

전사 종결 염기 서열이 *Drosophila melanogaster* Schneider line 2 세포에서 외래 단백질의 발현에 미치는 영향

황인숙 · 박종화 · 이윤형 · 윤재승 · 백광희 · 정인식*

경희대학교 생명공학원, 식물대사연구센터

(2001년 8월 17일 접수, 2001년 9월 29일 수리)

Drosophila melanogaster Schneider line 2(S2) 세포의 외래 단백질 발현 시스템을 이용한 외래 단백질의 한시적 발현을 검토하고, 서로 다른 terminator를 이용하였을 때의 단백질 발현 및 mRNA 발현 정도를 검토하였다. 한시적 발현의 경우 transfection agent를 제거하고 36-48시간 동안 배양한 경우, 가장 높은 green fluorescent protein(GFP)의 발현을 보였다. SV40 p(A), SV40 small T-antigen, 인간 gastrin 3' UTR을 terminator로 지니는 발현 벡터시스템에 각각 endostatin 유전자를 cloning 시킨 뒤 재조합 endostatin의 mRNA의 발현 정도를 비교하였다. 한시적 발현을 시킨 뒤 36시간 후 endostatin의 발현 정도를 비교해 본 결과 SV40 p(A)를 terminator로 사용했을 때 mRNA 및 단백질의 발현이 가장 높았다.

Key words : *Drosophila melanogaster* Schneider line 2(S2) 세포, SV40 p(A), SV40 small T-antigen, 인간 gastrin 3' UTR

서 론

Drosophila melanogaster Schneider line 2(S2) 세포에서의 외래 단백질 발현은 동물 세포에 비해 여러 가지 장점을 지니고 있어 최근 연구가 많이 이루어지고 있다. S2 세포는 chromosomal DNA안에 외래 유전자 수백 copy가 안정적으로 삽입될 수 있어 외래 단백질의 효과적인 발현에 적합하다.¹⁾ 또한 S2 세포는 실온에서 높은 세포 농도로 현탁배양이 가능하며²⁾ trypsin 처리나 CO₂ 공급을 필요로 하지 않기 때문에 유지하기 쉽다는 장점을 지닌다.

진핵세포 mRNA의 3' untranslated region(3' UTR)은 mRNA의 localization과 안정화에 영향을 미쳐 유전자 발현을 조절할 수 있다.³⁾ 세포내의 조건에 따라 합성되는 양이 급격히 변하는 단백질인 성장인자 단백질이나 유전자 조절단백질을 암호화하는 mRNA는 일반적으로 매우 불안정하며 mRNA 자체에 분해를 촉진하는 특정 서열이 존재한다. 예를 들어 몇몇 mRNA의 3' UTR에 존재하는 A와 U 염기가 풍부한 특정 서열을 DNA 재조합 기술에 의해 안정된 mRNA의 3' UTR에 이식하면, 그 mRNA는 불안정한 RNA로 전환된다. 이와 같은 A와 U가 풍부한 특정 서열은 거의 모든 진핵세포 mRNA의 3' 말단에서 발견되며, poly (A) tail의 제거를 자극함으로써 mRNA 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{4,5)}

본 연구에서는 포유 동물세포에서 외부 유전자 발현을 mRNA의 안정도와 RNA polymerase II의 turn-over율을 증가시킬 수 있는 효과적인 polyadenylation과 전사 종결을 통해 더욱 증가시키고자 하였다. 포유 동물세포 발현 벡터의 terminator로 작용하는 SV40 small T-antigen에 인간 gastrin 유전자의

transcription terminator를 도입한 결과 기존 포유 동물세포의 발현 벡터에서보다 외부 유전자 발현을 증가시켰다는 보고가 있어⁶⁾ 본 연구에서는 terminator로 작용하는 SV40 p(A), SV40 small T-antigen, 인간 gastrin 3' UTR을 S2 세포에 적용시켜, 외래 단백질 발현에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

세포주, 플라스미드 및 배양 조건. S2 세포는 10% IMS (insect medium supplement)가 포함된 M3 배지(Sigma, MO, USA)를 이용하였으며 27°C에서 배양하였다. 형질전환된 S2 세포는 항생제 Hygromycin B(300 µg/ml)를 포함하는 10% IMS가 포함된 M3 배지를 사용하여 배양하였다. GFP 또는 쥐 endostatin 유전자를 포함하는 pMT/BiP-GFP or Endo-V5-His/SV40 p(A) 플라스미드는 methallothionein promoter, BiP signal sequence, V5 epitope tag, polyhistidine 부위, SV 40 late polyadenylation signal 및 poly (A) signal을 포함하는 SV 40 small T-antigen을 포함하며, SV 40 small T-antigen은 pSV-β-galactosidase 벡터의 것을 사용하였다. 발현 벡터의 클로닝과 증식을 위한 숙주로는 *E. coli* JM109를 사용하였다. *E. coli* JM109의 생육 배지로는 Luria-Bertani(LB) 액체 배지 (1%(w/v) trypton, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl)와 고체 배지(1.5%(w/v) agar를 포함한 LB배지)에서 37°C로 배양하였으며, 형질전환된 *E. coli*는 ampicillin(50 µg/ml)을 포함한 LB 배지를 사용하여 배양하였다.

재료. DNA 제한효소는 TaKaRa(Tokyo, Japan)에서 구입하였고, T4 DNA ligase도 TaKaRa에서 구입하여 사용하였다. S2 세포 배양을 위한 M3 배지는 Sigma(MO, USA) 제품을 사용하였고, 선별을 위해 사용한 Hygromycin B는 DUCHEFA (Amsterdam, Netherland) 제품을 사용하였다. 한시적 발현에 사

*연락처

Phone: 82-031-201-2436; Fax: 82-031-202-9885
E-mail: ischung@khu.ac.kr

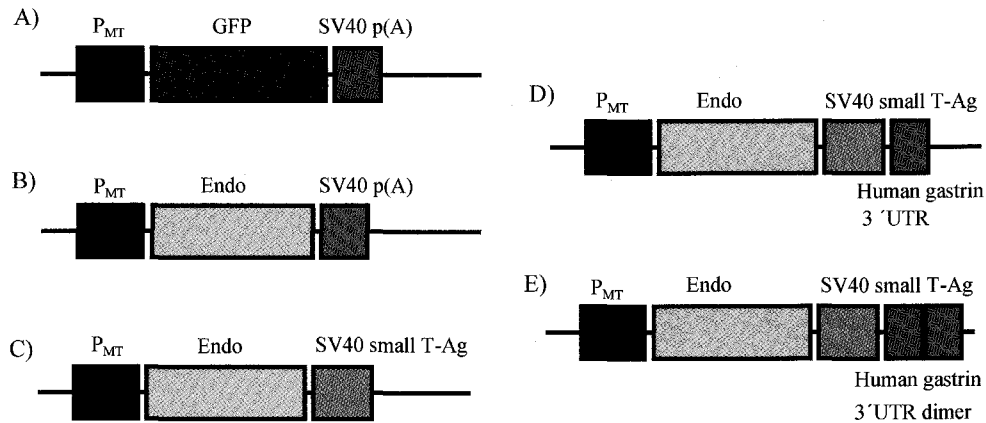


Fig 1. Schematic representation of expression vector containing different terminators. A) pMT/BiP-GFP-V5-His/SV40 p(A); B) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 p(A); C) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-Ag; D) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-Ag/HG 3' UTR; E) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-Ag/HG 3' UTR dimer.

용된 lipofectin은 GIBCO/BRL(NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해 사용된 T-25, T-75, 6-well plate는 Nunc(NY, USA) 제품을 사용하였다.

인간 gastrin 3' UTR 유전자 클로닝. 인간 gastrin 3' UTR은 polymerase chain reaction(PCR)을 통해 pSV- β -galactosidase 벡터로부터 증폭시켰다. Sense primer는 5'-GTCGACGATAATATA TGG-3'이며 anti-sense primer는 5'-GTCGACCTGCAGCTC-3'이다. PCR을 통해 증폭된 인간 gastrin 3' UTR을 *Sal* I 제한 효소로 부분절단하였다. 여기서 얻은 88 bp 유전자 조각을 아가로스 겔 전기영동을 통하여 정제한 뒤 pGEM-T 벡터(Promega, USA)에 삽입시켜 pGEM-T/HG 3' UTR을 만들었다. pMT/BiP/V5-His(3.6 kb)를 *Sal* I 제한 효소로 부분절단하고 그 사이에 HG 3' UTR을 삽입시켜 pMT/BiP-V5-His/SV 40 p(A)/HG 3' UTR을 만들었다(Fig. 1). 이 재조합 플라스미드를 *E. coli* JM109 숙주 세포에 형질전환하였다. 형질전환된 재조합 *E. coli* JM109는 50 μ g/ml ampicillin이 함유된 LB고체 배지를 사용하였다. 인간 gastrin 3' UTR의 방향은 DNA sequencing⁷⁾을 통해 확인하였다.

인간 gastrin 3' UTR 유전자의 한시적 발현. 본 연구에서는 lipofectin 방법⁸⁾을 이용해 플라스미드 pMT/BiP-GFP-V5-His/SV40 p(A)를 S2 세포에 transfection 시켰다. S2 세포는 2시간 전에 3×10^6 cells/well로 6-well plate에 미리 접종시킨다. 플라스미드 DNA 3 μ g과 lipofectin 0.015 ml를 각각 0.1 ml의 M3 배지에 포함되도록 희석시킨 뒤, 실온에서 함께 혼합하여 transfection 용액을 만든다. Transfection 용액을 실온에서 15분 동안 배양 시킨 뒤 0.3 ml의 M3 배지를 첨가해 0.5 ml의 transfection 용액을 만든다. 2시간 전에 미리 6-well plate에 3×10^6 cells/well로 배양 시켜 둔 S2 세포에 transfection 용액을 첨가한 뒤 S2 세포를 27°C에서 24시간 동안 배양한다. Lipofectin을 제거하기 위해 6-well plate의 transfection 배지를 1 ml의 항생제가 포함되지 않은 10% IMS가 첨가된 M3 배지로 바꿔준다. GFP 발현 유도를 위하여 0.5 mM CuSO₄를 첨가한 뒤 36시간 동안 배양하였다.

Lipofectin 방법을 이용해 플라스미드 pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 p(A), pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-antigen, pMT/BiP-

Endo-V5-His/SV40 T-antigen/HG 3' UTR 및 pMT/BiP-Endo-V5-His/SV T-antigen/HG 3' UTR dimer는 플라스미드 pMT/BiP-GFP-V5-His/SV40 p(A)과 동일한 방법으로 S2 세포에 transfection시켰다. 단지 endostatin은 lipofectin을 제거하기 위해 6-well plate의 transfection 배지를 1 ml의 항생제가 포함되지 않은 10% IMS가 첨가된 M3 배지로 바꿔주고 0.5 mM CuSO₄를 첨가한 뒤 12, 24, 36, 48시간 동안 배양하여 발현을 유도하였다.

유전자 발현 분석. 6-well plate의 배양액을 630 \times g value에서 5분 동안 원심분리하여 세포와 분리한 뒤 상등액을 시료로 얻었으며, 재조합 단백질 확인에 상등액을 사용하였다. 단백질 시료는 Laemmli's 방법⁹⁾에 따라 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다. 겔에서 전기영동시킨 GFP 또는 endostatin 단백질을 nitrocellulose(Amersham, USA)로 전달시킨 뒤, mouse anti-V5 (Invitrogen, USA) polyclonal antibody(1:1000 v/v)와 rabbit anti-mouse IgG(Sigma, MO, USA) alkaline phosphatase conjugate (1:1000 v/v)를 사용하여 확인 하였다. BM purple AP substrate 용액(Boehringer Mannheim, Germany)이나 BCIP/NBT AP substrate 용액(Amresco, USA)을 첨가하여 반응 시킨 뒤 TBS buffer를 사용하여 반응을 중단시켰다.

Northern blot 분석. 전체 cytoplasmic RNA를 분리 한 뒤, RNA(25 μ g/lane)를 1% 아가로스 겔에서 전기영동시켜 크기별로 분리하고, Hybond-N nylon membrane(Amersham, USA)로 전달시켰다.⁹⁾ pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 p(A) 플라스미드를 *Bgl* II와 *Xho* I으로 절단하여 endostatin 유전자를 얻고 NEBlot Phototope Kit(New England BioLabs, USA)를 사용하여 biotin-dATP를 함유한 non-radiolabeled cDNA probe를 제조하고 hybridization에 이용하였다.

결과 및 고찰

서로 다른 terminator를 포함하는 벡터 클로닝. S2 세포의 외래 단백질 발현 시스템을 이용한 외래 단백질의 최적의 한시적 발현시간을 결정하기 위하여, 플라스미드 pMT/BiP-GFP-V5-His/SV40 p(A)(4.3 kb, Invitrogen, USA)를 사용하였다(Fig.

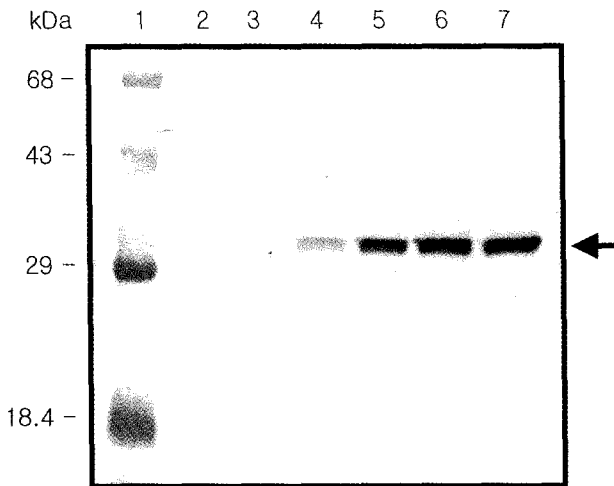


Fig 2. Western blot analysis of cells transfected with pMT/BiP-GFP-V5-His/SV40 p(A). 1) molecular size marker; 2) Non-transfected S2 cells; 3-7) 6, 12, 24, 36 and 48 hr incubation post-transfection with pMT/BiP-GFP-V5-His/SV40 p(A). Western-blot showing the presence of about 31-kDa GFP, was detected with a mouse anti-V5 polyclonal antibody and rabbit anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate(Invitrogen). The arrow indicates the position of GFP.

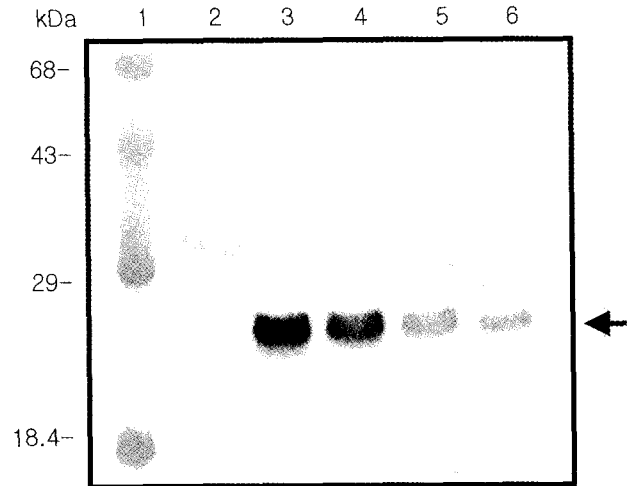


Fig 3. Western blot analysis of cells transfected with plasmids containing different terminators. 1) molecular size marker; 2) Non-transfected S2 cell; 3) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 p(A); 4) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-Ag; 5) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T- Ag/HG 3' UTR; 6) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-Ag/HG 3' UTR dimer. Western-blot showing the presence of about 24-kDa endostatin, was detected with a mouse anti-V5 polyclonal antibody and rabbit anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Invitrogen). The arrow indicates the position of endostatin.

1A). 이 실험으로 최적의 한시적 발현시간을 결정한 뒤 SV40 p(A)와 SV40 small T-antigen의 서로 다른 terminator를 이용하였을 때의 단백질 발현 및 mRNA 발현 정도를 비교 검토하기 위하여 pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 p(A), pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-antigen, pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-antigen/HG 3' UTR, pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-antigen/HG 3' UTR dimer를 클로닝 하였다(Fig. 1B, C, D, E).

GFP의 한시적 발현. S2 세포에서의 외래 단백질 발현 시스템을 이용한 단백질의 한시적 발현 시간의 최적화를 위하여, 플라스미드 pMT/BiP-GFP-V5-His/SV40 p(A)를 한시적 발현시켰다. Lipofectin 방법을 이용하여 수행한 GFP의 한시적 발현의 경우 transfection 시킨 후 transfection 배지를 제거한 뒤 36-48 시간 배양한 경우 가장 높은 GFP 발현을 보였다(Fig. 2). 이 실험 결과를 기초로 하여 앞으로의 모든 유전자의 한시적 발현 시간은 36시간으로 하였다.

서로 다른 terminator를 이용하였을 때 외래 단백질의 발현 정도 비교. 인간 gastrin 3' UTR과 polyadenylation signal 부위를 합성해 포유 동물 세포에서 발현시켜 이 부위들이 외래 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴 본 결과 HeLa 세포에서는 SV40 p(A)에 인간 gastrin 3' UTR이 첨가된 경우가 SV40 p(A)만 단독으로 사용한 경우보다 약 2-3배 가량 외래 단백질 발현이 증가한다는 연구 결과가 있다.⁶⁾ 이 연구를 바탕으로 각각 SV40 p(A), SV40 small T-antigen, 인간 gastrin 3' UTR을 terminator로 지니는 발현 벡터를 S2 세포에서 한시적 발현 시킨 뒤 36시간 동안 배양하여 endostatin의 발현 정도를 Western blot 분석으로 비교해 보았다. 그 결과 SV40 small T-antigen, 인간 gastrin 3' UTR을 terminator로 사용할 때보다 SV40 p(A)를 terminator로 사용했을 때 endostatin의 발현이 가장 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3). 포유 동물 세포 시스템과는 달리

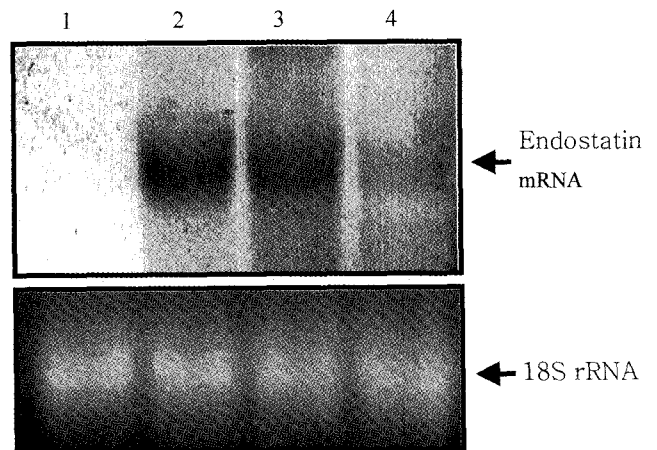


Fig 4. Northern blot analysis of cells transfected with plasmid containing different terminators. Total RNA(25 µg/lane) was prepared from the non-transfected or transfected S2 cells. 1) Non-transfected S2 cell; 2) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 p(A); 3) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-Ag; 4) pMT/BiP-Endo-V5-His/SV40 T-Ag/HG 3' UTR.

S2 세포에서는 인간 gastrin 3' UTR을 terminator로 사용한 경우가 그렇지 않은 경우보다 외래 단백질 발현이 감소하였다. 이 실험 결과로 인간 gastrin 3' UTR의 transcription terminator가 동물 세포 시스템에서는 termination에 영향을 미치지만 S2 세포에는 거의 영향을 주지 못하며, S2 세포에서는 포유 동물 세포와는 달리 SV40 p(A)가 가장 효과적인 terminator로 작용함을 확인할 수 있다.

서로 다른 terminator를 이용하였을 때 mRNA 발현 정도 비교. 각각 SV40 p(A), SV40 small T-antigen, 인간 gastrin 3' UTR을 terminator로 지니는 expression vector를 한시적 발현

시킨 뒤 36시간 동안 배양하여 endostatin의 mRNA의 발현정도를 Northern blot 분석으로 확인해 본 결과, 역시 SV40 p(A)를 terminator로 이용한 경우 mRNA 발현량이 가장 높았다(Fig. 4, Lane 2).

SV40 p(A)를 terminator로 S2 세포에 사용했을 때 외래 단백질 발현 증가를 보이는 것은 SV40 p(A)가 SV40 small T-antigen과 인간 gastrin 3' UTR보다 S2 세포 시스템에 잘 맞고, 이와 같은 장점 때문에 S2 세포내에서 다른 terminator들보다 전사 효율을 증가시키기 때문이라고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 두뇌한국 21 사업의 지원으로 수행되었음을 감사드립니다.

참고문헌

- Courey, A. J. and Tjian, R. (1988) Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**, 887-898.
- Johansen, H., van der Straten, A., Swet, R., Oto, E., Maroni, G. and Rosenberg, M. (1989) Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibiting oncogene product in *Drosophila* Schneider cells. *Genes Dev.* **3**, 882-229.
- Park, S. D. (1998) In *Molecular cell biology* (1st ed.) Chap. 13, pp. 388-389. Academic Inc., Korea.
- Moreira, A., Wollerton, M., Monks, J. and Proudfoot, N. J. (1995) Upstream sequence elements enhance poly(A) site efficiency of the C2 complement gene and are phylogenetically conserved. *EMBO J.* **14**, 3809-3819.
- Jenny, A., Hauri, H. P. and Keller, W. (1994) Characterization of cleavage and polyadenylation specificity factor and cloning of its 100-kilodalton subunit. *Mol. Cell Biol.* **14**, 8183-8190.
- Kim, D. J. (2001) The effects of the transcription terminator of the human gastrin gene on the gene expression in mammalian cells. Master. Thesis, Kyung Hee University, Suwon, Korea.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463.
- Park, J. H., Kim, H. Y., Han, K. H. and Chung, I. S. (1999) Optimization of transfection conditions for expression of green fluorescent protein in *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Enz. Microb. Technol.* **25**, 558-563.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (1989) In *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Effect of Transcriptional Terminator Sequences on Recombinant Protein Expression from *Drosophila melanogaster* S2 Cell

In-Sook Hwang, Jong-Hwa Park, Youn-Hyung Lee, Jae-Seung Yoon, Kwang-Hee Baek and In Sik Chung* (Graduate school of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea)

Abstract: Utilizing the foreign gene expression system of the *Drosophila melanogaster* Schneider line 2(S2) cell, the degree of transient protein and mRNA expression was examined with different terminators. In the case of transient expression, the expression level of green fluorescent protein(GFP) was the highest when the transfection agent was eliminated and then cultivated for 36 to 48 hr. The terminators(SV40 p(A), SV40 small T-antigen and human gastrin 3' UTR) of the expression vector system were each cloned with endostatin; thereafter, the expression levels of the endostatin and its mRNA were compared. When the expression levels of endostatin were compared 36 hr after transfection, the SV40 p(A) terminator showed the highest expression level of endostatin and its mRNA.

Key words: *Drosophila melanogaster* Schneider line 2(S2) cell, SV40 p(A), SV40 small T-antigen, human gastrin 3' UTR

*Corresponding author