

## Expression of Functionally Human Interleukine-18 by Tobacco Plant Cell.

임영인, 권태호, 박승문\*, 김대혁, 장용석, 양문식  
전북대학교 생물과학부, 전북대학교 기초과학연구소  
전화 (063) 270-3339, FAX (063) 270-4334

### Abstract

IL-18, formerly known as IGIF(interferon-gamma inducing factor), is structurally IL-1 related but functionally IL-12 related pro-inflammatory cytokine. The human IL-18(hIL-18), like IL-1 $\beta$ , is synthesized as a biologically inactive precursor of 24kDa lacking a signal peptide, and then cleaved into an active mature form by cystein protease IL-1 $\beta$  converting enzyme (ICE: caspase-1). We tested if the mature hIL-18 can be expressed and secreted into culture medium by transforming the forming gene construct consisting of a mature hIL-18 gene fused to signal peptide of rice amylase 1A. Secondly, we were tested if the pro-IL-18 could be processed into a biologically active form by caspase-1 like protease in plant. Cell suspension culture was established from the leaf-derived calli of transgenic tobacco plant. Southern and Northern blot analysis indicated the expression of both pro-hIL-18 and mature hIL-18 plant cells. Western blot analysis introduced the protein products of pro-hIL-18 and mhIL-18 were observed in transgenic cell lines. In addition, the molecular size of recombinant pro-hIL-18 and mhIL-18 were estimated to be 24kDa and 18kDa, respectively. ELISA revealed that the amount of pro-hIL-18 was 1.3ug per gram of fresh weight calli. Moreover, the presence of mhIL-18 was detected in the culture medium and it appeared to be 25ug/L.

### 서론

Interferon  $\gamma$  inducing factor인 Interleukin 18(IL-18)은 새롭게 발견된 cytokine으로 구조적으로 IL-1과 유사하며 T-cell활성에 관여한다<sup>1)</sup>. IL-18은 mice에 bacterial lipopolysaccharide와 *Propionibacterium acnes*를 접종해서 endotoxin shock을 유도해서 분리해 얻어졌다. IL-18은 IL-1 $\beta$ 와 같이 생리활성과 signal peptide가 없는 24kDa의 precursor molecule로 합성되어진다. 이런 형태를 pro-IL-18이라 하며 이것은 IL-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE, Caspase-1) 이라 불리는 intracellular cystein

protease 에 의해 잘려져서 생리활성으로 된다<sup>2,3)</sup>. IL-18은 heterodimeric receptor에 결합하여 nuclear factor  $\kappa$ B(NF $\kappa$ B)-inducing kinase를 활성화시켜서 핵으로 NF $\kappa$ B의 translocation을 일으킨다<sup>1)</sup>. 또한, IL-18은 INF- $\gamma$ 를 유도하고 NK cell cytotoxicity를 증가시키며 Th1 response와 다른 cytokine을 생산고 B cell에 의해 합성되는 Ig E를 억제시킨다<sup>2)</sup>. 이러한 작용으로 hIL-18은 항암제, 항바이러스제, 항균제등의 치료제로 사용할 수 있다. 이미 IL-18은 *E. coli*와 동물세포 배양을 이용한 방법들이 사용되어 지고 있으나, 이러한 방법들은 생산된 IL-18 단백질의 경제에 따른 어려움 및 숙주세포의 감염에 따른 2차 감염에 대한 안전성의 문제가 있다. 식물 세포 배양은 미생물 및 동물세포 배양을 이용한 생산 체계와 비교하여 경제적인 생산비, 생산물의 안전성, glycosylation등과 같은 post-translational modification이 필요한 단백질의 생산이 가능하다는 장점으로 이용되고 있다<sup>4)</sup>.

본 실험에서는 pro-IL-18을 식물에 발현하여 이것이 식물체 내에서 ICE와 유사한 protease에 의해 생리활성을 지닌 IL-18로 processing이 되는 지를 확인하고자 하였으며, 식물 세포배양을 통하여 사람의 IL-18을 생산하고자 mature IL-18에 rice Amy1A signal peptide<sup>5)</sup>를 결합시켜 이 유전자를 담배에 형질전환 시킨 후 담배의 현탁배양을 통하여 생리활성을 지닌 hIL-18을 생산하고자 하였다.

### 실험재료 및 방법

RT-PCR을 수행하여 확보한 hIL-18의 cDNA는 식물발현벡터인 pMY27에 sucloning하였다. 또한 PCR을 이용하여 확보한 rice amylase 1A signal peptide를 hIL-18의 mature peptide와 결합하여 식물 발현 vector인 pMY27에 도입하여 pMYL42와 pMY47을 제작하였다. 각각의 유전자는 *A. tumefaciens*를 이용하여 담배에 형질전환 시켰으며, 형질전환여부는 genomic DNA PCR을 실시하여 확인하였으며, hIL-18유전자의 발현은 Northern blot analysis를 시행하여 확인하였다. Northern blot analysis결과를 통해서 hIL-18의 유전자 발현이 높은 식물체를 선발하였으며, 이로부터 callus를 유도하여 현탁배양을 하였다. hIL-18의 생산은 ELISA와 western blot analysis를 수행하여 확인하였으며, human myelomonocytic KG-1 cell을 이용하여 생리활성을 확인하였다.<sup>6,7)</sup>

### 결과 및 고찰

RT-PCR을 통하여 hIL-18의 cDNA를 cloning 하였으며 이를 식물발현벡터인 pMY27에 도입하여 성공적으로 pMYL42를 제작하였고, rice amylase 1A signal peptide와 hIL-18의 mature peptide가 결합된 pMYL47을 제작하였다(Fig. 1). 각각

의 유전자를 담배에 형질전환 후 재 분화된 담배의 genomic DNA에 이들 각각의 유전자가 안정적으로 삽입되었는지 genomic DNA PCR을 통해서 확인하였다(Fig. 2). Northern blot analysis를 통하여 유전자의 발현이 높은 식물체를 선발하였으며 이로부터 callus를 유도하여 현탁배양하였다. 현탁배양 후에 배지내로 분비된 hIL-18을 ELISA를 통하여 확인하였으며 pMYL42의 형질전환 세포에서는 생체중 1g당 1.3 ug의 hIL-18의 생산이 확인되었으나 배양액에서는 hIL-18의 생산을 확인할 수 없었다. 한편, pMYL47의 형질전환 세포에서는 생체중 1g당 44 ng의 hIL-18의 생산이 확인되었고 배양액에서는 25ug/L의 hIL-18의 생산을 확인하였다. Western blot analysis의 결과 pMYL42의 형질전환 세포에서는 24kDa의 band를 확인하였으며, pMYL47의 형질전환 세포에서는 24kDa과 18kDa의 band를 확인하였다. 생산된 hIL-18의 생리활성을 확인 한 결과 pMYL47의 형질전환 세포배양을 통하여 생산된 hIL-18에서만 생리활성이 확인되었다. 이상의 결과로 hIL-18은 식물세포내에서 정상적인 processing은 불가능 하나 유전자조작을 통하여 활성이 있는 hIL-18의 생산이 가능함을 확인하였다.

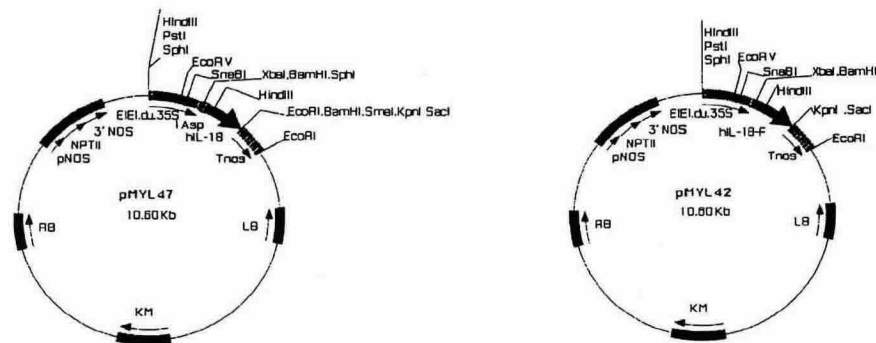


Figure 1. Plasmid construction for expression of hIL-18 in tobacco plant

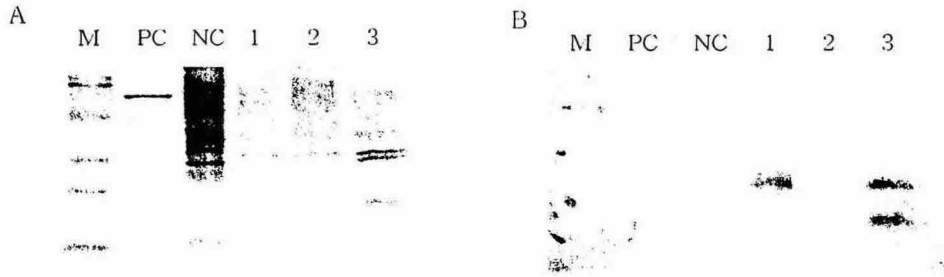


Figure 4. SDS-PAGE(A) and Western blot analysis(B) of transformed plant with pMYL42 and pMYL47, M, PC, NC, denote size maker, positive control, negative control, respectively. Lane 1, callus from transformed plant with pMYL42; lane 2, supernatant of transformed suspension cell with pMYL42; lane 3, supernatant of transformed suspension cell with pMYL47

#### 감사의 글

본 연구는 과학기술부의 국가지정연구실 사업(2000-N-NL-C-212)의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

#### 참고문헌

1. Dinarello, C.A. Interleukin-18. (1999) *Methods* 19: 121-132
2. Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Harura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S. and Kurimoto, M. Cloning of a new cytokine that induce IFN- $\gamma$  production by T cells. (1995) *Nature* 378:88-91.
3. Walter, P., Johnson, A.E. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. (1994) *Annual Review Cell Biology* 10: 87-119.
4. Benvenuto E, Ordas RJ, Tavazza R, Ancora G, Biocca S, Cattaneo A, Galeffi P. 'Phytoantibodies': a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants. (1991) *Plant Molecular Biology* 17(4):865-74.