

누에에서 차별화 선별을 통한 면역 관련 유도 유전자의 분리와 특성

김상현 · 제연호* · 윤은영 · 강석우 · 김근영 · 강석권*
농촌진흥청 잠사곤충연구소, *서울대학교 농업생명과학대학

Isolation and Characterization of Inducible Genes from *Bombyx mori* Injected with *E. coli* by Differential Screening

Sang Hyun Kim, Yeon Ho Je*, Eun Young Yun, Seok Woo Kang
Keun Young Kim and Seok Kwon Kang*

National Sericulture and Entomology Research Institute, R. D. A., Suwon, Korea,

*College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea.

Abstract

To investigate the genes which is related to immune reaction of *Bombyx mori*, differential screening was carried out using naive and induced *B. mori* mRNA probe. To begin with, we constructed the cDNA library with mRNA isolated from fifth instar larvae injected with *E. coli* (4×10^6 cells/larva) using Uni ZAP XR vector kit. Thirty-two inducible cDNAs showing higher intensity on the induced mRNA probing membranes were selected. Partial nucleotide sequences of 29 clones were determined and their expressed sequence tags (ESTs) were produced. Nineteen ESTs in 29 ESTs were matched in GenBank database and the rest of them were found to be unknown.. These unmatched ESTs were presumed to be novel genes. The nineteen ESTs contained variable genes related to biological process in *Bombyx mori* and four classes immune genes. Four clones, BmInc 6, 8, 18 and 27 were similar to two antibacterial peptide genes, hemolin gene and transferrin gene, respectively.

Key words : *Bombyx mori*, Differential screening, Expressed sequence tags, Invertebrate immune system

서 론

곤충은 단단한 표피층과 중장 상피 세포를 보호하는 위식막 등의 수동적인 방어체제와 혈림프를 통한 식균 작용, 결절 형성 반응 및 혈구 피막 형성 작용으로 외부 침입체에 대해 방어하는 기작을 보유하고 있다 (Brehelin *et al.* 1989). 또한 곤충은 체강내로 세균이 침입하게 되면 체액성 면역의 일환으로 다양한 종류의 항세균성 펩타이드가 분비되어 이에 대응하는 것으로 알려져 있다 (Boman & Hultmark 1987). 곤충 면역 기능에 대한 이해는 생명 현상 구명 뿐 아니라 면역 강화제 및 신규 항생제 개발 등 생물 신소재로의 이용 가능성이 높아 많은 연구가 진행되고 있는

실정이다.

한편 최근의 분자 생물학은 생체 내 서로 다른 조직과 환경에서 생성되는 다양한 전사체들을 탐침으로 새로운 유전자를 분리하는 방법을 제시하였고 (H öög 1991), 이 방법을 이용하여 다양한 조건에서 발현되는 새로운 유전자들이 분리되었다. 이에 위 방법을 곤충 면역 체계에 도입하면 면역 반응에 관련된 유전자들을 새롭게 분리하고 해석할 수 있을 것으로 예상된다.

이에 본 실험에서는 누에 5령 유충에 면역원으로 *E. coli* K12 (4×10^6 cells/larva)를 체강 주사하여 면역 반응을 유도하고, 이 조건에서 예상되는 누에 면역 작용을 유전자 수준에서 조사하기 위하여 면역유도

누에의 cDNA 유전자은행을 제작하였다. 또한 건강한 누에와 체강주사한 누에에서 분리한 mRNA를 탐침으로, 차별화 선별하여 발현량이 증가하는 cDNA 클론들을 선별하고 이들의 발현 유전자 꼬리표를 생산하였다.

재료 및 방법

1. 공시 실험 곤충 및 면역 유도

공시 누에 (*Bombyx mori*)는 농촌진흥청 잠사곤충 연구소의 표준 사육 기준 (온도, 24°C~27°C ; 상대습도 70%~90%)에 준하여 사육한 칠보잠이었다. 면역 유도는 대수기의 *E. coli* K12 (4×10^6 cells/larva)를 누에 5령 유충 체강에 주사하여 8시간 경과한 것을 사용하였다.

2. 면역유도 누에의 RNA 분리 및 cDNA 유전자 은행 작성

전체 RNA 분리는 Davis 등 (1986)의 방법으로 수행하였다. 즉 면역 유도 누에 5령 유충을 액체 질소로 급속 냉동시킨 후 유발로 마쇄하여 시료 그램당 12.5 ml의 추출 완충액 (4 M guanidine isothiocyanate, 5 mM EDTA, 1% β -mercaptoethanol, 25 mM sodium acetate / pH 6.0)을 가하였다. 완충액과 혼합된 시료를 miracloth로 여과하여 얻은 용액에 CsCl (0.2 g/ml)을 섞고 위 혼합액을 4.5 ml의 5.7 M CsCl 완충액이 있는 초원심 분리관에 loading하여 20°C에서 65,000 rpm으로 5시간 원심 분리 하였다. 원심 분리 후 RNA 침전물을 모아 2.5배량의 100% 에탄올로 침전시켜 -70°C에 보관, poly(A⁺) RNA 분리에 사용하였다. cDNA 유전자은행 제작에 사용된 poly(A⁺) RNA는 oligo(dT)-셀룰로오즈 칼럼을 이용하여 분리하였다. 즉 전체 RNA를 65°C에서 10분간 가열하여 변성시킨 후 급속히 얼음에 냉각하고, 2배량의 loading buffer (2 mM EDTA, 0.4% SDS, 1.0 M NaCl, 20 mM Tris-HCl / pH 7.5)를 섞은 혼합액을 oligo(dT)-셀룰로오즈 칼럼에 통과시키고 흘러나온 용액을 1회 더 같은 칼럼에 통과시켜 poly(A⁺) RNA를 칼럼에 결합시켰다. 이칼럼에 칼럼부피 10배량의 세척용 완충액으로 세척하고, 50°C로 가온한 회수용 완충액 (1 mM EDTA, 0.2% SDA, 10 mM Tris-HCl / pH 7.5) 2 ml을 가하여 poly(A⁺) RNA를 회수하였다. Poly(A⁺) RNA가 포함된 회수액에 2배량의 100% 에탄올을 첨가하여 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고 poly(A⁺) RNA 침전물을 DEPC가 첨가된 증류수에 녹여

A260에서 흡광도를 측정하였다. 위 방법으로 poly(A⁺) RNA를 순수 분리하고, cDNA 유전자 은행을 Uni ZAP XR vector kit (Stratagene, CA, U. S. A.)의 방법에 의거 작성하였다.

3. 건강 및 면역 유도 누에의 mRNA를 이용한 차별화 선별

무작위 선별하여 *in vivo* excision (Short *et al.* 1988)한 면역유도 누에의 cDNA 클론에서 플라스미드 DNA를 분리, 95°C에서 10분간 가온하여 변성시킨 후 두장의 나일론 막에 각각 0.5 μ g의 DNA를 찍었다. 한장은 면역 유도한 누에에서 분리한 poly(A⁺) RNA, 나머지 한장은 건강한 누에에서 분리한 poly(A⁺) RNA를 M-MLV 역전사효소로 합성한 cDNA를 탐침으로 혼성화하였다.

cDNA 탐침제조는 1.5 ml 튜브에 1 μ g poly(A⁺) RNA, 1 μ g oligo(dT) primer (1 μ g/ μ l), 20 units RNase inhibitor, 5 μ l 5x reverse transcriptase buffer, dGTP, dCTP, dTTP (20 mM/each), 120 μ M dATP, 10 μ l [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol)와 20 units M-MLV 역전사효소를 넣고 멸균수로 총 25 μ l가 되게 만들어 37°C에서 1시간 동안 역전사하였다. 여기에 2 units RNaseH를 첨가하고 37°C에서 15분간 반응하여 poly(A⁺) RNA만을 선택적으로 제거시킨 후 동위 원소가 표지된 단선 cDNA를 G-50 Sephadex 칼럼을 이용하여 회수하였다.

4. 차별화 선별 클론의 DNA 부분염기서열 결정 : 발현 유전자 꼬리표 생산

염기 서열 분석은 약 0.5-1.0 μ g의 단선 DNA를 SK primer (Stratagene, 5'-TCTAGAACTAGTGGATC-3', 17-mer, 3.125 ng/ μ l) 또는 T3 primer (Stratagene, 5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3', 17-mer, 3.125 ng/ μ l) 1.5 μ l와 2.0 μ l 5 \times sequenase 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 sequenase를 넣고, 상온에서 5분간 방사선 동위 원소로 labelling 시켰다.

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

Table 1. Characteristics of cDNA libraries from whole body of *Bombyx mori*

Name	Vector	Tissue	Efficiency
λBmInc	λZAP XR	whole body	1.1×10^6

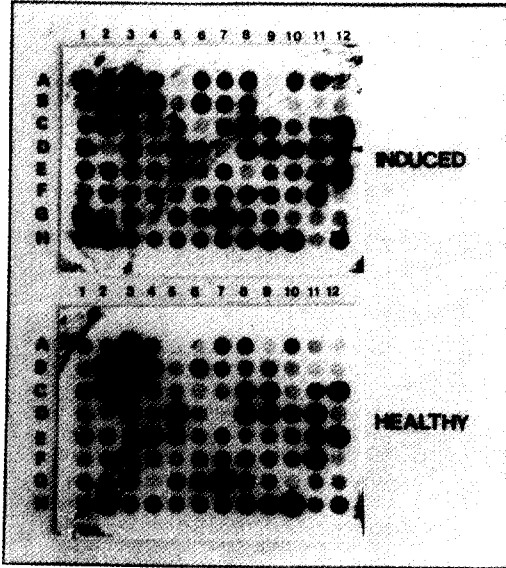


Fig. 1. Differential hybridization using mRNA from induced and naive *Bombyx mori*. Randomly selected phage clones were converted into pBluescript SK-. The plasmids were transferred on nylon membrane and hybridized with radiolabeled 1st strand cDNA of poly(A)⁺ RNA from induced and naive *Bombyx mori*, respectively. The induced clones are indicated by arrowheads.

겔에 loading 하였다. 결정된 염기서열은 DNASIS 프로그램으로 GenBank 데이터 베이스에서 DNA 염기 상동성을 검색하였다.

결과 및 고찰

1. 누에 유충의 면역유도와 cDNA 유전자은행 작성

누에에 비병원성 세균 (*E. coli* K12)을 주사하여 면역 반응을 유도한 후, 면역 반응의 일환으로 발현량이 증가하는 유도 유전자를 탐색하고 분석하기 위해 우선 면역 유도 누에에서 cDNA 유전자 은행을 작성하였다 (표 1).

면역 유도한 cDNA 유전자 은행 제작에 사용한 시

료는 *E. coli* 주사 후 8시간 경과한 누에로 선정하였는데, 이는 Kato *et al.* (1993)이 누에 유충에 *E. coli*를 체강 주사하였을 때 비 병원성 세균에 대한 면역 유도 반응이 2시간 경과 후에 나타나면서 8시간 경과 후에 최고에 달하고, 그 후에 점점 감소하는 경향을 보고하였고 또한 cecropin B 유전자를 이용하여 3종의 유충에서 발현 소장을 조사하였을 때 *Manduca sexta* (Dickson *et al.* 1988)는 8~12시간, *Sarcophaga peregrina* (Matsumoto *et al.* 1986)는 6시간 그리고, *Drosophila melanogaster* (Kylsten *et al.* 1990)는 6시간 경과한 후 최고의 발현량을 나타내는 것으로 보고하였기 때문이다. 이와같이 곤충의 신속한 면역 유도 반응은 번역 조절 기구에 의한 것이 아니라 전사 조절 및 전사 후 조절 기구로 전사체의 안정성을 유지하는 것으로 알려져 있다.

cDNA 유전자 은행은 Uni ZAP XR vector kit를 이용하여 제작하였다. 순수 분리한 poly (A)⁺ RNA로부터 blunt end duplex cDNA를 합성하였고 5'과 3' 말단에 *EcoRI*과 *XhoI* 인식 부위를 각각 부여하였다. 이것을 λ ZAP II 벡터에 삽입하고 packaging extract를 사용해 *in vitro* packaging 하였다. 제작된 cDNA 유전자 은행에는 약 1.1×10^6 개의 파아지가 존재하였다 (표 1).

2. 차별화 선별한 유도 유전자의 선별

누에에 면역 반응의 일환으로 발현량이 증가하는 유도 유전자를 선별하기 위해 면역유도 누에 cDNA 유전자 은행에서 cDNA 파아지 클론들을 *in vivo* excision 방법으로 플라스미드로 전환하였다. 차별화 선별을 위한 cDNA 탐침은 면역 유도 및 건강한 누에에서 분리한 poly(A)⁺ RNA를 이용하였다. 무작위 선별한 596개의 면역유도 cDNA 클론들을 milliblot system (Millipore)을 이용하여 2장의 나일론 막에 찍고, 2종의 탐침으로 각각 혼성화한 후, 면역유도 poly(A)⁺ RNA를 탐침으로한 나일론 막에서 더 강한 반응을 보이는 cDNA 클론들을 선별하였다 (그림 1).

Höög (1991)이 보고한 포유동물의 조직 특이 유전자 선별은 특이조직 (간, 콩팥, 심장 및 고환 등)에서만 발현되는 유전자를 선별하기 위한 실험으로 각각의 조직에서 발현되는 유전자의 발현량은 그 차이가 뚜렷하나, 상기 방법은 정상 누에에 비병원성 세균으로 면역반응을 유도한 후 발현량이 증가하는 유도 유전자 탐색이어서 그 차이가 뚜렷하지 않은 경우도 있어 나일론 막에 고정된 DNA의 농도 및 탐침으로 사용한 cDNA 농도 문제를 고려하여 그림 1에서 선별

Table 2. cDNA insert size of 32 induced clones

cDNA clones	insert size(bp)	cDNA clones	insert size(bp)	cDNA clones	insert size(bp)
BmInc 1	590	BmInc 12	830	BmInc 23	590
BmInc 2	800	BmInc 13	820	BmInc 24	500
BmInc 3	1100	BmInc 14	830	BmInc 25	1100
BmInc 4	590	BmInc 15	820	BmInc 26	870
BmInc 5	580	BmInc 16	560	BmInc 27(22')	2100
BmInc 6	800	BmInc 17	1200	BmInc 28	590
BmInc 7	600	BmInc 18	590	BmInc 29(28')	2300
BmInc 8	600	BmInc 19	650	BmInc 30	

*Thirty two of the induced clones were digested with *EcoRI/XhoI* and electrophoresed on 1% agarose gel. The putative insert size was estimated.

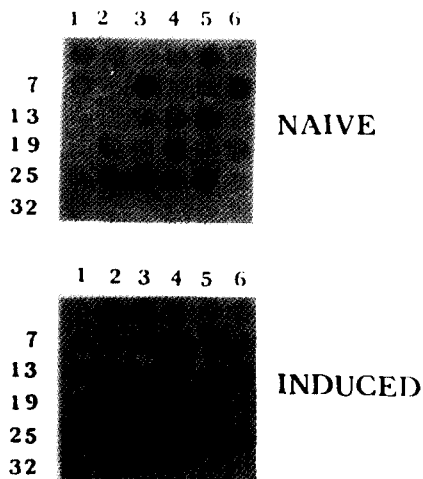


Fig. 2. The secondary screening of the induced clones. Thirty two of the induced clones selected in the Fig. 1 were screened again by differential hybridization.

한 32개의 클론에 대해 차별화 정도를 다시 확인하였다 (그림 2). 이때 사용한 주형 DNA의 농도는 500 ng 이었고 cDNA 탐침의 농도는 25 ng 이었다.

3. 차별화 선별한 유도 유전자의 특성 조사

차별화 선별로 발현량이 증가하는 유도 유전자를 선 발하고 삽입 유전자의 크기를 조사하기 위해 *EcoRI/XhoI* 제한효소로 처리하였다 (그림 3). 11번과 30번 클론은 제한효소로 절단되지 않아 제외하였다. 삽입 유전자 크기는 약 600 bp에서 2,500 bp에 달하는 유전자이었다 (표 2). pBluescript 벡터의 정방향 primer, 역방향 primer 그리고 exonuclease III에 의한 deletion set을 작성하여 염기 서열을 분석하였고 GenBank 데이터 베이스

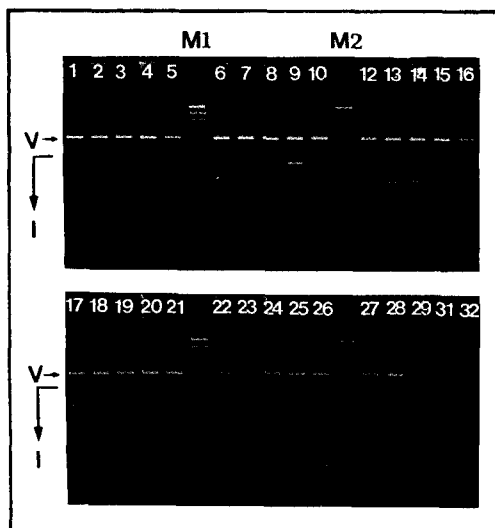


Fig. 3. Restriction endonuclease digestion patterns of the induced clones. Thirty two of the induced clones were digested with *EcoRI/XhoI* and electrophoresed on 1% agarose gel. V, pBluescript SK(-); I, insert fragments of cDNA clones; M1, λ /Hind III marker; M2, λ /Hind III- Φ X174/Hae III marker

에 검색하여 발현 유전자 꼬리표를 작성하였다 (표 3). 차별화 선별한 32개 유도 유전자에서 BmInc 11, BmInc 26, BmInc 30 등 3개 클론을 제외하고 29개 cDNA 클론의 부분 및 전체염기서열을 결정하여 발현 유전자 꼬리표를 만들었다.

표 3은 GenBank 데이터 베이스에서 DNA 상동성을 조사한 29개의 발현 유전자 꼬리표로 차별화 선별된 클론 중에는 많은 것들이 아직 실체가 밝혀져 있지 않은 유전자들이었고 비교적 유의할 만한 상동성을 나타내어 그 실체를 추정할 수 있는 것으로

Table 3. Expressed sequence tags of 29 induced clones by GenBank data base search

Clone	Sequence(bp)	Putative identification	Length compared(bp)	% matched
BmInc 1	374	5.8S rRNA	165	63.5
BmInc 2	154	Not identified		
BmInc 3	854	Not identified		
BmInc 4	395	<i>D.melanogaster</i> λ -tubulin	167	58.1
BmInc 5	385	Not identified	399	46.6
BmInc 6	839	Attacin-like peptide	735	64.5
BmInc 7	566	Not identified		
BmInc 8	563	Bactericidin-like peptide	473	51.8
BmInc 9	249	Translation elongation factor	206	50.5
BmInc 10	250	Not identified		
BmInc 12	255	<i>D.melanogaster</i> HSP	256	61.7
BmInc 13	239	Interleukin-3 receptor	181	50.3
BmInc 14	167	Interleukin-8 receptor	159	50.9
BmInc 15	177	Angiotensin-binding protein	159	50.9
BmInc 16	159	<i>D.melanogaster</i> paramyosin	156	64.7
BmInc 17	215	Rat GABA transporter	161	47.8
BmInc 18	756	<i>M.sexta</i> hemolin gene	659	45.4
BmInc 19	139	Not identified		
BmInc 20	79	Hemoglobin gene cluster	64	68.8
BmInc 21	576	<i>Hydra magnipapillata</i> HSP	587	46.2
BmInc 22	186	<i>T.ni</i> HSP	161	83.9
BmInc 23	701	Not identified		
BmInc 24	313	Not identified		
BmInc 25	196	Bovine adenylyl cyclase mRNA	179	52.0
BmInc 27(22')	201	Transferrin	201	67.2
BmInc 28	201	β -tubulin	182	46.7
BmInc 29(28')	411	Not identified		
BmInc 31(48)	155	Not identified		
BmInc 32(84)	175	Not identified		

* Comparisons with the CD-DATA DNA/Protein Sequence Database (Hitachi) were done by means of the program DNASIS.

는 세포 골격 성분 (BmInc4, 28), 번역 신장 인자 (BmInc9), 포유동물의 혈압을 조절하는 angiotensin의 수용체 (BmInc15), interleukin 수용체 (BmInc13, 14), 열충격 단백질 (BmInc 12, 21, 22)과 면역에 관련된 유전자 (BmInc6, 8, 18, 27)들 이었다. 3종의 열충격 단백질 유전자가 차별화 선별된 이유는 *E. coli*를 이용한 체강 주사가 일종의 자극으로 누에 유충에 전달되어 이들의 발현 수준이 증가한 것으로 생각되었다.

특히 차별화 선별한 클론 중에 곤충 면역에 관련된 4종의 클론을 선별할 수 있었다. 곤충 유래 항세균성 펩타이드 유전자와 유사한 BmInc6과 8의 선별은 체강 주사후 누에의 체액성 면역 작용의 상승을 의미하였다. 또한 BmInc18과 27이 선별된 이유는 면역 작

용에 관련된 hemolin 유전자와 비특이적 생체 방어를 담당하는 transferrin 유전자의 발현 수준이 체강주사로 인해 증가한 것으로 생각되었다.

본 실험을 수행한 결과 상기와 같이 면역반응의 일환으로 발현되어지는 다양한 유전자 종류를 선별할 수 있었다. 특히 곤충 면역에 직접적으로 관련되는 항세균성 펩타이드 유전자의 분리는 정확한 동정과 기능성 검정을 통해 새로운 항세균성 물질 개발이 예상되며, 병원성 세균 주사와 같은 다양한 면역원과 면역 조건에 따라 새로운 기능성 유전자들을 선별할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 cDNA 유전자 제작시 subtraction library 제작 방법 (Fargnoli *et al.* 1990)을 도입하면 좀 더 효율적인 선별 방법이 될 것으로 생각되었다.

적 요

누에에서 생체 방어에 관련된 새로운 항 세균성 펩타이드 유전자를 탐색 분리하기 위하여 누에 체강에 비 병원성 세균인 *Escherichia coli*를 주사하여 면역 반응의 일환으로 발현량이 증가하는 유도 유전자 종류를 조사 하였다. 체강 주사 8시간 후 누에에서 cDNA 유전자 은행을 만들고, 정상 및 유도 누에에서 분리한 각각의 mRNA를 탐침으로 차별화 선별을 하였다. 차별화 선별 결과 정상보다도 유도 누에의 탐침을 사용한 막에서 강도가 높은 클론 32개를 선별하였고, 29개 클론에 대해 전체 또는 부분 염기 서열을 분석하여 DNA 상동성을 조사하였다. DNA 상동성 비교를 통해 생산한 발현 유전자 꼬리표 중에는 비교적 상동 유의성이 인정되어 그 실체를 추정할 수 있는 19개의 클론이 있었다. 특히 곤충의 면역 작용에 직접적으로 관계하는 항세균성 펩타이드 유전자, hemolin 유전자, transferrin 유전자 등 4종의 유전 자원을 확보할 수 있었다.

인 용 문 헌

- Boman, H. G. and D. Hultmark (1987) Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41 : 103-216.
- Brehelin, M., L. Drif, L. Baud and N. Boemare (1989) Insect hemolymph : cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19 : 301-307.
- Davis, L. G., M. D. Dibner and J. F. Battey (1986) Basic methods in molecular biology. Elsevier, New York.
- Dickinson, L., V. Russel and P. E. Dunn (1988) A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 263 : 19424-19429.
- Fargnoli, J., N. J. M. Holbrook and A. J. Fornace (1990) Low Ratio hybridization subtraction. *Anal. Biochem.* 187 : 364-373.
- Höög, C (1991) Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res.* 19 : 6123-6127.
- Kato, Y., K. Taniai, H. Hirochika and 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.
- Kylsten, P., C. Samakovlis and D. Hultmark (1990) The cecropin locus in *Drosophila* ; a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J.* 9 : 217-224.
- Matsumoto, N., M. Okada, H. Takahashi, X. M. Qu, Y. Nakajima, Y. Nakanishi, H. Komano and S. Natori (1986) Molecular cloning of a cDNA and assignment of the C-terminal of sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem. J.* 239 : 717-722.
- Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge and W. D. Huse (1988) λ ZAP : A Bacteriophage λ Expression Vector with in vivo Exision Properties. *Nucleic Acids Res.* 16 : 7583-7600.