

Epidermal growth factor 발현을 위한 화분립의 이용

¹최 병 진 · † 박 희 성

¹대구가톨릭대학교 원예학과, 생명공학과
(접수 : 2008. 10. 9., 게재승인 : 2008. 10. 20.)

Utilization of pollen grains for the expression of epidermal growth factor

Byung-Jin Choi¹ and Hee Sung Park[†]

¹Department of Horticulture, Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu Kyungsan, Kyungbuk, 712-702, Korea
(Received : 2008. 10. 9., Accepted : 2008. 10. 20.)

Pollens grains collected from fully dehisced lily (*Lilium longiflorum*) anthers were given wounds by means of shaking in the presence of aluminum oxide particles. They were transformed by infiltration with *Agrobacterium* cells harboring a synthetic DNA encoding signal peptide-fused epidermal growth factor (EGF). After incubation for 24 hr *in vitro*, the pollen culture showed that EGF mRNAs and proteins were successfully expressed in the analysis of cDNA blot hybridization and immuno-blotting.

Key Words : lily pollen, agroinfiltration, epidermal growth factor, immuno-blotting

서 론

대다수의 식물은 종자결실을 위한 꽃가루 (화분)를 생산하며 웅성 유전체를 지니는 이들 화분은 암술에 도착하는 수분과정을 거쳐 화분관이 생성되고 결국 신장되는 화분은 배주에 이르러 난세포에 sperm cell을 전달함으로써 이중 수정 (double fertilization)이 이루어진다(1, 2). 화분은 살아있는 유전자 운반체로 이용할 수 있는데 *Agrobacterium* 또는 particle bombardment 등을 이용하여 외래 DNA를 주입받을 수 있고 이를 인공 수분시킬 경우 새로운 품종의 식물체를 개발할 수 있다(3-5). 형질전환 화분은 기내배양을 통하여 용이하고도 신속하게 그 발현 분석이 가능하다(6-8). 일반적으로, 화분은 적정 온도와 몇 가지 배양 성분 (sucrose, boric acid, calcium nitrate 등)이 제공되면 24-48 h 내에 *in vitro*에서 수백-수천 배 그 신장이 가능하며 효율적 형질전환이 원활하게 이루어질 경우, biofarming을 위한 biofactory로서도 가능성이 있다. 본 연구에서는 백합꽃에서 다량으로 수집할 수 있는 화분에 대하여 epidermal growth factor (EGF)의 유전자 도입을 실시하고 발현을 분석함으로써

EGF의 생산 가능성을 시험하였는데 Kim 등(9)에 의하여 백합 화분의 형질전환 방법이 개발된 바 있다. Human EGF (hEGF)는 urogastrone으로도 불리며 53 amino acids의 6.2 kD 정도의 polypeptide다. hEGF의 기본적인 기능은 상피세포의 증식, 분화 및 조직 형성 관여로써 또한 위산분비 저해작용도 갖는다(10). 현재 미생물을 이용한 rEGF 생산이 가능하며 이는 희귀단백질의약품으로 분리되어 있다.

6.2 kD EGF 발현을 위한 발현 vector의 제작은 다음과 같이 수행하였다. 53 amino acids의 human kidney EGF precursor(11)에 근거하여 설계한 *EcoRI* site 및 mature EGF N-terminus (Asn) code를 지니는 forward primer (5'-gccgaattcaatagt-internal 72 nt-gacaagtat-3')와 *SacI* site를 지니면서 forward primer와 21 nt가 겹치는 reverse primer (5'-ctagagctcttagcg-internal 72 nt-tgcatactgtccaatgcttcaat-3')를 이용한 PCR (95°C, 30 sec; 60°C, 20 sec; 72°C, 1 min: 30 cycles)로서 합성 EGF를 제작하고 이를 T-vector에 cloning (pT-EGF)하였다. 한편, *Arabidopsis thaliana*의 basic chitinase signal sequence (12)를 근거로 *BamHI* site 및 start codon이 포함되는 forward primer (5'-ggatcatg-internal 33 nt-cta-3') 및 *EcoRI* site를 지니면서 forward primer와 15 nt가 겹치는 reverse primer (5'-acgaatcggc-internal 24 nt-gat-3')를 PCR (95°C, 30 sec; 60°C, 20 sec; 72°C, 1 min: 30 cycles)로 증폭하고 이는 *BamHI* 및 *EcoRI*를 처리한 pT-EGF의 upstream에 삽입하여 pT-Sig-EGF를 cloning하였다. 결과는 DNA

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea
Tel : +82-53-850-3245, Fax : +82-53-850-3548
E-mail : hspark@cataegu.ac.kr

sequencing에 의하여 확인하였다. 이는 다시 *Bam*HI 및 *Sac*I 으로 처리함으로써 얻은 0.2 kb DNA 조각을 pBI121 ΔGUS에 클로닝하여 Fig. 1(A)와 같은 pBI-Sig-EGF를 확보하였다.

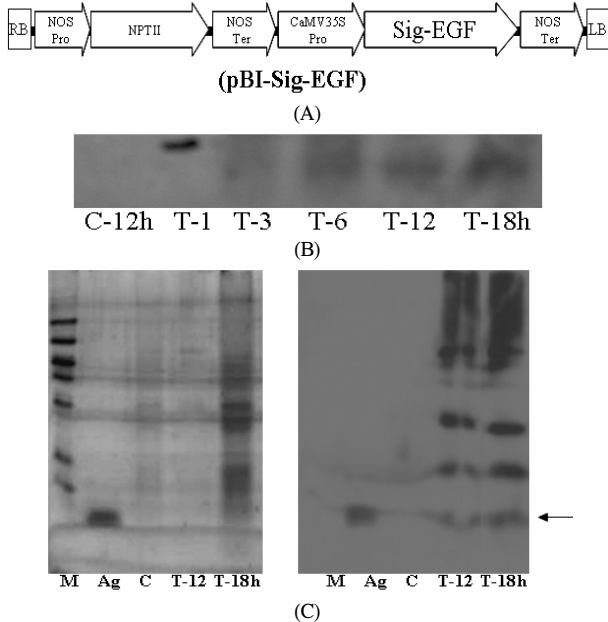


Figure 1. Epidermal growth factor vector DNA construct and its expression in pollen culture.

(A) pBI-Sig-EGF construct: signal-fused EGF replaced GUS in plant binary expression vector, pBI121. (B) cDNA blot hybridization for EGF mRNA transcripts: C, non-transformed pollen culture; T, EGF transformed pollen culture at several cultivation times. (C) Detection of pollen-producing protein in reaction to mAb against EGF: Ag, recombinant EGF; C, GUS transformed pollen culture; T, EGF transformed pollen culture.

개화기에 다다른 백합을 다량 입수하여 충분한 개화가 이루어져 화분이 성숙하였을 때 이들을 수집하였다. 화분 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 hrs 및 암 조건에서 수행하였다. 화분 형질전환을 위하여 먼저 백합화분을 aluminum oxide 입자 (평균직경 40 μm)와 1 : 3 (v/v)으로 혼합하여 vortex를 이용한 교반 (3 min)을 실시하여 물리적 표면상해를 가하였다(13). 이들은 pBI-Sig-EGF를 지니는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세포액 (OD₆₀₀=1.0)으로 vacuum infiltration (20 min)을 실시한 후 PGM에 넣고 기내배양을 실시하였다. 신장된 화분은 여과, 세척을 통하여 모은 후 액체질소를 이용하여 급게 갈고 EGF mRNA의 발현을 측정하였다. 즉, Tri-reagent (MRC Inc., USA)로 추출한 total RNA로부터 M-MuLV reverse transcriptase 및 EGF 특이 reverse primer (5'-ttagcgcagttcccacttcag-3')를 이용한 1st cDNA를 제작하고 agarose (2%) 전기영동 및 hybridization으로 분석하였다 (12). EGF probe제작 및 결과확인 은 non-radioisotopic Bright-Star system (Ambion Inc.)을 이용하였는데 Fig. 1(B)는 그 결과를 나타내고 있는데 배양 후 12 hr부터 mRNA 발현을 확인할 수 있었다. 비형질전환의 배양화분에는 전혀 나타나지 않았으며 이로써 mRNA의 발현이 정상적으로 이루어짐을 알 수 있었다.

화분에서의 EGF 단백질 발현분석을 위하여 15% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리 후 western blotting을 실시하였으며 그 결과는 Fig. 1(C)에 나타나고 있다. PVDF membrane에 전이된 화분단백질들 중에서 mAb-EGF를 인식하는 단백질은 standard EGF와 거의 같은 위치에서 나타나고 있으며 대조적으로 pBI121 형질전환화분에서는 나타나지 않고 있다. 이러한 결과는 signal peptide의 역할이 잘 이루어진 것으로 판단되었으며 이들의 bioactivity는 추후 연구되어야 할 것이다.

EGF는 현재 재조합 대장균을 이용하여 생산되고 있으며 노화방지용 기능성 화장품이나 당뇨병성 족부궤양치료제의 핵심 원료로 이용되고 있다. 또한 그 적용도 욕창, 화상, 성형 등으로 넓혀지고 있는 의약단백질이다. 본 연구에서는 화분을 biofactory로 이용하여 EGF의 발현을 확인하여 그 생산가능성을 제시하였는데 단 시간 내 발현이 가능하다는 것과 살아 있는 화분을 냉동 보관하고 필요에 따라 언제든지 이용할 수 있다는 것이 장점이다. 보다 경제적 시스템으로서의 개발이 과제로 남아있다.

요 약

개화시기의 수술로부터 수집한 백합화분을 aluminum oxide 미세입자와 섞어 교반에 의해 상해를 발생시켰다. 이어서 이들 화분은 signal peptide-fused epidermal growth factor (EGF) DNA를 지니는 *Agrobacterium* 세포로 vacuum infiltration을 시켰으며 24 hr 화분신장을 통한 배양을 실시하였다. 이들 신장 화분에서의 EGF mRNA 및 단백질 발현은 성공적으로 확인되었으며 이는 cDNA blot hybridization 및 immuno-blotting의 분석결과이다.

REFERENCES

- 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.
- 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.
- 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.
- Hess, D., K. Dressler, and R. Nimmrichter (1990), Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelet of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Sci.* **72**, 233-244.
- 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.
- Tjokrokusumo, 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.

9. Kim, S. S., D. I. Shin, and H. S. Park (2007), Transient β -glucuronidase expression in lily pollen via wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation, *Biotech. Lett.* **29**, 965-969.
10. Hollenber, M. D. and H. Gregory (1997), Human urogastrone and mouse epidermal growth factor share a common receptor site in cultured human fibroblasts, *Life Sci.* **20**, 267-74.
11. Bell, G. I., N. M. Fong, M. M. Stempien, M. A. Wormsted, D. Caput, L. Ku, M. S. Urdea, L. B. Rall, and R. Sanchez-Pescador (1986), Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization, *Nucl. Acid. Res.* **1**, 8427-8446.
12. Gnanasambandam, A., I. G. Polkinghorne, and R. G. Birch (2007), Heterologous signals allow efficient targeting of a nuclear-encoded fusion protein to plastids and endoplasmic reticulum in diverse plant species, *Plant Biotech. J.* **5**, 290-296.