

누에 체액을 이용한 외래 유전자의 발현효율 증대

우수동 · 김혜성 · 김우진 · 진병래 · 강석권
서울대학교 농업생명과학대학

Enhanced Expression of Foreign Gene in Baculovirus-Infected Insect Cells Using a Silkworm Hemolymph

Soo-Dong Woo, Hye-Seong Kim, Woo-Jin Kim, Byung-Rae Jin and Seok-Kwon Kang
College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

To enhance expression of foreign gene by the novel expression vector, pBmKSK1, of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, *E. coli* β -galactosidase gene expressing recombinant virus was infected in BmN-4 cells and various concentrations of silkworm hemolymph were added to the recombinant virus-infected BmN-4 cells containing fetal bovine serum. The expression efficiency of foreign gene was determined by β -galactosidase activity in the culture media. The results showed that the silkworm hemolymph was effective to expression of foreign gene in the BmN-4 cells, suggesting that the silkworm hemolymph could be substituted for fetal bovine serum in the BmN-4 cells to enhance expression of foreign gene.

Key words : Baculovirus, expression vector, silkworm hemolymph

서 론

곤충 바이러스인 핵다각체병 바이러스(nuclear polyhedrosis virus : 이하 NPV로 약함)를 이용한 baculovirus 발현벡터계는 산업적으로 유용한 물질을 안정적으로 대량생산 할 수 있으며, 동물, 박테리아, 식물 등을 이용한 여러가지 발현벡터계의 단점을 극복할 수 있는 것으로 인정되어 현재 그에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 진핵세포계인 곤충세포주와 강력한 발현효율을 가진 다각체 단백질 유전자 등의 프로모터를 이용한 baculovirus 발현계는 발현수준 뿐만 아니라 발현된 물질의 활성 및 기능이 다른 발현계에 비해 우수한 것으로 보고되고 있다(O'Reilly 등 1992, King과 Possee 1992). 이러한 baculovirus 발현계로는 현재 크게 나누어 *Autographa californica* NPV(이하 AcNPV로 약함)와 *Bombyx mori* NPV(이하 BmNPV로 약함)를 이용한 두가지 발현벡터계가 개발되어 여러가지 동 식물 및 바이러스 등의 유전자를

발현시키고 있다(Smith 등 1983, Maeda 등 1985, O'Reilly 등 1992). 그러나 baculovirus 발현벡터계는 발현 수준에 있어서 곤충 숙주세포에서 바이러스 감염시 발현되는 원래의 다각체 단백질의 수준에는 훨씬 못 미치고 있으며, 발현하고자 하는 외래 유전자에 따라 발현의 수준이 다르게 나타나고 있어 발현효율 증대를 위해 많은 연구가 진행되고 있다(O'Reilly 등 1992, Maeda 1994).

BmNPV를 이용한 발현벡터계는 대량 인공사육체가 확립된 누에 유충을 이용함으로써 발현효율을 극대화 할 수 있는 장점을 지니고 있음에도(Maeda 등 1985, Ulrich 등 1992) 아직 연구가 미비한 상태이며, 국내에서는 거의 연구가 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 전보에서 국내 분리 BmNPV의 다각체 단백질 유전자 프로모터를 이용하여 새롭게 제작하고, 외래 유전자로서 *Escherichia coli* β -galactosidase 유전자를 삽입하여 기능적임을 확인한 전이 벡터 pBmKSK1(우 등 1995a)에 의해 제작된 재조합

바이러스의 감염세포주에서 발현 증대를 위해 누에 체액의 첨가에 따른 발현효율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시 재료

본 실험의 재조합 바이러스는 외래 유전자로서 *E. coli* β -galactosidase 유전자를 포함하고 있는 BmK1-lacZ(우 등 1995a)를 이용하였다. 곤충세포주로는 누에의 난소에서 유래된 것으로 일본잡사 곤충농업기술연구소의 Kobayashi 박사로부터 분양받은 BmN-4 세포주를 Summers와 Smith(1987)의 방법에 따라 10% fetal bovine serum(이하 FBS라 약함, Gibco)이 함유된 TC-100(Sigma) 곤충세포 배양액으로 27°C에서 배양하였다.

2. 배양 세포주에 대한 재조합 바이러스 접종

배양 세포주에 대한 재조합 바이러스 BmK1-lacZ 접종은 세포배양용 플라스크(25 cm²)당 3.0×10⁶ 농도로 monolayer가 형성된 세포에 1×10⁶ PFU 농도로 바이러스 NOV(non-occluded virus)를 접종하였다. 접종 1시간 후 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위하여 새 배양액으로 2~3회 세척하고, 배양액 5 ml을 보충하여 27°C 항온기에서 배양하였다.

3. 누에 체액의 첨가에 따른 발현효율 분석

누에 체액의 분리 및 처리는 우 등(1995b)의 방법에 따라 누에 5령 3일째의 유충 복지를 잘라 얼음 위에서 냉각된 튜브에 체액을 채취하고 65°C에서 30분동안 처리한 후, 4°C에서 5,000 rpm으로 10분간 원심하여 상청액을 0.2 μ m millipore filter로 여과하였다. 이렇게 준비된 체액 0%, 2%, 5% 또는 10%와 FBS 역시 0%, 2%, 5% 또는 10%로 하여 각각을 조합하고 재조합 바이러스가 접종된 BmN-4 세포주에 첨가한 후, 시간별로 각각의 배양액을 수거한 뒤 β -galactosidase 활성을 조사하였다.

4. β -galactosidase 활성 측정

β -galactosidase의 활성은 시간별로 수거된 각 시료를 β -galactosidase Enzyme Assay Kit(Promega Co.)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 처리하고 420 nm 흡광도에서 O.D.값을 측정하여 활성을 결정하였다.

결과 및 고찰

누에 세포주에서 재조합 바이러스의 외래 유전자 발현효율을 증대 시키기 위하여, 누에 5령 3일째의 체액을 채취하여 BmN-4 세포 배양액에 FBS와 조성을 달리하여 첨가한 후, 외래 유전자로서 lacZ 유전자를 포함하고 있는 재조합 바이러스를 접종하여 시간별로 그 발현량을 분석함으로써 누에 체액이 재조합 바이러스의 외래 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 정상적인 세포배양 조건인 FBS가 10%일 때, 누에 체액이 2% 또는 5% 첨가되었을 경우에 누에 체액이 첨가되지 않았을 때 보다 약 2배 이상의 높은 발현량을 보였다(Fig. 1). 배양세포에 FBS가 5% 농도일 때에는 누에 체액이 2% 첨가되었을 때 최대 발현량을 나타내었다(Fig. 2). 또한 FBS가 2%인 배양조건에서는 누에 체액의 첨가공히 첨가하지 않았을 때 보다 약 2배 이상의 높은 발현량을 보였으며, 첨가량을 고려할 때 적은량인 2%가 가장 효과적이었다(Fig. 3). 따라서 누에 체액에 의한 FBS의 대체 효과를 알아보기 위하여, FBS를 첨가하지 않고 누에 체액만을 2%, 5% 및 10%를 첨가하여 발현량을 분석하였다(Fig. 4). 그 결과, FBS를

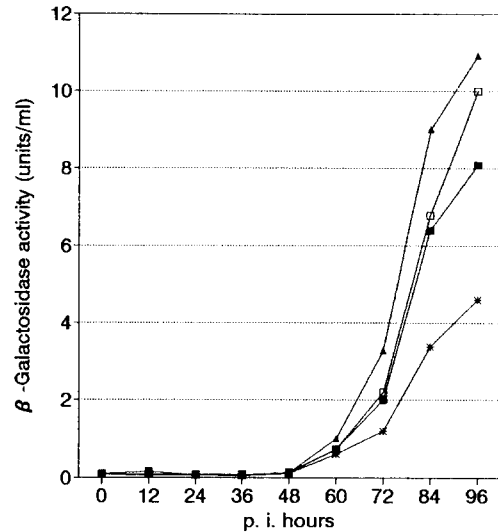


Fig. 1. The β -galactosidase production of recombinant virus in BmN-4 cells containing fetal bovine serum 10% and various concentration of silkworm hemolymph. The silkworm hemolymph was added 0% (*), 2% (■), 5% (▲) and 10% (□) to the recombinant virus-infected BmN-4 cells containing fetal bovine serum 10%, respectively. The β -galactosidase production of recombinant virus was determined by β -galactosidase activity in culture media.

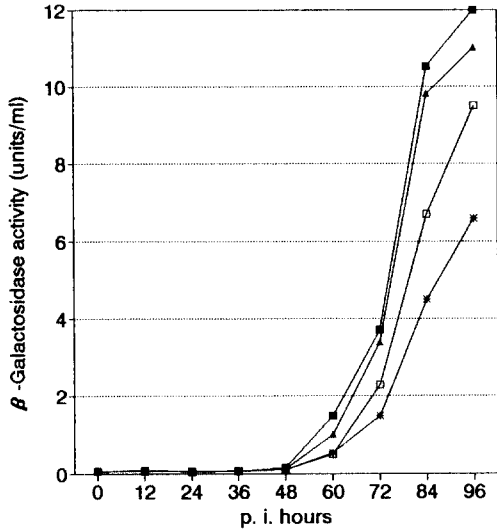


Fig. 2. The β -galactosidase production of recombinant virus in BmN-4 cells containing fetal bovine serum 5% and various concentration of silkworm hemolymph. The silkworm hemolymph was added 0% (*), 2% (■), 5% (▲) and 10% (□) to the recombinant virus-infected BmN-4 cells containing fetal bovine serum 5%, respectively. The β -galactosidase production of recombinant virus was determined by β -galactosidase activity in culture media.

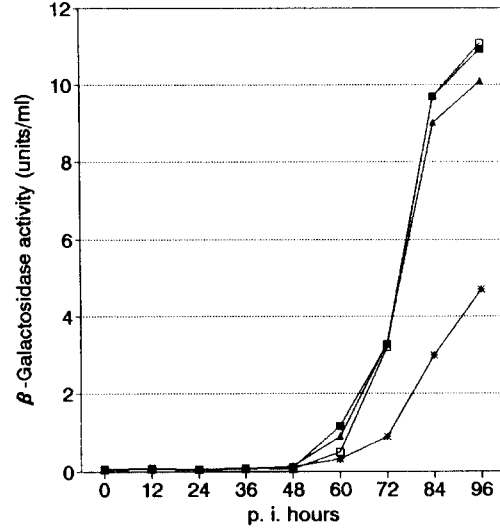


Fig. 3. The β -galactosidase production of recombinant virus in BmN-4 cells containing fetal bovine serum 2% and various concentration of silkworm hemolymph. The silkworm hemolymph was added 0% (*), 2% (■), 5% (▲) and 10% (□) to the recombinant virus-infected BmN-4 cells containing fetal bovine serum 2%, respectively. The β -galactosidase production of recombinant virus was determined by β -galactosidase activity in culture media.

전혀 첨가하지 않고 누에 체액만을 첨가하여도 그 발현량은 2%, 5% 및 10%의 FBS 만을 첨가하였을 때 보다 훨씬 높게 나타났다. 또한 Fig. 1, 2 및 3에서 나타난 것처럼 FBS 여러 농도구에 여러 농도의 체액을 첨가하였을 때 보여지는 높은 발현량과 유사하였으며, 누에 체액 첨가량과 발현량을 고려할 때 단지 누에 체액 2% 첨가의 경우가 가장 효과적으로 나타났다.

이러한 결과는 FBS의 농도에 관계 없이 누에체액의 첨가가 재조합 바이러스의 발현효율을 높여주는 결과로서, FBS가 10% 일때 보다 적은량인 5%나 2%에서 오히려 비교적 소량의 누에 체액 첨가만으로도 높은 발현량을 보임으로서 효과적 이었다. 그리고 누에 체액이 첨가되지 않고 FBS만 농도별로 첨가된 대조구의 경우에 있어서 5% 농도구에서 발현량이 오히려 10% 보다 더 높게 나타났는데, 이는 바이러스 접종시 FBS를 제거함으로써 바이러스 감염율을 높이는 점을 참고할 때(Summers와 Smith 1978), 10%의 경우는 FBS 농도에 따른 바이러스 감염에, 2%의 경우에는 세포의 성장에 영향을 미친 것으로 사료된다.

따라서 재조합 바이러스 감염에 의한 외래 유전자의 발현시, 누에 체액이 첨가되지 않았을 경우에는 FBS가 5%일 때 가장 효과적인 것으로 보여진다. 그러한 점에서 5%나 2%의 FBS 농도구에 소량의 누에 체액 첨가에 따른 발현량 증대는 이미 우 등 (1995b)에 의해 보고된 것 처럼 누에 체액의 첨가가 바이러스 증식율을 높인다는 결과와 마찬가지로, 누에 체액의 첨가로 인하여 재조합 바이러스의 증식율이 높아짐에 따라 외래 유전자의 발현량이 높아진 결과로 추정된다. 한편, FBS 2% 또는 5%의 농도구에서 누에 체액 2%의 첨가가 가장 효과적인 결과는 FBS의 농도가 높을 때 바이러스의 증식율이 저해됨과 같이 누에 체액의 다량 첨가가 FBS와 함께 그러한 효과를 보인 것으로 추정된다. 발현량에 있어서는 Van Lier 등 (1992)이 보고한 곤충 세포주의 연속 부유배양에 의해 10^6 세포당 15 units의 β -galactosidase 발현량 보다 높은 결과로서 연속 부유 배양시 누에 체액의 첨가는 더 높은 발현량의 증대가 기대된다. 따라서 본 실험에서는 발현 최고치를 나타내는 접종 후 4일째까지 monolayer 세포에서 조사하였지만, 앞으로 연속 부유

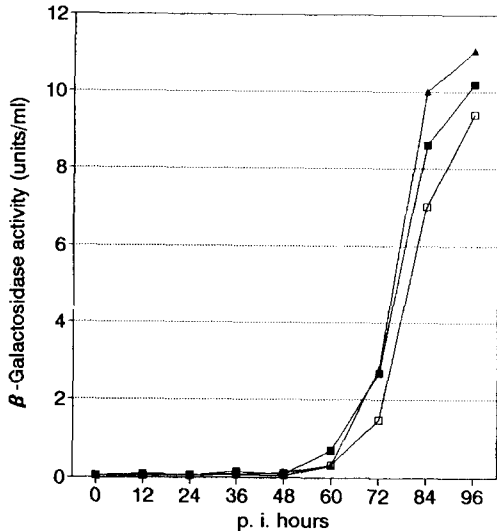


Fig. 4. The β -galactosidase production of recombinant virus in BmN-4 cells containing various concentration of silkworm hemolymph. The silkworm hemolymph was added 2% (■), 5% (▲) and 10% (□) to the recombinant virus-infected BmN-4 cells, respectively. The β -galactosidase production of recombinant virus was determined by β -galactosidase activity in culture media.

배양시 누에 체액의 첨가에 따른 발현효율과 아울러 누에 체액이 *Spodoptera frugiperda*(Sf) 세포주들에 대한 효과도 연구되어야 하겠다.

이상의 결과는 FBS가 2% 또는 5%일 때 누에 체액 2%의 소량 첨가만으로도 누에 체액이 첨가되지 않았을 때에 비해 약 2배 이상의 높은 발현량을 보였으며, 그 보다 FBS가 전혀 첨가되지 않고, 단지 누에 체액 2% 첨가만으로도 FBS 첨가시와 마찬가지로 유사한 발현량을 보여 누에 체액에 의한 FBS의 대체가 충분히 가능성을 시사하였다. 이는 또한 생산된 물질의 정제시에 문제가 되는 이질 단백질의 양을(O'Reilly 등 1992) 최소화 함과 동시에 발현량을 높일 수 있어 상당히 효율적이며, 아울러 누에 체액으로부터 바이러스 증식에 관련된 인자를 구명하게 되면 세포주에서 BmNPV 벡터의 이용에 따른 발현효율 증대에 응용되리라 기대된다. 더우기 누에 체액의 첨가가 그 발현량을 더욱 높일 수 있다는 결과는 양잠산업의 발전과 함께 생리, 생화학 및 유전 육종 등의 연구가 많이 진행된 누에 유충을 용이하게 이용할 수 있어 BmNPV 발현벡터계의 산업적인 이용 및 그 중요성을 더욱 높혀주리라 기대된다.

적 요

국내 분리주의 BmNPV를 이용한 전이벡터 pBm-KSK1에 외래 유전자로서 *E. coli* β -galactosidase 유전자를 클로닝하여 제작한 재조합 바이러스 BmK1-lacZ의 발현 증대를 위해 재조합 바이러스 감염세포주에 누에 체액의 첨가에 따른 발현효율을 조사하였다. 재조합 바이러스의 배양세포주에서 외래 유전자 발현에 대한 누에 체액의 첨가 효과는 FBS가 2% 또는 5% 일때 누에 체액 2%의 소량 첨가만으로도 누에 체액이 첨가되지 않았을 때에 비해 약 2배 이상 높은 발현량을 확인하였으며, 그 보다 FBS가 전혀 첨가되지 않고 단지 누에 체액 2% 첨가만으로도 FBS 첨가시와 마찬가지로 높은 발현량을 보여 누에 체액에 의한 FBS의 대체 효과를 나타내었다.

사 사

본 연구는 서울대학교 농업생명과학연구원과 농업특정연구개발사업 '95 연구비지원에 의하여 수행되었습니다.

引用 文 獻

- King, L. A. and R. D. Possee (1992) The Baculovirus Expression System - A laboratory guide. Chapman & Hall, London
- Maeda, S (1994) Expression of foreign gene in insect cells using baculovirus vectors. In Insect cell biotechnology. Edited by Maramorosch, K. & McIntosh A. Boca Raton: CRC Press; 1-31
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto, and M. Furusawa (1985) Production of human β -interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315: 592-594
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow (1992) Baculovirus Expression Vectors-A laboratory manual. W. H. Freeman and Company, New York
- Smith, G. E., M. D. Summers and M. J. Fraser (1983) Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165.
- Summers, M. D. and G. E. Smith (1987) A methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
- Ulrich, R., B. Blum, B. U. von Specht, H. Domdey and J. Collins (1992) Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Bio/Technology 10: 910-912.

Van Lier, F. L. J., W. C. J. van der Meijs, N. G. Grobber, R. A. Olie, J. M. Vlak and J. Tramper (1992) Continuous β -galactosidase production with a recombinant baculovirus insect-cell system in bioreactors. *J. Biotechnol.* 22: 291-298.

우수동 · 김우진 · 진병래 · 강석권 (1995a) 누에 핵다각 체형 바이러스를 이용한 새로운 전이벡터의 제작. *한국잠사학회지* 37(1): 46-51.

우수동 · 김우진 · 진병래 · 강석권 (1995b) 누에 핵다각 체형 바이러스의 세포증식에 대한 누에 체액의 영향. *한국잠사학회지* 37(1): 52-56.