 인해 단백질 활성에 영향을 줄 수 있다 (Decker

*Corresponding author Tel 042-860-4432 Fax 042-860-4608

E-mail sskwak@kribb.re.kr

and Reski 2004). 따라서 이러한 종류의 당단백질을 진핵세포에서 발현시키는 것이 중요하며 특히 형질전환과 발현이 용이한 식물체를 이용할 경우 저렴한 생산비용 등의 장점이 있다.

재조합 단백질의 발현에서 가장 중요한 문제는 도입한 유전자가 원하는 만큼, 원하는 시기에 발현되는 것이다. 이러한 유전자 발현의 양 및 시기를 결정하는데 중요한 역할은 프로모터에 의해 일어난다. *SWPA2* 프로모터는 고구마 (*Ipomoea batatas*) 배양세포에서 배양조건 특이적인 발현과 식물체에서는 외부 스트레스에 의해 유전자의 발현을 증가시키는 것이 보고된 바 있다 (Kim et al. 2003). 최근 *SWPA2* promoter를 이용하여 인간 lactoferrin을 식물배양세포에서 고생산하는 세포주가 개발된 바 있어, *SWPA2* promoter는 유용단백질을 생산하는 산업용 식물세포주 개발에 적합함이 시사되었다 (Choi et al. 2003; Kwon et al. 2003).

본 실험에서는 인간유래 고부가가치 단백질로 산업성이 기대되는 hH1.5 단백질을 배양조건 고발현 *SWPA2* promoter를 이용하여 담배 배양세포에서 발현 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

발현벡터 제작

hH1.5 단백질은 인간 태반에서 분리 정제하여 collagen-induced 류마티스 관절염의 저해에 효과가 있는 것으로 판명된 단백질의 유전자 정보를 이용하여 PCR로 cloning 하였다 (Pyo et al. 2001). 사람태반 cDNA 라이브러리에서 제한효소 사이트를 연결한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 5' primer는 *Sall* site를 포함하는 primer 1 (5'-ACGCGTCCGACCCTATGTCCGAGACCGCCC-3')를 이용하였고 3' primer는 *XbaI* site가 있는 primer 2 (5'-GCTCTAGAGCTCACTTCTTCTTGGCGGCGG-3')를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 유전자는 *Sall/XbaI* 제한효소로 절단하고 제작된 카세트 (Choi et al. 2003)에 *Sall/XbaI* site

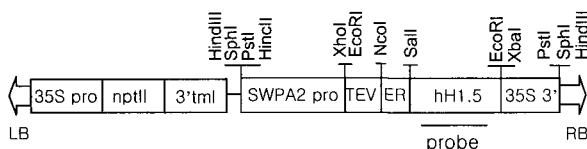


Figure 1. Structure of plant expression vector SWPA2 pro::ER-hH1.5/pCGN1578 for tobacco transformation. SWPA2 pro, sweetpotato peroxidase (*SWPA2*) promoter; TEV, tobacco etch virus leader sequence; ER, signal peptide of calreticulin; 35S 3', CaMV 35S transcription terminator; 35S pro, CaMV 35S promoter; LB and RB, T-DNA left and right border sequences, respectively. Bar represents probe from 800 bp fragment of hH1.5 cDNA for northern blot analysis.

에 삽입하였다. 제작된 binary plasmid는 SWPA2 pro::ER-hH1.5/pCGN1578 (Figure 1)이라 명명하고 식물세포로 형질전환을 위해 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101으로 형질전환하였다.

담배세포 형질전환 및 선발

형질전환에 사용한 담배 배양세포는 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2)이며 형질전환은 *Agrobacterium* co-cultivation 방법을 이용하였다. 배양세포의 배양은 MS 무기염 (Duchefa)에 255 mg/L KH_2PO_4 , 0.2 mg/L 2,4-D, 100 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-inositol 및 3% sucrose가 첨가된 배지를 이용하였다.

형질전환된 담배 캘러스는 0.8% agar, 150 mg/L kanamycin, 300 mg/L claforan이 포함된 고체배지에 얇게 도말 후 4주가 경과하여 생존하는 단일 세포군을 선발하였다. 선발된 단일세포군은 매 4주마다 동일 조건의 항생제 배지에서 5번 계대하여 완전히 선발된 캘러스를 얻었다. 얻어진 캘러스를 증식하여 액체배지에서 현탁배양세포를 유도하였다.

현탁배양세포는 250 mL 플라스크에 상기 캘러스배양과 동일조건의 액체배지 50 mL에 형질전환세포 생중량 1 g을 접종하여, 25°C 암소에서 150 rpm으로 진탕배양하여 7일 간격으로 계대배양 하였다. 세포생장과 배지의 잔류 당 농도를 측정하기 위해 2-3일 간격으로 배양 21일째까지 배양세포와 배지를 수거하였다. 배지내의 잔류 당농도 (brx)는 refractometer (ATAGO RX 5000)를 이용하여 측정하였으며 세포성장률은 세포 건중량 (dry cell weight, DCW)으로 측정하였다.

Northern blot analysis

전체 RNA는 형질전환 배양세포로부터 TRIzol (Gibco, BRL)을 이용하여 분리하였다. 분리된 25 μg 의 RNA를 formaldehyde-containing agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr을 이용하여 동일양이 loading 된지 확인 하였다. RNA를 Zeta membrane (Bio-Rad)으로 capillary transfer 방법을 이용하여 옮긴 후, radiolabelled hH1.5 cDNA를 probe (rediprime, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.)로 이용하여 hybridization 하였다.

Western blot analysis

형질전환 담배세포로부터 분리한 10 μg 의 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 PVDF nylon membrane (Millipore Co.)로 단백질을 옮긴 후 TBST [0.9% NaCl, 100 mM Tris (pH 7.5), 0.1% Tween 20]로 blocking 한 후, 1,000배로 희석한 anti-hH1.5 monoclonal antibody

(Pyo et al. 2001)로 25°C에서 한 시간 동안 반응하였다. 그 후 membrane을 washing하여 1,000배로 희석한 HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma)를 25°C에서 한 시간 동안 반응시킨 후 diaminobenzidine (DMB)(Sigma Chemical Co., USA)와 stable peroxidase substance (PIERCE)를 이용하여 발색을 관찰하였다.

결과 및 고찰

형질전환과 형질전환세포주 선발

인간 histone 단백질 hH1.5의 유전자는 774 bp이며 이로부터 합성되는 32 kDa 크기의 단백질에는 1곳의 glycosylation site가 있다 (Pyo et al. 2001). PCR을 이용하여 유전자를 클로닝한 후 Figure 1과 같이 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터를 이용하여 BY-2 세포로 형질전환하였으며 형질전환된 세포는 항생제배지에서 선발한 후 캘러스를 대상으로 PCR 분석을 수행하였다.

14개의 독립된 캘러스 세포주를 수거하여 DNA를 분리한 후 cloning 시 사용한 primer 1과 2를 이용하여 PCR을 수행한 결과 13개 라인에서 약 800 bp의 DNA 단편이 증폭되었다 (Figure 2). PCR로 형질전환체로 확인된 캘러스 가운데 생장이 양호한 4개의 세포주를 선발, 증식 후 현탁배양세포계를 확립하여 다음 실험에 사용하였다.

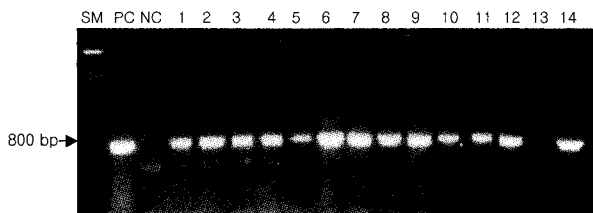


Figure 2. PCR analysis for presence of the hP961 gene in transgenic callus using gene specific primers (5'-ACGCGTCGACCCTATGTCCGAGACCGCCC-3', 5'-GCTCTAGAGCTCACTTCTTCTGGCGGCGG-3') that amplified a 800 bp fragments. SM, 1 kb marker; PC, positive control; NC, negative control; 1-14, independent transgenic lines.

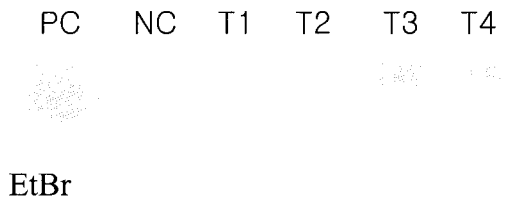


Figure 3. Northern blot analysis of total RNA from transgenic tobacco suspension cultures for SWPA2pro::ER-hP961. PC, positive control; NC, negative control; T1-T4, independent transgenic cell lines. EtBr staining of total RNA (25 µg) was used as a control of equal loading.

형질전환 현탁배양세포주 분석

비형질전환 세포주 (non-transformed, NC) 및 4개의 형질전환세포주 (T1, T2, T3, T4)를 대상으로 northern 분석을 수행한 결과 (Figure 3), 2개의 세포주 (T3, T4)에서 전사된 RNA를 확인 할 수 있었다.

hH1.5 유전자의 발현이 확인된 2개의 형질전환세포주 (T3, T4)를 대상으로 현탁배양과정에서 세포생장을 살펴보았다. 전반적인 성장곡선은 유사하나 형질전환세포주의 생장이 비형질전환세포주에 비해 조금 늦은 것을 알 수 있었다 (Figure 4A). 즉 비형질전환세포주는 배양 2일 이후부터 증식이 시작되어 배양 8일째에 최고에 이르렀으나, 형질전환 세포주는 4일 이후 대수증식기가 시작되어 배양 11일째에 최대 생장을 나타내었다. 세포배양동안 당의 소모는 세포증식이 빠른 배양 4일째부터 급격히 증가하였다 (Figure 4B). 세포생장이 빠른 비형질전환세포주가 형질전환세포주에 비해 당의 소모가 급격하게 진행되었는데, 이러한 현상은 세포증식이 최대에 도달할때까지 관찰되었다.

형질전환세포주에서 hH1.5 단백질 생산을 확인하기 위해 배양 8일째 세포를 수거하여 Western 분석을 수행하였다. 그 결과 T3 및 T4 형질전환세포주에서 모두 hH1.5 단백질이 생산되고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 식물체에서 생산된 단백질 (약 42 kDa)은 인체에서 분리한 단백질 (약 32 kDa)과 크기에서 많은 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. 대장균에서 과발현시킨 단백질의 경우 인간태반에서 분리한 단백질과 분자량이 유사하였으나 (Pyo et al.

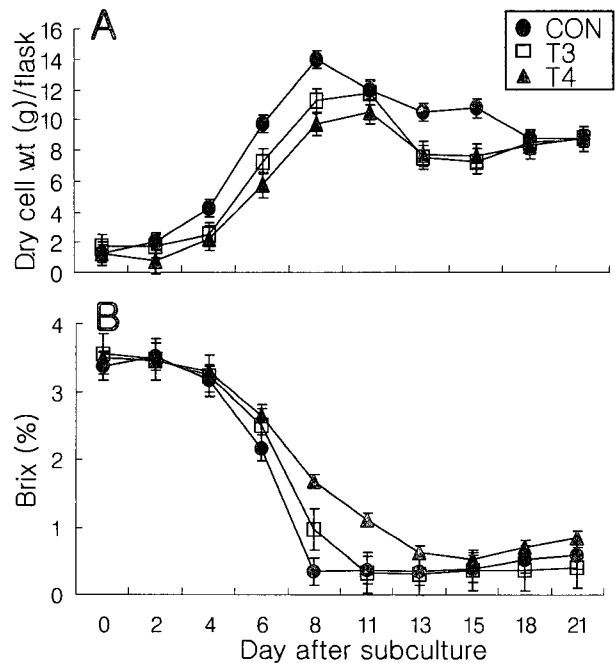


Figure 4. Changes in cell growth (A) and sugar contents in medium (B) in suspension cultures of two transgenic (T3 and T4) and non-transformed control (CON) tobacco cell lines.

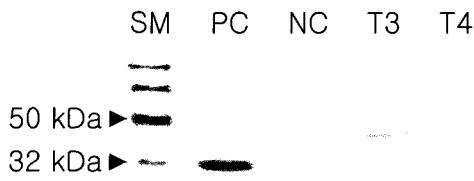


Figure 5. Western blot analysis of two transgenic (T3 and T4) and non-transformed control (NC) tobacco cell lines. SM, size marker; PC, purified hH1.5; NC, protein extracts from non-transformed cells as a negative control; T3 and T4, protein extracts from 8 days after subcultures in suspension cultures of T3 and T4 transgenic tobacco cell lines, respectively.

2001), 식물세포에서 생산된 단백질은 인간태반에서 분리한 단백질 보다 분자량이 증가하였음을 알 수 있다. 이는 식물이 미생물과 발현양상이 상이하며, 또한 인간의 단백질을 식물체에서 발현 시 그 발현 양상이 차이가 있음이 제시된 것이다. 이는 식물체에서 일어나는 glycosylation이나 다른 modification의 상이함에서 생기는 차이로 볼 수 있으며 이러한 상이한 현상이 어떻게 일어나고 최종 재조합 단백질의 약리활성에 어떠한 영향을 미칠지는 향후의 과제라 하겠다. 사람이 생산하는 단백질과 식물체가 생산하는 단백질의 modification 양상을 정확히 이해한다면 이러한 의료용 단백질의 이용에 용이하게 이용 할 수 있을 것으로 사료되어 진다.

본 연구에서는 류마티스 관절염에 효과가 있는 인간 hH1.5 유전자를 담배 현탁배양세포에 도입하여 도입된 유전자의 발현을 단백질 단계까지 관찰하였다. 본 연구에 사용된 배양세포 특이적이며 스트레스 유도성 *SWPA2* 프로모터의 특성에 의해 나타날 생산성의 변화 및 절대적인 단백질 생산량의 관찰은 후속 연구로 진행 할 예정이다.

적 요

Collagen에 의해 유도되는 류마티스 관절염을 저해하는 효과가 있는 인간 histone 단백질 H1.5 (hH1.5)를 산화스트레스 유도성 *SWPA2* 프로모터에 연결하여 형질전환 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2) 배양세포주를 개발하였다. hH1.5 유전자는 *Agrobacterium* 매개 형질전환 방법으로 담배 BY-2 배양세포에 도입되었다. 형질전환 캘러스는 150 mg/L kanamycin과 300 mg/L claforan이 포함된 변형된 MS 선발배지에서 선발하여, PCR분석으로 hH1.5 유전자의 도입을 확인하였다. 형질전환 현탁배양세포에서 hH1.5 단백질의 발현은 northern 분석과 Western 분석으로 확인하였는데, 담배배양세포에서 재조합 hH1.5 단백질 (42 kDa)은 인간의 것 (32 kDa)과는 다른 크기의 단백질이 확인되었다. 금후 재조합 hH1.5 단백질의 자세한 특성규명이 요구된다.

사사 - 본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원 (#PF0330602-02)에 의해 수행되었다.

인용문헌

Choi SM, Lee OS, Kwon SY, Kwak SS, Yu DY, Lee HS (2003) High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures. *Biotech Lett* 25: 213-218

Class R, Lindman S, Fassbender C, Leinenbach HP, Rawer S, Emrich JG, Brady LW, Weppewauer M (1996) Histone H1 suppresses tumor growth of leukemia cells *in vitro*, *ex vivo* and in an animal model suggesting extracellular functions of histones. *Am J Clin Oncol* 19: 522-531

Decker EL, Reski R (2004) The moss bioreactor. *Curr Opin Cell Biol* 7: 166-170

Gjerset R, Gorka C, Hasthorpe SI, Lawrence JJ, Eisen H (1982) Developmental and hormonal regulation of protein H1 degrees in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2333-2337

Jung N, Kim DS, Kwon HY, Yi YW, Kim D, Kang AD, Cho CH, Hong SS, Lee HS, Bae I (2000) Suppression of collagen-induced arthritis with histone H1. *Scand J Rheumatol* 29: 1-4

Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur YK, Bang JW, Kwak SS (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweet potato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51: 831-838

Kinkade JM Jr, Cole RD (1966) The resolution of four lysine-rich histones derived from calf thymus. *J Biol Chem* 241: 5790-5797

Kwon SY, Jo SH, Lee OS, Choi SM, Kwak SS, Lee HS (2003) Transgenic ginseng cell lines that produce high levels of a human lactoferrin. *Planta Med* 69: 1005-1008

Multigner L, Gagnon J, Van Dorsselaer A, Job D (1992) Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. *Nature* 360: 33-39

Pyo SH, Lee JH, Park HB, Hong SS, Kim JH (2001) A large-scale purification of recombinant histone H1.5 from *Escherichia coli*. *Protein Express Purif* 23: 38-44

Ruiz-Carrillo A, Wangh LJ, Littau VC, Allfrey VG (1974) Changes in histone acetyl content and in nuclear non-histone protein composition of avain erythroid cells at different stages of maturation. *J Biol Chem* 249: 7358-7368

Srinivas BMM, Khadake JR, Rao MRS (1998) Expression of rat histone H1d in *Escherichia coli* and its purification. *Protein Express Purif* 12: 38-44

Thomas JO (1999) Histone H1: Location and role. *Curr Opin Cell Biol* 11: 312-317

Uno T, Uchikawa T, Iwasaki T, Aiwono Y (1995) Molecular characteristics of porcine thymus histone H1 variants. *Biosci Biotech Biochem* 59: 420-424

(접수일자 2004년 6월 5일, 수리일자 2004년 6월 15일)