

백합화분에서의 Glutamate Decarboxylase 유전자 발현

박희성* · 신동일
대구가톨릭대학교 생명공학과

Lily Pollen Culture Expressing Glutamate Decarboxylase Gene

Hee-Sung Park* and Dong-II Shin
Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea

Received October 9, 2008; Accepted October 13, 2008

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, gene expression, glutamate decarboxylase, pollen culture

백합은 관상용 화훼작물로서 그 꽃은 일반인의 많은 사랑을 받고 있다. 백합꽃은 다른 식물에 비하여 월등하게 많은 양의 꽃가루(화분)를 생산하는데 이 때문에 특히 흰색 백합꽃잎에 노란색 꽃가루가 번질 때 꽃의 품질을 심하게 저하시킬 수 있다. 한편 백합식물은 당뇨에 효과가 있는 민간요법제라도 전해지고 있다. 일반적으로 대다수 식물에서는 화분을 생산하게 되며 이는 종자결실을 위한 것으로서 음성 유전체를 지니는 화분이 암술에 도착하는 수분과정을 거치게 되면 화분관이 발달하여 신장되는 화분은 배주에 이르러 난세포에 sperm cell이 전달되는 수정이 이루어진다.^{1,2)} 신장되는 화분의 길이는 화분 종류에 따라 다르지만 자연 상태에서 주두나 주두로 통하는 입구에서 암술까지의 거리정도인데 옥수수의 경우 20 cm 정도에 이르기도 한다. 이는 화분립의 크기에 비할 때 수만 배에 이르는 것이다. 화분은 인위적으로 유전자 운반체로 이용할 수 있는데 *Agrobacterium tumefaciens* 또는 particle bombardment 등에 의한 rDNA의 형질전환 후 인공 수분시킬 때 새로운 식물체를 기대할 수 있다.³⁻⁵⁾ 형질전환 화분은 기내배양을 통한 도입유전자의 발현 분석이 가능하며⁶⁻⁸⁾ 적정 온도와 3-5 종의 성분(sucrose, boric acid, calcium nitrate 등)을 제공하면 하루 또는 수일 내에 그 배양이 가능하다.

Glutamate decarboxylase(GAD67)은 인슐린의존성 type I 당뇨병(Insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM)와 관련성이 깊

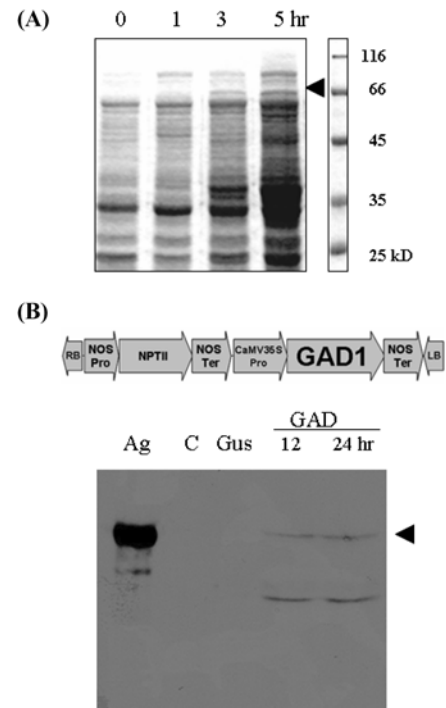


Fig. 1. Confirmation of GAD67 protein expression in pollen culture. (A) GAD67 expression at 1, 3 and 5 hr after IPTG treatment to recombinant *E. coli*. (B) pBI-GAD1 DNA construct is also shown. C. Analysis of pollen soluble proteins in immune reaction to monoclonal anti-GAD67 IgG: Ag, rGAD protein; C, non-transformed pollen (24 hr cultivation); GUS, pBI121-transformed pollen (24 hr cultivation); GAD, pBI-GAD1-transformed pollen (12 and 24 hr cultivation).

은 것으로 알려져 있다. GAD67발현 감자를 non-obesity diabetes(NOD) mouse에 경구 투여 시 이에 대한 항체형성으로 인한 자가면역 경감으로 인하여 비투여군의 70% 당뇨 발생에 비해 투여군에서는 20% 만이 발생하는 결과가 보고된 바 있다.⁹⁾ 본 연구에서는 다량 수집이 가능한 백합화분에 대하여 GAD67 유전자인 GAD1도입을 수행하고 그 발현을 분석함으로써 화분배양체를 이용한 식용당뇨백신 연구의 기반을 마련하였다.

먼저 ATCC로부터 human GAD1 DNA clone(MGC-26799)을 입수하여 PCR cloning을 먼저 실시하였다. 즉, ORF 및 cloning site를 포함할 수 있도록 forward 및 reverse primer(각각 5'-aggctgcacaccgagctgatggcgtcttcg-3' 및 5'-aggagctcgaaggatgattacagatctctggcc-3')를 준비하여 PCR(30 cycle: 94°C, 30 sec; 53°C, 30 sec; 72°C, 2 min)을 수행한 후 결과물인 1.8 kb DNA를 pT7Blue에 cloning (pT7-GAD1)하고 DNA sequencing을 통하여 확인하였다. 이어서 pBuescript SK의 *XbaI* 및 *SacI* 위치에 subcloning을 실시하여 pSK-GAD1을 제작하였다. pSK-GAD1을 지닌 *E. coli* XL-1Blue는 배양 및 IPTG 투여를 통해 단백질 유도발현을¹⁰⁾ 실시하고 SDS-PAGE 및 immuno-blotting을 실시함으로써 박테리아발현을 통한 GAD67의 분자량 및 면역반응 여부를 확인하였다(Fig. 1A). 이를 통하여 inclusion

*Corresponding author
Phone: +82-53-850-3245; Fax: +82-53-850-3548
E-mail: hspark@cataegu.ac.kr

body를 사용한 SDS-PAGE에서는 IPTG 1시간 처리 후부터 67,000 Da의 단백질이 유도 발현되는 것이 확인되었다. 이로써 pSK-GAD1의 단백질 coding 정보를 *E. coli*를 이용한 발현으로 확인할 수 있었다.

pSK-GAD1의 *Xba*I/*Sac*I DNA fragment는 pBI121ΔGUS에 삽입한 후 Fig. 1B와 같이 식물발현 vector인 pBI-GAD1을 제작하였으며 이는 *A. tumefaciens* LBA 4404에 도입함으로써 화분으로의 GAD1 형질전환을 준비하였다. 백합화분을 준비하기 위하여 개화가 이루어지고 있는 백합을 다량 입수하여 화분이 충분히 성숙하였을 때 이들을 수집하여 냉동고(-20°C)에 보관하였다. 화분의 기내배양은 500 mg 화분을 50 ml의 pollen growth medium(PGM; 1.6 mM H₃BO₃, 1.8 mM Ca(NO₃)₂, 7% sucrose, pH 5.7)이 들어있는 petri plate에서 27°C, 16-24 hr 및 암 조건에서 이루어졌다. 화분의 형질전환을 위하여 먼저 백합화분을 aluminum oxide 입자(평균직경 40 nm)와 1:3 (v/v)으로 혼합하여 vortex를 이용한 교반(3 min)을 실시하여 물리적 표면상해를 가하였다.¹¹⁾ 이들은 pBI-GAD1을 지니는 *A. tumefaciens* 세포현탁액(OD₆₀₀=1.0)으로 vacuum infiltration(20 min)을 실시한 후 PGM에 넣고 기내배양 하였다. 신장된 화분은 여과, 세척을 통하여 모은 후 액체질소를 이용하여 곱게 갈고 GAD1의 발현을 측정하였다. 화분에서의 GAD1 단백질 발현분석을 위하여 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리한 후 Western blotting을 실시하였으며 그 결과는 Fig. 1C에 나타나고 있다. Polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 전이된 화분단백질들 중에서 mAb-GAD1을 인식하는 단백질을 ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare Co.)를 이용하여 확인하였을 때 human GAD67과 유사한 위치에 존재하는 protein band가 약하게 나타나고 있으며 control로서의 GUS reporter DNA를 지니는 pBI121 형질전환화분에서는 나타나지 않고 있다. 이로써 백합화분을 GAD1 유전자로 형질전환하여 신장된 화분체에서 GAD67 단백질 발현이 이루어짐을 보여주고 있다.

본 연구를 통한 백합화분체에서의 GAD67 발현은 장래 향당뇨 식용백신의 개발에 대한 가능성을 제시하였다. 식용과 관련하여 백합화분의 식용안정성은 이미 발표한 바 있다.¹²⁾ 백합화분을 이용한 재조합단백질의 발현 및 생산은 biomass 면에서 기타의 식물발현시스템과 비교할 때 불리한 것은 사실이지만 발현수준 증대에 의한 극복으로 그 가치를 기대하고 있다.

참고문헌

- McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* **5**, 1265-1273.
- Taylor, L. P. and Helper, P. K. (1997) Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 461-491.
- Aronen, T. S., Nikkanen, T. O. and Haggman, H. M. (1998) Compatibility of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine pollen. *Can. J. For. Res.* **28**, 79-86.
- Langridge P., Bretschneider, R., Lazzeri, P. and Lorz, H. (1992) Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway, a critical assessment. *Plant J.* **2**, 631-638.
- Tjokrokusumo, D., Heinrich, T., Wylie, S., Potter, R. and McComb, J. (2000) Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Rep.* **19**, 792-797.
- Fernando, D. D., Owens, J. N. and Misra, S. (2000) Transient gene expression in pine pollen tubes following particle bombardment. *Plant Cell Rep.* **19**, 224-228.
- Okada, T. and Toriyama, K. (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.
- Haggman, H. M., Aronen, T. S. and Nikkanen, T. O. (1997) Gene transfer by particle bombardment to Norway spruce and Scots pine pollen. *Can. J. For. Res.* **27**, 928-935.
- Ma, S., Huang, Y., Yin, Z., Menassa, R., Brandle, J. E. and Jevnikar, A. M. (2004) Induction of oral tolerance to prevent diabetes with transgenic plants requires glutamic acid decarboxylase (GAD) and IL-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 5680-5685
- Park, H. S. and Choi, J. W. (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.
- Kim, S. S., Shin, D. I. and Park, H. S. (2007) Transient β -glucuronidase expression in lily pollen via wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotech. Lett.* **29**, 965-969.
- Park, H. S., Heo, Y. J., Byun, J. A. and Heo, Y. (2005) Immunotoxicological evaluation of pollen intake using mice model. *Kor. J. Env. Hlth.* **31**, 287-293.