

## 메밀의 재조합항원 제조

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 알레르기연구소

이기영 · 정병주 · 류정우 · 염혜영 · 김규언

### 〈한글 요약〉

**목적:** 메밀은 우리나라뿐 아니라 일본에서도 식품알레르기의 가장 흔한 원인 식품이며 임상증상이 위중한 경우가 많은데 이에 대한 기초 연구는 미진하다. 따라서 저자 등은 메밀을 식품알레르기의 모델로 삼아 연구하고자 본 연구를 실시하였다.

**방법:** 숙성되는 과정에 있는 메밀에서 mRNA를 추출하여 in vitro에서 translation을 실시하였으며 이 산물을 SDS-PAGE를 실시하여 메밀단백으로 translation 되는 것을 확인하였다.

**결과:** Spectrophotometer로 측정한 흡광도는 total RNA는  $A_{260}/A_{260}$ 가 1.9, mRNA는 2.0으로 total RNA와 mRNA는 모두 양호하게 분리되었다. 메밀 mRNA로 in vitro에서 translation을 실시한 산물을 메밀이나 대조군과 비교하여 보면 in vitro translation 산물은 1, 3, 및 14 kD 등 비교적 저분자량은 발현되었으나 그외의 메밀단백은 관찰할 수 없었다.

**결론:** In vitro에서 mRNA를 translation시켜 1, 3, 14 kD 메밀재조합항원을 제조하였다. 본 연구에서 숙성되는 과정에 있는 메밀에만 mRNA 존재하며 그 시기에 따라 mRNA의 조성이 다름을 알 수 있었고 향후 메밀알레르겐의 기초연구에 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

### 서 론

알레르기 질환은 만성적으로 재발되기 때문에 장기간 치료를 요한다. 알레르기 질환의 치료로 이질환과 관계되는 세포나 이들이 분비하는 cytokine을 억제하는 방법은 인체에 부작용을 간과할 수 없고<sup>1-4)</sup>, 표적장기의 약물치료는 완치법이라기 보다는 증상완화요법이다. 면역요법은 알레르기 질환을 치료하는데 이용되고 있지만 아직 문제점

이 있다. 즉 한종류의 알레르겐에도 다수의 단백질이 포함되어 있는데 사람에게 따라서는 알레르기를 유발하는 단백질 다를 수 있지만 실제로 각 단백을 분리 및 정제를 하는 것은 매우 힘든 것이 현실임으로 여러 단백질의 혼합물인 조항원으로 면역치료를 실시하는 것이 현재의 추세이다. 따라서 면역요법시 부작용이 문제가 된다. 최근 분자생물학의 눈부신 발달에 따라 알레르겐 중 면역글로불린과 T세포와 결합하는 구조를 밝히고 이것을 응용하여 알레르겐과의 반응을 억제하려는 연구가 시도되고 있다<sup>5,6)</sup>. 상기 연구를 실시하기 위해서는 알레르겐의 단백질 구조를 밝히고 고도로 정제된 알레르겐이 다량 필요한데 유전자 기법을

본 연구는 연세의대 연구비로 이루어졌음.

책임저자: 이기영 서울시 서대문구 신촌동

연세의대 소아과

Tel: 02)361-5510 Fax: 02)393-9118

이용한 재조합항원의 제조는 상기 연구들을 실시하는데 매우 유용한 방법이 된다. 메밀은 우리나라뿐 아니라 일본에서도 식품알레르기의 가장 흔한 원인 식품이며 임상증상이 위중한 경우가 많은데 이에 대한 기초<sup>7,8)</sup> 및 임상연구<sup>9-15)</sup>는 매우 미진하다. 메밀의 재조합항원을 제조하기 위해서는 mRNA를 확보하는 것이 가장 중요한 관건인데 곡물류는 양질의 mRNA를 추출하기가 쉽지 않다. 이에 저자들은 성숙되는 과정에 있는 메밀에서 mRNA를 추출하여 *in vitro*에서 translation을 실시하여 메밀단백의 발현 여부를 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1. Total RNA isolation

숙성되는 과정에 있는 메밀을 수집하여 액화질소에 보관한 후 약 10 gm을 잘게 분쇄하였다. 4 M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl 100 ml에 beta-mercaptoethanol 0.72 ml를 첨가한 용액에 분쇄한 메밀을 잘 섞어서 넣은 후 얼음위에 2M sodium acetate buffer(2M sodium acetate, adjust pH 4.0 with 2N acetic acid) 1 mL, water-saturated phenol 10 mL, chloroform:isoamyl alcohol(98 ml chloroform, 2 ml isoamyl alcohol) 2 ml를 순차적으로 넣은 뒤 20초간 진탕하였다. 4℃에서 20분간 12,000 g로 원심분리한 후 상층액을 추출하여 isopropanol 10 ml를 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 침전시켰다. 원심분리한 뒤 침전물을 4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl 100 ml에 beta-mercaptoethanol 0.72 ml를 첨가한 용액 3 ml와 isopropanol 3 ml를 혼합한 용액으로 부유시킨 뒤 -20℃에서 1일간 재차 침전시켰다. 원심분리한 침전물을 75% alcohol 4 ml로 세척하였다. 침전물을 진공상태에서 15분간 건조시킨 뒤 0.5% SDS 용액 200  $\mu$ l로 녹였다. Spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며  $A_{260}/A_{280}$ 은 1.9였다.

### 2. mRNA isolation

PolyAtract system III,IV(Promega, WI)를 이용하여 mRNA를 추출하였다. 실험 1에서 분리한 total RNA 0.5 mg에 RNase를 제거한 증류수를 첨가하여 500  $\mu$ l가 되게한 후 65℃로 10분간 가열하였다. Biotinylated-Oligo(dT) Probe 3  $\mu$ l와 20x SSC(NaCl 87.7 gm, sodium citrate 44.1 gm, 최종 용적 500 ml)를 RNA에 넣은 후 상온에서 10분 방치하여 probe를 annealing시켰다. Streptavidin MagneSphere Particle(SA-PMPs)를 0.5×SSC로 3회 세척한 후 annealing된 probe를 첨가한 뒤 magnetic stand로 SA-PMPs를 고정하여 상층액을 제거하였다. SA-PMP pellet에 RNase를 제거한 증류수를 0.1 ml 첨가하여 mRNA를 추출하였다. Spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며  $A_{260}/A_{280}$ 은 2.0이었다. 추출된 mRNA는 3M potassium acetate와 isopropanol 혼합액에 넣어 침전시켰으며 -70℃에서 사용전까지 보관하였다.

### 3. In vitro translation

*In vitro* translation은 wheat germ extract (Promega, WI) kit를 이용하였다. 우선 실험 2에서 추출한 mRNA를 67℃로 10분간 가열한 후 즉시 얼음으로 냉각시켰다. Wheat germ extract 25  $\mu$ l, 1 mM amino acid mixture 4  $\mu$ l, RNA substrate 2  $\mu$ l, 1M potassium acetate 5  $\mu$ l, 및 Ribonuclease inhibitor 1  $\mu$ l를 순차적으로 첨가한 뒤 냉각된 mRNA 넣은 후 nuclease free water로 최종량이 50  $\mu$ l 되게 하였다. 상기 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 translation을 실시하였다.

### 4. SDS-PAGE

Stacking gel의 농도는 3%, separating gel은 15%로 제조하여 *in vitro*에서 translation을 한 산물을 reducing sample buffer를 첨가하여 100℃에서 5분간 끓인 후 전기영동을 실시하였다.

## 결 과

### 1. mRNA 추출

Spectrophotometer로 측정한 흡광도는 total RNA는  $A_{260}/A_{280}$ 가 1.9, mRNA는 2.0으로 total RNA와 mRNA는 모두 양호하게 분리되었다.

### 2. In vitro translation, SDS-PAGE

메밀 mRNA로 in vitro에서 translation을 실시한 산물과 메밀로 SDS-PAGE를 실시하여 본 바 메밀은 분자량이 1, 3, 7, 14, 20, 22, 24, 25, 28, 35, 37, 42, 63, 72, 76, 79, 및 85 kD 등 17개의 단백질로 분리되었으며, in vitro translation 산물은 1, 3, 6, 7, 10, 12, 13.5, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 28, 30, 35, 37, 40, 44, 50, 55, 63, 74, 및 83 kD 등 27개의 단백질로 분리되었다. 대조군으

로는 메밀 mRNA만을 첨가하지 않고 translation을 실시하였던 경우에는 24개의 단백질이 분리되었다. 메밀 mRNA로 in vitro에서 translation을 실시한 산물을 메밀이나 대조군과 비교하여 보면 1, 3, 14 kD 메밀단백은 발현되었으나 고분자량의 메밀단백은 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

## 고 찰

메밀은 그 알레르기성이 매우 강해서 우리나라 뿐 아니라 일본에서도 식품 알레르기 질환에서 가장 흔한 원인 식품 중 하나이며, 임상증상도 전신적인 속이 유발될 정도로 위중한 경우가 많다<sup>2,3</sup>. 메밀 알레르기에 관한 구미에서의 임상연구로는 1931년 Rowe 등<sup>4</sup>)는 500명의 내원환자 중 알레르기피부시험에서 양성률은 5.4%였으며 1961년 Horesh 등<sup>5</sup>)는 514명의 환자들 중 36명이 메밀알레르기로 그 빈도는 약 1%로 서구에서도 드물지 않을 것으로 추정된다. 그 후에는 주로 일본에서 연구되었는데 Nakamura 등<sup>3</sup>)은 흡입유발시험을 실시하였는데 대부분의 환자에서(82%) 천식이 유발되었고 비염, 결막염의 순이었으나 11%의 환자에서는 전신적인 속이 유발되었다. 우리나라에서도 경구유발시험 결과 약 60%의 환자들에서 기관지천식이나 아나필락시 속 등 위중한 임상증상이 유발되었다<sup>6,7</sup>). 이 질환은 메밀의 사용이 증가할수록 그 빈도가 높아지리라 추정된다.

알레르기 질환의 치료는 원인이 되는 알레르겐을 회피하고, 약물을 투여하며 원인이 되는 알레르겐을 소량에서부터 점차로 증량하여 투여하는 면역요법 등이 있다.

원인이되는 항원의 회피는 알레르기 질환의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있으나 소량을 섭취 혹은 흡입하여도 증상이 유발될 수 있는 메밀 알레르기에 있어서는 장기간 완벽한 회피를 실시하는 것은 어렵다.

항염증제, 기관지확장제와 같은 약물요법은 이미 발병된 증상의 완화요법으로 근본적인 완치법은 아니며, 최근 IL-12를 투여하여 T세포에서 분

Fig. 1. Coomassie stain of 15% SDS-PAGE. Lane 1; Molecular weight marker, lane 2; buckwheat seed, lane 3; in vitro translation of buckwheat mRNA, lane 4; negative control.

비되는 IL-4를 억제하여 알레르기 염증을 치료하는 연구가 진행되고 있으나 IL-12는 인체에 심한 부작용이 있을 수 있고<sup>12)</sup>, IL-4는 T세포 외에도 비만세포나 호염기구에서도 분비되며, IL-12 이외에도 IL-10, IL-13 등에 의해서도 영향을 받기 때문에 알레르기 질환의 치료에는 제한이 따른다<sup>10, 11)</sup>.

면역요법은 알레르기 질환에 유효한 치료법으로 널리 이용되고 있다. 알레르겐의 감작은 생후 2세 이전부터 시작되며<sup>13)</sup> 조기에 면역치료를 실시하면 나이가 들어도 다른 항원에 감작되는 것을 예방할 수도 있는 장점이 있다<sup>14)</sup>. 한 종류의 알레르겐에도 다수의 단백질이 포함되어 있는데 사람에게 따라서는 알레르기를 유발하는 단백질이 각기 다를 수 있다. 그런데 각 단백을 물리화학적 방법으로 분리 및 정제를 하는 것은 매우 힘들다. 그러므로 여러 단백질의 혼합물인 조항원으로 면역치료를 실시하는 것이 현재의 추세이다. 따라서 면역요법시에는 부작용이 문제가 되며 이 문제를 극복하기 위해서 알레르겐 중 각 단백질을 유전공학 기법으로 대량 생산하여 감작된 단백질만으로 면역요법을 실시하려는(tailored immunotherapy) 연구가 진행되고 있다<sup>8)</sup>.

최근 분자생물학의 눈부신 발달에 따라 알레르겐 중 면역글로부린과 T세포와 결합하는 구조를 밝히고 이것을 응용하여 알레르겐과의 반응을 억제하려는 연구가 시도되고 있다<sup>15, 16)</sup>. 이와 같은 연구를 실시하기 위해서는 알레르겐의 단백질 구조를 밝히고 고도로 정제된 알레르겐이 다량 필요하다. 유전자 공법을 이용한 재조합 항원의 제조는 상기 연구를 실시하는데 매우 유용한 방법이 된다. 즉 재조합항원기법으로는 실험실 내에서 일정 강도의 알레르기성을 가진 단백을 손쉽게 대량 생산할 수 있고, 알레르겐의 DNA 및 단백질의 구조를 밝힐 수 있다. 따라서 tailored immunotherapy를 실시하는데 이용할 수 있으며 유전자조각으로 T와 B세포가 알레르겐과 결합하는 부위(항원결정기)를 밝히고 site-directed mutagenesis 등의 기법으로 항원결정기 중 특정 아미노산의 면역

학적 특성도 규명할 수 있다<sup>8, 15, 16)</sup>. 또한 anti-sense method로 알레르기성을 제거한 식품을 제조하는데 기초 연구자료가 된다.

재조합항원은 다양한 방법으로 제조할 수 있는데 전형적인 방법은 아래와 같다<sup>18)</sup>. 우선 근원 알레르겐에서 mRNA를 추출하여 reverse transcription을 실시하여 cDNA library를 만든 후 이것을 “molecular taxi”인 bacteriophage, plasmid, phagemid, 혹은 baculovirus에 넣은 뒤 expression vector인 *E coli*, yeast 혹은 곤충세포로 형질전환을 시킨다. 그런데 근원 알레르겐 내에는 연구자가 원하는 단백질을 translation하는 mRNA이외에도 다수의 상이한 mRNA가 있으므로 expression vector를 자극한 뒤 환자의 혈청, 단클론항체 혹은 oligonucleotide probe로 expression vector를 선별한다. 알레르겐의 1차 아미노산 서열이 밝혀진 경우에는 C-terminal과 N-terminal 아미노산 서열에 상응하는 primer를 제조하여 PCR를 실시할 수 있는데 expression vector를 선별할 필요가 없다는 장점은 있으나 생화학적 방법으로 1차 아미노산 서열의 명확한 규명은 쉽지 않기 때문에 특수한 경우에만 이 방법이 이용된다. 알레르겐의 N-terminal 아미노산 서열만 밝혀졌을 경우에는 mRNA가 poly(A) tail이 있다는 사실에 착안하여 oligo(dT) primer를 poly(A) tail에 상응하게 제조하여 PCR를 실시한 후 N-terminal 아미노산 서열에 상응한 primer와 oligo(dT) primer로 재차 PCR를 실시하면 재조합항원을 제조할 수 있지만 성공할 확률은 높지 않다. 그 외에도 mRNA를 추출한 뒤 in vitro에서 translation을 실시하는 방법이 있다. Wheat germ, reticulocyte 및 yeast 등에는 translation을 실시할 수 있는 tRNA, ribosomes, initiation, elongation 및 terminal factor들이 있는데 이들을 특수 처리하여 추출된 mRNA와 아미노산을 첨가하여 실험실에서 translation시키는 방법인데, 진균류와 같이 mycelia나 spore와 같이 성장시기에 따라 항원성이 다른 알레르겐의 재조합항원을 제조하는데 매우 유용한 기법이 된다<sup>19)</sup>.

Thomas 등<sup>20)</sup>과 Chua 등<sup>21)</sup>이 1988년 집먼지진드기 재조합항원을 최초로 제조한 이후 우수기관에서 활발히 연구가 진행되어 거의 대부분의 주요 알레르겐은 이미 재조합항원이 제조되었다. 현재까지 메밀 재조합항원 제조에 대한 보고는 없다. 저자들은 이미 숙성된 메밀에서 mRNA를 추출하려고 하였으나 실패하였는데, 이미 숙성된 메밀 내에는 mRNA가 이미 단백질로 translation되어 그 양이 극히 적기 때문에 사료된다. 따라서 단백질을 활발히 형성하는 숙성 과정에 있는 메밀에서는 mRNA가 다량 존재할 것으로 생각되나 또 하나의 문제점은 메밀이 숙성되는 시기에 따라서 mRNA의 조성이 각기 다를 수 있어서 연구자가 원하는 단백질에 상응하는 mRNA가 있는지를 확인하여야 한다. In vitro translation법은 재조합항원을 제조하는 전형적인 방법은 아니나 메밀과 같이 재조합항원 제조에 가장 필수적인 mRNA를 확보하기 힘든 곡물이나 진균을 연구하는데 유용한 방법으로 사료된다.

## 요 약

In vitro에서 mRNA를 translation시켜 메밀의 재조합항원을 제조한 본 연구는 숙성되는 과정에 있는 메밀에만 mRNA가 존재하며 그 시기에 따라 mRNA의 조성이 다를 수 있었고 향후 메밀알레르겐의 기초연구에 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Mohapatra SS, Mohapatra S. Application of molecular biology for diagnosis and treatment of allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 1996;16:591-611.
- 2) Mohapatra SS. IL-12 possibilities. *Science* 1995;269:1499.
- 3) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
- 4) Naito S, Horino A, Nakayama M, Nakano Y, Nagai T, Mizugush J, et al. Ovalbumin-liposome conjugate induces IgG but not IgE antibody production. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109: 223-8.
- 5) Bosquet J, Valenta R. in Vivo and Vitro use of recombinant allergens. *Allergy Clin Immunol News* 1994;6:54-9.
- 6) Allergen-specific therapy in type 1 allergy. New concepts based on recombinant allergens. *Allergy Clin Immunol News* 1994;6: 60-4.
- 7) Yono M, Nakamura R, Hayakawa S, Torii S. Purification and properties of allergenic protein of buckwheat seed. *Argric Biol Chem* 1989;53:2387-92.
- 8) Urisu A, Kondo Y, Morita Y. Identification of major allergen of buckwheat seeds by immunoblotting methods. *Allergy Clin Immunol News* 1994;6:151-5.
- 9) 강석영, 민경업. 메밀 알레르기 3례. *대한의학 협회지* 1984;27:765-8.
- 10) 권용백, 이기영. 경구 유발시험으로 확진된 소아 메밀 알레르기 2례. *소아과* 1985;28:82-6.
- 11) 이기영, 김규언, 정병주. 경구 유발시험으로 확진된 속발형 식품알레르기: 병력 및 알레르기 피부시험의 진단적 의의. *소아알레르기 및 호흡기* 1997;7:173-86.
- 12) 박경화, 박소미, 이현희, 김현영, 정병주, 김규언, 이기영. 소아메밀알레르기의 진단 및 임상적 특성에 관한 연구. *소아알레르기 및 호흡기* 1998;8:33-6.
- 13) Nakamura S, Yamaguchi M, Oishi M. Study on the buckwheat allergy. Report 2:clinical investigation on 169 cases with the buckwheat allergy gathered from whole country of Japan. *Allergie Immunol* 1974/1975;20/21:457-65.
- 14) Rowe AH. Individual food and drug allergies and their control. In: Rowe AH, editor. *Clinical allergy: manifestations, diagnosis and treatment*. Philadelphia: Lea & Febiger

- Co., 1937:563-4.
- 15) Horesh AJ. Buckwheat sensitivity in children. *Ann Allergy* 1972;30:685-9.
- 16) Bosequet J, Michel FB. Specific immunotherapy in asthma: Is it effective? *J Allergy Clin Immunol* 1994;1-11.
- 17) Barres MP, Einarsson R, Bjorksten B. Serum levels of interleukin-4, soluble CD3 and IFN $\gamma$  in relation to the development of allergic disease during first 18 months of life. *Clin Exp Allergy* 1995;25:543-8.
- 18) Thomas WR. Molecular cloning of allergens. In : Kay AB editor. *Allergy and allergic diseases*. 1st ed. London: Blackwell Science Lts., 1997: 811-24.
- 19) Stewart GA, Thomas WR. In vitro translation of messenger RNA from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;83:384-9.
- 20) Chua KY, Stewart GA, Thomas WR. Sequence analysis of cDNA coding for major house dust allergen, Der p 1: homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988; 167:175-82.
- 21) Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;85:127-9.

= Abstract =

## Production of Recombinant Buckwheat Allergen

Ki Young Lee, M.D., Byeung Ju Jeoung, M.D., Jeong Woo Ryu, M.D.  
Hae Yung Yum, M.D and Kyu Earn Kim, M.D.

*Department of Pediatrics, Institute of Allergy,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Purpose** : Buckwheat is one of the most common food allergen in Korea and frequently elicit severe allergic reactions. However, up to now, only few reports on buckwheat allergens have been reported. The purpose of this study was to isolate mRNA for the production of recombinant buckwheat allergens.

**Methods** : After the isolation of mRNA from ripening buckwheat seeds, in vitro translation was performed. The protein patterns of in vitro translate products were identified using SDS-PAGE.

**Results** :  $A_{260}/A_{280}$  ratio of total RNA was 1.9, and mRNA was 2.0.

In vitro translate products showed lowered molecular buckwheat proteins such as 1, 3, and 14kD, while other high molecular weight protein of buckwheat seed were not shown in SDS-PAGE.

**Conclusion** : mRNA of buckwheat was purified only from ripening seeds. The composition of mRNA was different according to the ripening periods. It is believed that this finding can give a clue to the basic research of buckwheat allergen.

**Key Words** : Buckwheat, in vitro translation, Recombinant allergen