

Expression of *Helicobacter pylori* urease in plants to use as an edible vaccine

강귀현, 한소천, 강태진¹, 양문식
전북대학교 생물과학부, ¹전북대학교 기초과학연구소
전화 (063) 270-3569, FAX (063) 270-4334

Abstract

Helicobacter pylori is the etiologic agent of human gastritis and peptic ulceration and produces urease as the major protein component on its surface. *H. pylori* urease is known to serve as a potent immunogen as well as major virulence factor. In order to express the recombinant urease in tobacco plants, a DNA fragment containing the minimal *H. pylori* urease gene cluster was subcloned into a plant expression vector. The recombinant vector was transformed to tobacco plants. The integration of the recombinant plasmids into tobacco chromosomal genome was verified by genomic PCR. Expression to mRNA was confirmed by Northern blot analysis, and expression to recombinant urease protein was observed by Western blot analysis. These results showed that the recombinant urease can be produced in tobacco plants and will be tested for immune response to use as an edible vaccine.

서 론

*Helicobacter pylori*는 gram-negative인 막대형 박테리아로서, gastric mucosa에 서식하면서, 위염, 소화성 궤양, 위궤양, 십이지장 궤양 등 다양한 gastroduodenal 질병의 주요 원인균이다^{1,2}). *H. pylori*는 soluble cell protein의 6%에서 그 이상으로 높은 활성도를 갖는 urease를 생산한다. 이는 *H. pylori*의 cytoplasm과 표면에 존재하며, 2개의 subunit enzyme으로 구성되어있다. 또한 이는 요소를 암모니아와 이산화탄소로 가수분해하여 암모니아가 박테리아 주위환경을 중화시켜서, 강 염산에 의한 공격으로부터 대처할 수 있게 한다. 이렇게 urease는 박테리아의 pathogenesis와 생존에 필요하다. 이 urease는 550kDa의 multimeric enzyme으로서 66kDa의 UreB와 30kDa의 UreA으로 구성되어있으며, 이들은 표면 단백질로서 주요 항원성 결정인자 중의 하나이다. 이 UreA와 UreB 각각은 면역성을 가지게 하며, UreA보다는

UreB가 더 강하게 면역원성을 가지고 있다. 또한, 이 두 유전자가 동시에 존재할 경우, 그 반응은 더욱 증가한다³⁾. 본 연구는 이 면역원성을 가지고 있는 UreA와 UreB 두 유전자를 융합시켜 하나의 fragment로 만든 후, 식물에 도입하여 *Helicobacter pylori*에 대한 효율적인 식물 경구백신의 개발을 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

재조합 벡터 재조합시, UreA+UreB의 두 유전자를 융합한 다음, 소포체 retention signal인 KDEL을 포함한 형태인 UreA+UreB+KDEL의 형태로 융합한 후 벡터에 재조합하였다. 식물체 발현 binary vector로서 CaMV 35S 프로모터로서 외래 유전자를 조절하는 벡터인 pMY27에 UreA+UreB gene과 UreA+UreB+KDEL의 두가지 재조합 벡터를 cloning 하였고, 이는 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 담배에 형질전환하기 위하여 triparental mating method를 이용하였다.⁴⁾ 형질전환된 담배잎을 Kanamycin이 포함된 MS배지에서 키운 후 나온 shoot를 뿌리형성 배지에 옮겨서 재생 식물체를 유도하였다. 이러한 방법으로 재생된 식물체는 genomic PCR을 수행하여 형질전환 여부를 확인하였다. 그리고 형질전환된 담배에서 mRNA가 정상적으로 발현되는지를 알아보기 위해 Northern blot 분석을 수행하였으며, 이 mRNA로부터 정상적으로 protein이 합성되는지를 확인하기 위하여 Western blot 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

pMY27 binary vector에 UreA+UreB gene을 도입하여 재조합한 벡터를 pMYV307, 그리고 UreA+UreB+KDEL를 도입한 벡터를 pMYV312라고 명명하였다 (Fig. 1). 재조합된 벡터를 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 담배에 형질전환하기 위하여 triparental mating method를 이용하였다. 형질전환체로 선택된 담배에 urease 유전자가 정상적으로 삽입되었는지를 알아보기 위해 genomic DNA를 추출하여 genomic PCR을 수행하였다. 이로써 형질전환된 식물체의 경우, 2400bp의 기대했던 크기에서 band를 얻을 수 있었다. 이로써 우리가 원하는 UreA+UreB gene과 UreA+UreB+KDEL gene이 식물체의 chromosomal genome내로 삽입되었음을 알 수 있었다. 또한, Northern blot analysis를 수행하여 우리가 삽입한 유전자가 담배 내에서 정상적 mRNA를 발현함을 확인하였다. 정상적으로 protein이 합성되는지를

확인하기 위하여 Western blot analysis를 수행한 결과, UreA+UreB gene과 UreA+UreB+KDEL gene중 UreA+UreB+KDEL만 우리가 원하는 크기의 band를 확인할 수 있었다. 이는 Urease가 식물체내에서 잘 발현되지 않는 특성을 가지고 있는데, ER retention signal에 의해 targeting된 단백질이 소포체내에서 안정하게 유지되기 때문이라 짐작된다⁵⁾.

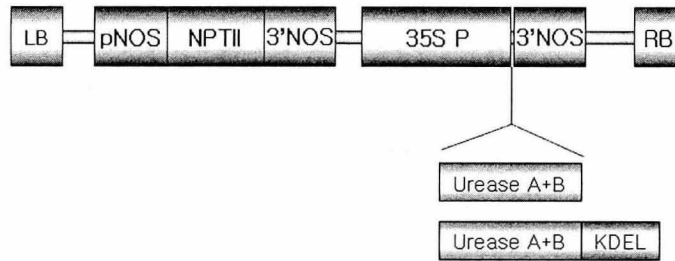


Fig. 1. Construction of recombinant vector.

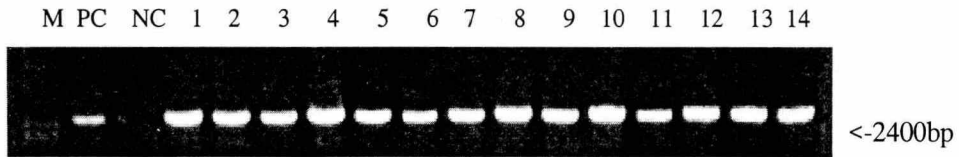


Fig. 2. PCR product for detecting urease gene in transformed tobacco. M, 1kb size marker; PC, positive control; NC, wild-type plant; lanes 1~14, transgenic plants.

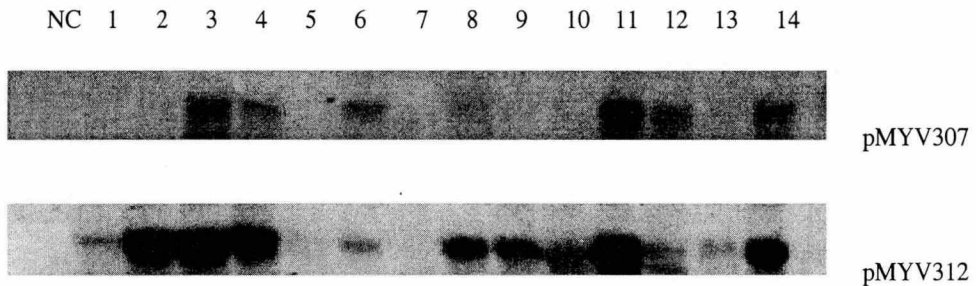


Fig. 3. Northern blot analysis for urease mRNA. NC, wild-type plant; lanes 1~14, mRNA of transgenic plants.

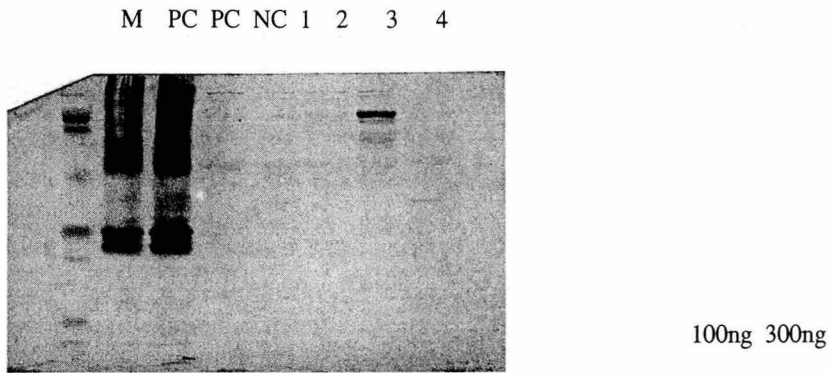


Fig. 4. Western blot analysis of urease protein. PC, Positive control (purified bacterial protein); NC, wild-type plant; lane 1, pMYV307 #3; lane 2, pMYV307 #11; Lane 3, pMYV312 #11; lane 4, pMYV312 #14.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 국제공동연구사업 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Blaser, M. J. (1990), *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation, *J. Infet. Dis.* **161**, 626-623.
2. Cover, T. L., and M. J. Blaser (1992), *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease, *Annu. Rev. Med.* **43**, 135-145.
3. Hu, L. T., P. A. Foxall, R. Russell, and L.T Mobley (1992) Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by UreA and UreB, *Infet. Immun.* **60**, 2657-2666.
4. Hooykaas Paul J. et al. (1994), The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*, *Annu. Rev. Phyto pathol.* **32**, 157-179.
5. McCormick A. A., Kumagai M. H., Hanley K, Turpen T. H., Hakim I., Grill L. K., Tuse D., Levy S., Levy R. (1999), Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **19**, **96**(2), 703-8.