

누에에서 새로운 항세균성 펩타이드 유사 유전자의 분리와 염기서열 결정

Molecular Cloning of a Gene Encoding a Putative Antibacterial Peptide from *Bombyx mori*김상현¹ · 제연호² · 윤은영¹ · 강석우¹ · 김근영¹ · 강석권²Sang Hyun KIM¹, Yeon Ho JE², Eun Young YUN¹,
Seok Woo KANG¹, Keun Young KIM¹ and Seok Kwon KANG²

ABSTRACT To isolate a novel gene for antibacterial peptide, an inducible clone(BmInc8) was selected by differential screening strategy from *Bombyx mori* cDNA library prepared from larvae injected with *Escherichia coli*. This clone contained a cDNA insert of 564 nucleotides and encoded 59 amino acids with an apparent molecular mass of 6.3 kDa. The cDNA sequence of BmInc8 had 61.2% identity compared to that of the bactericidin from *Manduca sexta* and also the deduced amino acids sequences from this insert had 65% identity compared to that of the cecropin D peptide *Hyalophora cecropia*. The transient expression assay of this insert using prokaryotic expression vector system revealed that the expressed peptide displayed the antibacterial activity. The cDNA sequence was deposited in GenBank under the accession number U30289.

초 록 누에에서 새로운 항세균성 펩타이드 유전자를 탐색하기 위하여 *E. coli* K12로 체강 주사한 누에 유충의 cDNA 유전자 은행에서 차별화 선별로, 잠재 항세균성 펩타이드 유전자로 추정되는 BmInc8 클론을 분리하였다. BmInc8은 564 bp의 크기를 가지며, 59개 아미노산을 coding하는 open reading frame과 2개의 잠정 폴리 아데닐화 부위를 보유하고 있었다. BmInc8은 *M. sexta*에서 분리, 보고된 bactericidine 유전자와 61.2%의 DNA 상동성을 나타내는 것으로, 그 연역된 펩타이드 구조는 항세균성 펩타이드의 일종인 cecropin과 유사한 2가닥의 α -helix가 Lysine-Proline 경첩부위에 의해 포개져 있는 형태를 갖는 것으로 추정 되었다. 또한 cDNA 삽입 부위의 기능성 검정을 위해 원핵 발현벡터인 pT7-5를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질 전환하고 IPTG로 induction한 결과 *E. coli* BL21(DE3) 균주의 성장이 정지됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 BmInc8은 DNA 상동성 비교, 연역 아미노산의 구조 추정 및 cDNA 삽입 부위를 이용한 transient expression 결과 항세균성 펩타이드를 coding하는 유전자임을 추정할 수 있었다. 또한 BmInc8의 cDNA 유전자 정보를 GenBank에 등록하였으며 등록 번호는 U30289이었다.

곤충은 병원체 침입에 대한 자기 방어 수단으로 항세균성 펩타이드를 생산한다. *Hyalophora cecropia*에서 cecropin, attacin 및 lysozyme이 분리된 이후, 곤충을 포함한 척추동물에서 수많은 항세균성 펩타이드가 분리, 보고되고 있다(Boman 과 Hultmark 1987). 이들 항세균성 펩타이드는 기주 특이성이 있어 자극원의 종류, 주입량 및 경과 시간에 따라 서로 다른 항세균 활성이 나타나는 것으로 알려져 있다(Dickson 등 1988).

*Hyalophora cecropia*에서 밝혀진 cecropin은 4 kDa의 펩타이드로 cecropin A, B 및 D 형태가 알려졌고, 수종의 그람 양성 또는 음성 세균에 활성을 나타낸다.

Attacin은 cecropin계 펩타이드보다 큰 분자량을 갖으며 그람 음성 세균에 대해 항세균 활성을 나타내고 *E. coli*의 외막을 가해하여 cecropin과 lysozyme의 항세균 활성을 증진시키는 것으로 알려져 있다(Hultmark 등 1983). Lysozyme은 대부분의 인시목 곤충에서 분리되었으며, Boman 등(1991)은 lysozyme의 주기능이 cecropin이 작용하고 남은 세균의 세포벽 성분을 가수분해하는 것으로 보고하였다. 또한 lysozyme은 다른 항세균성 펩타이드와는 다르게 그 발현 수준이 수일 동안 유지되는 것으로 알려져 있다. 이와같은 항세균성 펩타이드는 전구체 형태로 합성되며, 단백질 합성

¹농촌진흥청 잠사곤충연구소(National Sericulture and Entomology Research Institute, R.D.A., Suwon, Korea)²서울대학교 농업생명과학대학(College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea)

후 당부기와 아미드화 반응을 통해 활성이 4-5배 증가된 성숙 펩타이드화 되는 것으로 알려져 있다(Hellers 등 1991).

곤충의 항세균성 펩타이드는 그 구조가 간단하여 항생제로서의 이용 가능성이 높을 뿐 아니라 기존 합성 항생제에 대한 부작용 및 내성 문제 등을 고려할 때, 생물 신소재로서의 이용 가치가 높은 것으로 평가된다. 또한 Norelli 등(1994)은 attacin 유전자를 이용하여 해충 저항성 사과를 개발하였고, 이는 식물 해충의 생물학적 방제를 위한 적극적 수단으로 생각되어진다.

이상의 연구배경으로 본 연구에서는 비병원성 세균으로 면역 반응을 일으킨 누에의 cDNA 유전자 은행에서 새로운 항세균성 펩타이드 유전자로 추정되는 cDNA 클론을 선별하여 이 유전자의 염기서열을 결정하였고, 원핵 발현 벡터를 이용하여 이 유전자의 항세균 활성을 검정하였다.

재료 및 방법

면역 유도 누에의 cDNA 유전자 은행

본 실험에서 사용한 면역 유도 누에의 cDNA 유전자 은행은 김 등(1996)이 제작한 것을 사용하였다.

차별화 선별을 이용한 BmInc8의 선발

면역 유도 cDNA 유전자 은행에서 무작위로 *in vivo* excision(Short 등 1988)하여 얻은 콜로니로부터 플라스미드를 분리하고, 건강한 누에와 체강 주사한 누에의 mRNA를 탐침으로 차별화 선별(differential screening)을 수행하였다. 탐침은 각각의 mRNA를 cDNA로 전환하고 [α - 32 P]dATP(3,000 ci/mmol)로 표품하였다. 이와같은 방법으로 선별한 cDNA 유전자들중(김 등 1996) bactericidin cDNA와 상동성을 나타내는 BmInc8 클론을 선별하였다.

BmInc8의 염기서열 분석

염기서열 분석은 약 0.5-1.0 μ g의 단쇄 DNA를 SK primer(Stratagene, 5'-TCTAGAAGTGTGGATC-3', 17-mer, 3.125 ng/ μ l) 또는 T3 primer(Stratagene, 5'-ATAACCTCACTAAAG-3', 17-mer, 3.125 ng/ μ l) 1.5 μ l와 2.0 μ l 5 \times sequanase buffer를 넣고, 70°C에서 2분간 변성 후 primer와 주형 DNA가 annealing 될 수 있도록 35°C이하로 온도를 서서히 낮춰주고 2.0 μ l dGTP(혹은 7-deaza-dGTP, dITP) labeling mixture와 1.0

μ l 0.1 M DTT, 0.5 μ l [α -35S]dATP(10 mCi/ml) 혹은 [α -32P]dATP(10 Ci/ml)와 2.8 units의 sequanase를 넣고, 상온에서 5분간 방사선 동위 원소로 labelling시켰다.

상기 방법으로 수행한 반응물을 ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP가 들어 있는 정지 혼합액에 각각 3.5 μ l씩 분주하여, 37°C에서 5분간 종결 반응시키고, 여기에 4.0 μ l의 stop buffer를 넣어 염기 서열 분석용 겔에 전개 하였다. 전개한 겔은 3MM paper에 옮겨 건조한 후 X-ray film에 감광하여 분석하였다.

원핵 발현 벡터를 이용한 BmInc8의 항세균성 검정

DNA 상동성 비교에서 기존 항세균성 유전자와 상동성을 나타내는 BmInc8의 open reading frame을 고려하여 원핵 발현 벡터에 cDNA insert를 삽입하고 항세균성 검정을 수행하였다. 원핵 발현 벡터로는 Harvard 대학의 Tabor 교수로부터 분양받은 pT7-5를 사용하였고, 벡터의 *EcoR* I/*Sma* I 위치에 cDNA insert를 *Xho* I 절단, klenow fragment 처리, 그리고 *EcoR* I으로 절단하여 삽입하였다.

삽입 유전자의 항세균성 검정은 재조합 발현 벡터를 함유한 *E. coli* BL21(DE3)균주를 ampicillin이 들어있는 LB 배지에 접종하고 37°C에서 배양한 후, 배양액에 1~1.5 mM IPTG(isopropyl- β -thiogalacto-pyranicid)를 부가하여 *E. coli*의 성장정도를 관찰 하였다.

BmInc8 유전자의 RNA 크기 결정

RNA 크기는 정상조건의 누에 RNA, 면역유도 누에의 RNA 및 poly(A⁺) RNA를 1.2% formaldehyde 아가로스 겔에 전기영동하여 나일론 막에 찍은 후, 동위 원소로 표지된 BmInc8 cDNA 탐침으로 혼성화 반응시켜 결정하였다. 혼성화 반응은 아가로스 겔이 찍힌 나일론 막을 혼성화 용액(6x SSC, 2x Denhardt's 용액 0.1% SDS, 500 μ g/ml denatured salmon sperm DNA)에 넣고 68°C에서 16시간 동안 수행하였다. 반응된 나일론 막은 2x SSC와 0.1% SDS로 상온에서 각각 15분간 2회 세척, 0.1x SSC와 0.1% SDS로 68°C에서 각각 15분간 2회 세척한 후 X-ray필름에 감광하였다.

결과 및 고찰

차별화 선별을 이용한 BmInc8의 선발

누에체강에 *E. coli* K12를 주사한 후 면역반응의 일

환으로 발현량이 증가하는 유도 유전자를 선발하기 위해 건강한 누에와 체강주사한 누에에서 mRNA를 탐침으로써 차별화 선별하였다. 임의로 선정된 면역유도 cDNA 클론들은 milliblot system(Millipore)을 이용하여 2장의 나일론 막에 찍고 각각의 탐침으로 혼성화한 후, 면역 유도 mRNA를 탐침으로 혼성화 반응한 나일론 막에서 더 강한 반응을 나타내는 cDNA 클론들을 선별하였다. 선별된 cDNA 클론들 중 BmInc8의 염기서열은 GenBank 데이터베이스에서 *Manduca sexta*에서 분리된 bactericidin 유전자(Dickinson 등 1988)와 61.2%의 DNA 상동성을 나타내었다(김 등 1996).

BmInc8의 특성

BmInc8은 564 bp로 구성되어 있으며 번역 개시점인 잠정 ATG로부터 59개의 아미노산을 번역하는 open reading frame이 존재하였고 3' 말단에 2개의 잠정적인 폴리아데닐화 서열이 존재하였다(Fig. 1). BmInc8에서 번역된 아미노산 구조는 cecropin계 항세균성 펩타이드 구조와 유사하게 22개의 prepro 펩타이드 부위와 37개의 성숙 펩타이드 부위로 구성되어 있는 것으로 추정되었다(Fig. 2).

22개의 잠정 prepro 펩타이드 부위는 기존 cecropin계 항세균성 펩타이드의 prepro 펩타이드 영역과 비교적 상동성이 낮아 Boman 등(1991)이 보고한 cecropin계 펩타이드의 prepro 영역에 상동성 부위가 존재하지 않는다는 사실과 일치하였다. 또한 37개의 잠정 성숙 펩타이드 부분은 기존에 누에에서 보고된 cecropin계 항세균성 펩타이드 cecropin B(Kato 등 1993)와 40% 미만의 낮은 상동성을 나타내는데 비해, *M. sexta*의 B-5P 펩타이드와 56%의 상동성 및 Lidholm 등(1987)이 보고한 *Hyalophora cecropia*의 cecropin D 펩타이드와 65%의 상동성을 나타내었다. Cecropin계 펩타이드의 성숙 펩타이드 구조를 고려할 때 BmInc 8의 번역 아미노산 구조는 2개의 α -helix가 alanine-glycine-proline으로 구성된 경첩부위를 통해 서로 포개져 있는 형태로, 기존 항세균성 펩타이드와 유사하였고 21번과 22번째 아미노산인 lysine-proline는 dipeptidylaminopeptidase에 의해 성숙화되는 pro 펩타이드 부위로 추정되었다.

BmInc8의 항세균성 검정

BmInc8의 잠정 open reading frame에서 번역되는 단백질의 항세균성 여부를 확인하기 위하여 이 클론의 cDNA 부분을 Φ 10 promoter와 T7 RNA polymerase에

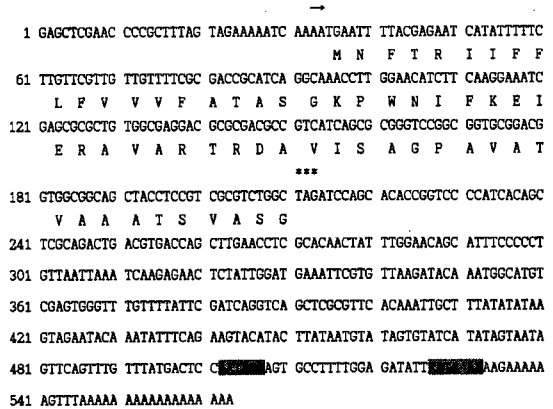


Fig. 1. The cDNA sequence of BmInc8. The deduced amino acids are indicated by single-letter code under the sequence. The translation start site(arrow), the translation stop sequence(asterisks) and putative polyadenylation signals(shadow boxes) are shown. This cDNA sequence was deposited in Genbank under the accession number U 30289.

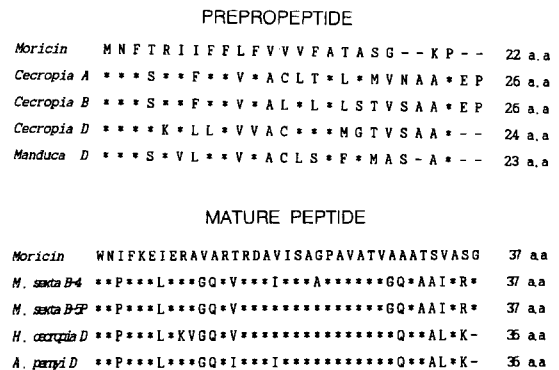


Fig. 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of BmInc8(Moricin) with several insect homologs. Differences in amino acid sequence are represented under the deduced sequence. The amino acid sequences are given with part of the signal peptide(upper) and mature peptide (lower). Hyphen represents blank space. Asterisks denote identical amino acid.

의해 조절되는 원핵 발현 벡터인 pT7-5 벡터에 클로닝하여 재조합 플라스미드(pT7-BmInc8)를 제작하고, 이 벡터를 *Escherichia coli* BL21(DE3) 균주에 형질 전환하였다(Fig. 3). 선별한 재조합 균주를 LB 배지에서 배양하고 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside)로 유도한 결과, 균주의 성장이 정지됨을 관찰함으로써 BmInc8이 항세균성 펩타이드 유전자를 coding하는 것

으로 추정할 수 있었다(Fig. 4). 이상의 결과로 BmInc8 유전자에 의해 발현되는 펩타이드를 Moricin 으로 명

명 하였고 이 유전자를 GenBank에 등록 하였다 (GenBank Access. No. U30289).

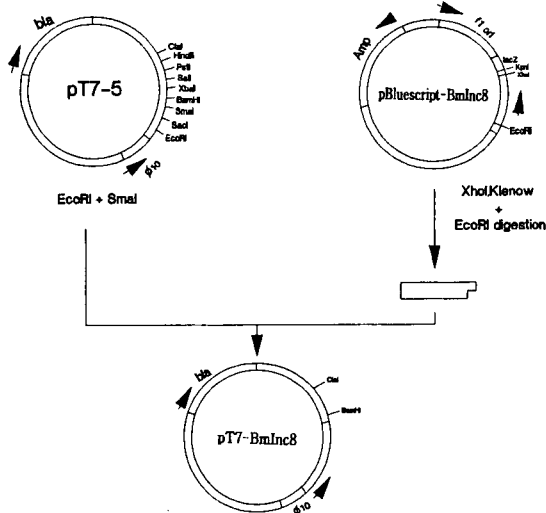


Fig. 3. Construction of the recombinant plasmid, pT7-BmInc8. The BmInc8 plasmid (pBluescript-BmInc8) was digested with *XhoI* and blunted with klenow enzyme. This linearized plasmid was digested with *EcoRI* and was eluted. The cDNA insert was ligated into *EcoRI/SmaI* digested pT7-5.



Fig. 4. Transient expression assay of the *E. coli* BL21 (DE 3) carrying recombinant plasmid, pT7-BmInc8. The *E. coli* carrying recombinant plasmid (BmInc8) was incubated for 1 hour at 37°C with shaking and IPTG was added to a final concentration of 1~1.5 mM. The cultures were incubated overnight at 37°C with shaking. The BmInc numbers are the cultures containing each cDNA insert. These inserts were isolated by differential screening from the cDNA library of *Bombyx mori* injected with *E. coli* (Kim *et al* 1996).

BmInc8의 mRNA 크기 결정

BmInc8의 누에 생체 내 크기를 조사하기 위하여 BmInc8의 cDNA insert를 탐침으로 poly(A⁺) RNA 크기를 결정하였다(Fig. 5). 그 결과 건강한 누에의 전체 RNA에서는 탐침과 반응하는 밴드를 확인할 수 없었으며, 면역 유도된 누에의 poly(A⁺) RNA에서 탐침과 반응하는 밴드를 확인할 수 있었다. 또한 건강한 누에의 poly(A⁺) RNA에서도 비록 그 강도는 매우 낮지만 탐침과 반응하는 밴드를 확인할 수 있었다. BmInc8의 탐침과 반응하는 poly(A⁺) RNA의 크기는 약 700~800 bp 정도이며, BmInc8 cDNA(564 bp)와 생체 내에 존재하는 poly(A⁺) RNA의 크기가 다른 것은 진핵생물의 poly(A⁺) RNA 성숙화 과정에서 poly(A⁺) 중합 효소가 3'-OH에 200개 정도의 아데닌 잔기를 부여하는 특징에 기인한 것으로 생각된다. 또한 면역 유도 누에에서

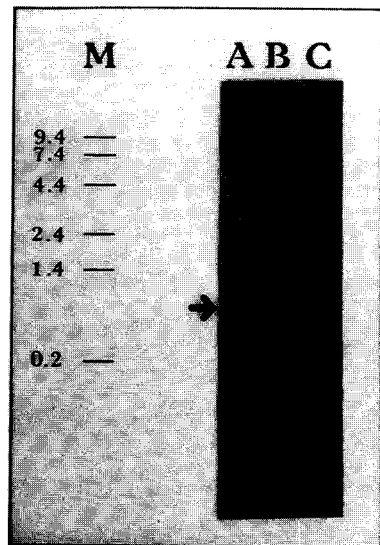


Fig. 5. Northern blot analysis for BmInc8 cDNA insert. Messenger RNA from naive and induced *Bombyx mori* larva, respectively, was extracted and electrophoresed on 1.2% formaldehyde agarose gel. The gel was transferred on nylon membrane and hybridized with radiolabeled cDNA probe. Lane A, naive *Bombyx mori* poly (A⁺) RNA ; Lane B, induced *Bombyx mori* poly (A⁺) RNA ; Lane C, naive *Bombyx mori* total RNA. The number indicates the size of RNA marker in knt. The arrow indicates BmInc8 mRNA band.

나타난 BmInc8 poly(A⁺) RNA 밴드 강도와 건강한 누에에서 나타난 BmInc8 poly(A⁺) RNA 밴드를 비교해 볼때 누에 생체 내의 BmInc8 유전자는 정상 조건에서도 어느 정도 발현 수준을 유지하다가 외부 병원체의 침입을 신호로 발현량이 급속히 증가하는 유전자로 추정할 수 있었다.

인용문헌

- Boman, H. G. & D. Hultmark. 1987.** Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 103-216.
- Boman, H. G., I. FAYE, G. H. Gudmundsson, J. Y. Lee & D. A. Lidholm. 1991.** Cell free immunity in Cecropia : A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* **201**: 23-31.
- Dickinson, L., V. Russel & P. E. Dunn. 1988.** A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **263**: 19424-19429.
- Hellers, M., H. Gunne & H. Steiner. 1991.** Expression and post-translational processing of preprocecropin A using a baculovirus vector. *Eur. J. Biochem.* **199**: 435-439.
- Hultmark, D., A. Engstrom, K. Anderson, H. Steiner, H. Bennich & H. G. Boman. 1983.** Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **2**: 571-576.
- Kato, Y., K. Taniai, H. Hirochika & M. Yamakawa. 1993.** Expression and characterization of cDNA for cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mole. Biol.* **23**: 285-290.
- 김상현, 제연호, 윤은영, 강석우, 김근영, 강석권. 1996.** 누에에서 차별화 선별을 통한 면역 관련 유도 유전자의 분리와 특성. *한잠학지.* **38**(1): 19-24.
- Lidholm, D. A., G. H. Gudmundsson, K. G. Xanthopoulos & H. G. Boman. 1987.** Insect immunity : cDNA clones coding for the precursor forms of cecropins A and D, antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *FEBS-Letters* **226**: 8-12.
- Norelli, J. L., H. S. Aldwinckle, L. Destefano-Beltran & J. M. Jaynes. 1994.** Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increase resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* **77**: 123-128.
- Reichhart, J. M., I. Ptit, M. Legrain, J. L. Dimarcq, E. Kppi, J. P. Lecocq, J. A. Hoffman & T. Achstetter. 1992.** Expression and secretion in yeast of active insect defensin, an inducible antibacterial peptide from the flashfly *Pfornia terranova*. *Invertebr. Reproduc. Develo.* **21**: 15-24.
- Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge & W. D. Huse. 1988.** λ ZAP : A Bacteriophage λ Expression Vector with *in vivo* Exision Properties. *Nucleic Acids Research* **16**: 7583-7600.

(1996년 5월 13일 접수)