

집누에로부터 새로운 attacin 유사 항세균성 펩타이드 유전자의 분리 및 발현

Molecular Cloning and Expression of the Novel Attacin-Like Antibacterial Protein Gene Isolated from the *Bombyx mori*

윤은영 · 김상현 · 강석우 · 진병래
김근영 · 김호락 · 한명세¹ · 강석권²

Eun Young YUN, Sang Hyun KIM, Seok Woo KANG
Byung Rae JIN, Keun Young KIM, Ho Rak KIM
Myung Sae HAN¹ and Seok Kwon KANG²

ABSTRACT *Hyalophora cecropia* attacin-like antibacterial gene was isolated from *Bombyx mori* induced with non-pathogenic bacteria. It was expressed in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells using baculovirus expression vector system (BEVS), and examined its antibacterial activity. With a cDNA library constructed from fifth-instar *B. mori* injected with *Escherichia coli* (4×10^6 cells/larva), differential screening was performed using naive and induced mRNA probes. BmInc6 clone was screened by partial nucleotide sequence and GenBank database analysis. A complete nucleotide sequence of BmInc6 cDNA was determined (GenBank, AF005384). Its insert size was 852 bp and had open reading frame that started translation at position 35 and stopped at 679. And its putative polyadenylational signal existed at 812 bp. The number of amino acid deduced from BmInc6 cDNA was 214 and hydropathy analysis showed that this peptide was hydrophilic. This peptide deduced by BmInc6 was named nuecin. When the nuecin gene was expressed in Sf9 cells using BEVS, about 950 bp of the transcripts was detected. In addition, SDS-PAGE analysis showed that the molecular weights of intracellular expressed protein and the mature protein secreted to culture media were approximately 23 and 20 kDa, respectively. The antibacterial activity of nuecin against *E. coli* and *Bacillus subtilis* was significantly high, demonstrating that nuecin had a wider antibacterial spectrum with gram negative and positive bacteria than attacin.

KEY WORDS *Bombyx mori*, antibacterial protein, attacin, nuecin

초 록 곤충 유전자를 이용한 항세균성 펩타이드 생산 및 응용에 관한 기초 연구로서 비병원성 세균 (*Escherichia coli* K12)으로 면역 반응을 유도한 누에로부터 발현량이 증가하는 유전자 중 *Hyalophora cecropia*의 attacin과 cDNA 상동성을 나타내는 BmInc6 클론을 분리하고 그 특성을 조사하였다. BmInc6 cDNA의 전체염기서열을 분석한 결과 그 크기는 852 bp이고, 35번째 염기에서 번역이 개시되어 679 bp 위치에서 종결되는 open reading frame을 가지며, 812번째 위치에 잠정 전사 종결 신호의 존재가 확인되었다(GenBank, AF005384). BmInc6에 의해 coding되는 아미노산은 214개이며, hydropathy 분석 결과 친수성을 나타내는 단백질이었다. 그리고 BmInc6 유전자에 의해 번역되는 펩타이드를 nuecin으로 명명하였다. Nuecin 유전자를 baculovirus 발현 벡터계를 이용하여 곤충세포주에서 발현시킨 결과 전사체의 크기는 약 950 bp였고, 세포내 발현 펩타이드의 분자량은 약 23 kDa이었다. 세포내에서 발현된 nuecin 전구체로 추정되는 23 kDa 펩타이드는 세포외로 분비되는 과

농촌진흥청 잠사곤충연구소(National Sericulture & Entomology Research Institute, RDA, Suwon 441-100, Korea)

¹ 경북대학교 농과대학(College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, Korea)

² 서울대학교 농업생명과학대학(College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea)

정에서 약 3 kDa의 signal 펩타이드가 제거됨으로서 약 20 kDa의 성숙 nuecin으로 된다는 사실을 단백질 전기영동상으로 확인하였다. Nuecin 단백질의 항세균 활성을 수종의 그람 음성 및 양성 세균에 대해 검정한 결과, 특히 *E. coli*와 *Bacillus subtilis*에 높은 활성을 나타내었으며, attacin이 한정된 그람 음성 세균에만 항세균 활성을 나타내는데 비해 nuecin은 그람 음성은 물론 그람 양성에도 항세균 활성을 나타내어, 보다 넓은 항세균 스펙트럼을 가지는 것을 알 수 있었다.

검색어 누에, 항세균성 단백질, attacin, nuecin

곤충은 미생물이나 외부 물질 등의 침입에 대한 생체 방어 수단으로 식작용(phagocytosis), 결절 형성(nodule formation), 캡슐 형성(encapsulation) 등으로 침입 물질을 제거하는 세포성 면역과 지방체와 혈구에서 단백질을 합성한 후 혈림프로 분비하여 미생물을 제거하는 체액성 면역을 가지고 있다(Boman과 Hultmark, 1987; Dunn, 1986). Boman과 Hultmark (1981)는 표피의 상처 또는 세균이나 lipopolysaccharide (LPS) 등의 체강주입으로 면역유도한 산누에 나방과의 세크로피아잠(*Hyalophora cecropia*)으로부터 cecropin, lysozyme, hemolin 및 attacin 등의 항세균 활성을 나타내는 단백질을 분리하였다. 그밖의 면역과 관련된 다른 단백질로는 apidaecin, defensin, diptericin, hyphancin 등이 보고되고 있다(Casteels 등, 1989; Lambert 등, 1989; Dimarcq 등, 1988; Park 등, 1994).

이 중 attacin은 약 20~23 kDa의 분자량을 가지는 펩타이드로, 지금까지 보고된 6가지의 형태 중 4가지는 염기성, 2가지는 산성의 등전점을 나타낸다(Dunn, 1986). 산성 attacin은 19개 아미노산 signal sequence와 28개 아미노산 prosequence로 이루어졌고, 염기성 attacin은 17개 아미노산 signal sequence와 29개 아미노산 prosequence로 구성되어 있다. 전구체 형태의 preproattacin은 소포체(endoplasmic reticulum)로 수송된 후(Simon과 Blobel, 1991) 골지체(golgi body)에서 2개의 염기성 잔기(arginine - arginine)를 인식하는 효소에 의해 signal 펩타이드가 제거되어 mature attacin으로 전환되고(Pfeffer와 Rothman, 1987), attacin N-말단의 glutamine이 pyroglutamyl로 전환되면서 혈림프로 분비되어 생물학적 활성을 나타낸다(Gunne 등, 1990).

한편, cecropin은 세균의 막을 파괴하는 작용을 하고, *Sarcophaga peregrina*에서 분리된 attacin과 유사한 단백질인 sarcotoxin IIA는 세균의 세포벽 합성을 저해하는 작용을 함이 밝혀졌다(Ando와 Natori, 1988; Kanai와 Natori, 1990). 그리고 attacin은 세균

피막 단백질의 생합성을 저해하고(Carlsson 등, 1991) *E. coli*의 외막을 침해하여 cecropin이나 lysozyme의 항세균 활성을 증진시키나, 그 항세균 활성이 그람 음성 세균에 국한되어져 있다(Engström 등, 1984). 또한 최근 누에로부터 분리된 attacin 유사 펩타이드는 cDNA의 크기가 846 bp로 보고되었으나, 항세균 활성의 스펙트럼은 아직 보고되지 않았다(Sugiyama 등, 1995).

따라서 본 실험에서는 집누에(*Bombyx mori*)로부터 항세균성 단백질 유전자를 분리하고, 염기서열 분석을 통하여 새로운 attacin 유사 항세균성 단백질 유전자 임을 밝혔다. 아울러 이를 baculovirus 발현 벡터 시스템을 이용하여 곤충세포주에서 발현하고, 항세균 활성을 검정하여 그람 음성 세균 뿐만 아니라 그람 양성 세균에도 항세균 활성을 나타냄을 밝혔다.

재료 및 방법

공시 곤충, 곤충세포주 및 바이러스

본 실험에 사용한 누에는 장려 잠품종인 칠보잠(잠107×잠108)으로 농촌진흥청 잠사곤충연구소의 표준 사육 기준(온도 24~27°C; 상대습도 70~90%)에 준하여 사육하였다. 곤충세포주는 *Spodoptera frugiperda* 유래의 Sf9 세포주를 사용하였으며, 세포 배양은 TC-100 (Sigma) 배지에 10% Fetal Bovine Serum (Gibco)을 첨가하여 27°C 항온기에서 계대배양하였다. 또 공시 곤충 바이러스는 *Autographa californica* 핵다각체병 바이러스(AcNPV)를 사용하였다.

면역 유도 누에의 차별화 선별

면역 유도 누에의 cDNA 유전자 은행은 잠사곤충 연구소 유전공학 연구실에서 제작한 것으로 대수기의 *E. coli* K12 (4×10^6 cells/larva)를 5령 유충 체강에 주입한 후 8시간 경과한 누에를 사용한 것이다. 정

상 누에에 비해 발현량이 증가하는 면역 유도 누에 유전자의 차별화 선별은 Höög (1991)이 보고한 differential screening 방법에 의해 수행하였다(Kim 등, 1996).

차별화 선별한 cDNA 클론은 M13K07 helper 파아지를 이용하여 단선 DNA를 분리한 후, 약 1 µg의 단선 DNA와 SK primer(Stratagene) 또는 T3 primer(Stratagene)를 이용하여 Sanger 등(1977)의 방법으로 부분 염기서열 결정 후 DNASIS 프로그램으로 GenBank 데이터 베이스에서 DNA 상동성을 검색하였다.

염기서열 및 연역 아미노산의 hydrophathy 분석

차별화 선별된 cDNA 클론의 염기서열을 분석하기 위해 Exo/Mung bean nuclease deletion kit (Promega)를 이용하여 deletion set을 작성하였다. 염기서열 분석은 dideoxy chain termination 방법(Sanger 등, 1977)에 의해 Sequenase version 2.0 kit(United States Biochemical Co.)로 실시하였다. 약 0.5~1.0 µg의 단선 DNA를 1.5 µl T3 primer(Stratagene, 5'-AATT-AACCCTCACTAAAGGG-3', 20-mer, 3.125 ng/µl)와 2.0 µl 5×sequenase buffer를 넣고 70°C에서 2분간 변성 후, primer와 주형 DNA가 annealing 될 수 있도록 35°C 이하로 온도를 서서히 낮춰주었다. 그리고, 2.0 µl dGTP(혹은 7-deaza-dGTP, dITP) labeling mixture와 1.0 µl 0.1 M DTT(dithiothreitol), 0.5 µl [α -³⁵S]dATP(10 mCi/ml) 혹은 [α -³²P]dATP(10 mCi/ml)와 2.8 units의 sequenase를 넣고, 상온에서 반응시켰다. 상기 방법으로 수행한 반응물을 ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP가 들어 있는 정지 혼합액에 각각 3.5 µl씩 분주하여, 37°C에서 5분간 종결 반응시켰다. 그리고, 여기에 4.0 µl의 stop buffer를 넣고 염기서열 분석용 겔에 전개하여 염기서열을 결정하였고, 아미노산 서열을 연역하였다. 연역된 아미노산 서열의 hydrophathy 분석(Kyte와 Doolittle, 1982)은 PROSIS 프로그램을 이용하여 수행하였다.

Baculovirus 전이벡터 제작

Nuecin 유전자의 해독 개시 코돈을 포함하는 sense primer(5'-CGGG ATCCATGTCCAAGAG-3', 19-mer)와 해독 종결 신호를 포함하는 antisense primer(5'-CGGAATTC TTAGAAGAATTCG-3', 22-mer)

를 합성하여 open reading frame을 포함하는 DNA 절편을 증폭시킨 후, pGEMT vector(Promega)에 삽입하였으며, 이 재조합 플라스미드를 pGEMT-nuecin으로 명명하였다. pGEMT-nuecin의 BamHI/EcoRI DNA 절편을 pBacPAK8(Clontech)의 BamHI/EcoRI 위치에 삽입하여 재조합 baculovirus 전이벡터 pBac-PAK8-nuecin을 작성하였다.

재조합 바이러스 제작

Nuecin 유전자가 도입된 재조합 바이러스를 생산하기 위해, 재조합 전이벡터(pBacPAK8-nuecin) 500 ng과 Bsu36I로 절단한 BacPAK6 viral DNA(Clontech)를 혼합하고 lipofectin(Gibco)을 동량첨가하여 상온에서 15분 반응시켰다. 그리고 35 mm² 세포배양용 접시에 분주한 1.0×10^6 개의 Sf9 세포에 상기 혼합물을 접종하여 27°C에서 5시간 transfection하고, 새 배양액으로 교체한 후 27°C에서 5일간 배양하였다.

재조합 바이러스(vAc-nuecin)의 선별은 plaque assay 방법(Summers와 Smith, 1987)으로 행하였다. 곤충 세포의 배양액을 10^{-4} ~ 10^{-8} 으로 한계 희석하여 1.5×10^6 세포를 포함하고 있는 well에 접종한 후, 최종농도 120 µg/ml의 X-gal이 포함된 Seaplaque agarose(FMC)를 도말하고, 27°C에서 배양하면서 X-gal로 염색되지 않는 plaque의 재조합 바이러스를 선별하였다. 선별된 재조합 바이러스는 Sf9 세포에 재접종하여 증식시킨 후 4°C에 보관하면서 실험에 공시하였다.

재조합 바이러스 DNA 분리 및 Southern blot

바이러스 DNA의 분리는 Summers와 Smith(1987)의 방법에 따라서 재조합 바이러스를 접종한 세포 배양액을 2,000 rpm, 10분간 원심한 후 그 상청액을 다시 30,000 rpm, 1시간 동안 원심하여 침전물을 수집하였다. 그리고 침전물에 SDS를 1%, proteinase K를 0.5 mg/ml(Sigma) 농도가 되도록 첨가하여 37°C에서 4시간 이상 처리하였다. 그 후 동량의 phenol/chloroform-isoamylalcohol(24:1)을 가하여 섞은 뒤 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상청액을 수집하였다. 여기에 2배량의 냉에탄올을 가하고 15,000 rpm으로 15분간 원심하여 DNA를 침전시키고, 70% 에탄올로 세척하고 건조하여 3차 증류수에 녹여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Nuecin 유전자의 Southern blot 분석 (Sambrook 등, 1989)은 먼저 제한효소가 처리된 재조합 바이러스 DNA를 agarose 전기영동한 후, 상온에서 변성용액 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)으로 15분간 침지하고, 중화용액 (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl)으로 15분간 중화시켰다. 중화시킨 겔을 20×SSC 용액 (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate)으로 나일론 막에 capillary 전이시킨 후, UV crosslinker로 DNA를 고정시켰다. 처리된 막을 biotin 표지 nuecin cDNA를 탐침으로 반응시킨 후, Southern-Light Chemiluminescent Detection System (TROPIX, Inc.)으로 확인하였다.

전체 RNA 분리 및 Northern blot

재조합 바이러스를 Sf9 세포에 접종한 후, 1일 간격으로 4일간 세포를 회수하여 전체 RNA를 분리하였다. 전체 RNA 분리는 RNAgents Total RNA Isolation System (Promega)을 이용하여 분리하였으며, 분리한 전체 RNA는 1.2% formaldehyde agarose 겔에 전기영동하고 나일론 막에 전이시킨 후, biotin 표지 nuecin cDNA를 탐침으로 Northern blot을 수행하였다 (Sambrook 등, 1989).

SDS-PAGE

재조합 바이러스 접종 후 3일간 1일 간격으로 세포를 회수하여 단백질 전기영동 (Laemmli, 1970)을 수행하여 nuecin 단백질의 세포내 발현을 확인하였다. 재조합 바이러스가 접종된 세포를 모아서 2,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤, 침전된 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척하고, 2배 농도의 단백질 시료 용액 (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 혼합하였다. 그리고 100°C에서 5분간 가열한 후, 전기영동은 12.5% SDS-polyacrylamide 겔에서 수행하고, Coomassie brilliant blue로 염색하였다. 또한 배지내로 분비된 성숙 nuecin의 분석은 재조합 바이러스가 감염된 세포를 무혈청배지 (Sf-900, Gibco)에서 3일, 4일 및 5일 동안 배양한 후, 그 각각의 배양배지를 수집하고 Centricon-10 (Amicon)으로 농축하여 Laemmli (1970) 방법의 겔에 urea를 첨가하여 crosslinkage에 변화를 주는 방법 (Ito 등, 1980)으로 urea-SDS phosphate PAGE를 수행하였다.

Inhibition zone assay

항세균 활성은 재조합 바이러스 (vAc-nuecin)를 Sf9 세포에 감염시킨 후 4일 경과된 세포 배양액 40 ml (0.5×10⁶ cells/ml, 접종농도 1 MOI)을 농축한 후 inhibition zone assay 방법 (Lambert 등, 1989)으로 검정하였다. 멸균 petri dish (87×15 mm)에 대수기의 세균 (2×10⁵/ml)이 포함된 아가배지 (1% nutrient agar, pH 7.2)를 5 ml씩 분주하여 응고시켰다. 여기에 직경 6.1 mm paper disc (Whatman 3 MM)를 놓고 각 disc당 농축된 세포 배양액 (0.4, 0.8 및 1.2 μg nuecin)을 적하하고 37°C에서 배양한 후, 형성된 생장 억제 환 (clear zone)의 크기를 측정하였다. 항세균성 검정을 위한 대상 균주로는 그람 음성 세균 4종 (*E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *X. campestris* pv. *citri*)과 그람 양성 세균 4종 (*Bacillus megaterium*, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Nuecin cDNA의 염기서열

면역 유도 후 발현량이 증가하는 유전자를 선발하고 부분염기서열 분석 및 데이터베이스 검색에 의해 *H. cecropia*의 attacin 유전자와 상동성을 보이는 BmInc6 클론을 선발하였다. 전체염기서열 결정 결과, BmInc6 cDNA는 전체 크기가 852 bp이며, 35번째 염기에서 개시되어 679 위치에서 종결되는 open reading frame을 가지고 있고, 812번째 위치에 잠정 전사 종결 신호인 'AATAAA'가 존재함을 알 수 있었다. BmInc6 cDNA의 염기서열에 의해 214개의 아미노산을 번역하였으며, BmInc6 유전자에 의해 번역되는 항세균성 단백질을 nuecin으로 명명하였다 (GenBank, AF005384) (Fig. 1).

또한 번역한 아미노산을 PROSIS 프로그램을 이용하여 hydropathy를 분석하였다 (Fig. 3). 그 결과 nuecin은 친수성이 더 강한 단백질이며, N-말단의 약 20개의 아미노산으로 구성된 signal 펩타이드가 강하게 소수성을 나타냄을 알 수 있었다.

Sugiyama 등 (1995)이 누에로부터 분리한 attacin 유사 펩타이드 (Bmatt)는 cDNA 크기가 846 bp이고, *H. cecropia*의 산성 attacin과는 70.4%, 염기성 attacin과는 68.3%, *S. peregrina* sarcotoxin IIA와는 18.8%의 아미노산 상동성을 보였다. 한편, nuecin은 산성 att-

acin과는 65.0%, 염기성 attacin과는 61.3% 염기 상동성을 보였고, 아미노산 수준에서는 산성 attacin과는 70.3%, 염기성 attacin과는 68.2%, sarcotoxin IIA와는 26.2%의 상동성을 보였다. 또한, nuecin은 Sugiyama 등(1995)의 attacin 유사 펩타이드와 염기 및 아미노산 수준에서 각각 97.6%와 98.1%의 높은 상동성을 보였지만 (Fig. 2), nuecin은 attacin family에 속하는 새로운 유전자임을 알 수 있었다.

Nuecin 유전자를 포함하는 재조합 baculovirus 제작

Nuecin 유전자를 포함하는 재조합 baculovirus 제작을 위한 재조합 전이 벡터 제작은 우선 pBlue-script SK- 벡터에 삽입된 BmInc6 유전자의 open reading frame을 포함한 약 640 bp의 PCR 산물을 pGEMT 벡터에 클로닝하였다. 또한 선발한 재조합 pGEMT-nuecin DNA를 *BamH I/EcoR I*으로 절단하

```

      1 CAGTCAACAG ACAAGTAATA CGACACAGAT CAAGATGTCC AAGAGTGTAG CGTTGTTGTT
     61 GTTGTGCGCG TGCTTGGCGA GCGGTAGACA CGTGCCGACA CGTGCGCGGA GACAAGCCGG
    121 CAGCTTCACA GTGAACTCGG ATGGAACCTC CGGGGCCGCC CTGAAGGTCC CTCTACCGG
    181 CAACGACAAG AACGTACTCA GCGCCATCGG GTCCGCCGAC TTCAACGACC GCCACAAGCT
    241 CAGCGCCGCC TCCGCAGGGC TCGCTCTGGA CAATGTAAAC GGGCACGGGC TGAGCCTGAC
    301 CGGGACCCGC ATTCCCGGCT TCGGGGAGCA GCTCGGCGTC GCAGGCAAGG TCAACTTGTT
    361 CCACAATAAC AACCACGACC TGAGCGCAA GGCCTTCGCG ATCAGGAATC CGCCAGCGC
    421 CATTCCCAAC GCGCCCAACT TCAACACGCT GGGCGGCGGA GTGGACTACA TGTTCAAACA
    481 GAAGGTGGGC GCATCGTTGA GCGCCGCGCA CTCTGACGTC ATCAACCGGA ATGACTACTC
    541 GGCCGGGGGT AAGCTGAACC TGTTCCGATC TCCGTCCAGC TCGCTCGACT TCAACGCCGG
    601 CTTCAAGAAG TTTGATACGC CTTTTTACAG ATCTTCGTGG GAGCCCAATG TGGGATTCTC
                                     ***
   661 CTTCTCGAAA TTCTTCTAAA AAGTATTATG CGAAAGCAGT AAAATCATAA ATTCCCTTTC
   721 AATATTCTAA CATAAGGATT TAATTATAGT TTAGATATTA TAATCTTGCG CACAAATTTT
   781 AATAATACTC ATGTCAGTA CTGCCTTATC A [REDACTED] GAA CCAATTAATAA ATTAATAAAAA
   841 AAAAAAAAAA AA
  
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the nuecin cDNA. Translation start, stop codon and poly A signal are indicated with an arrow, an asterisk, and a shadow box, respectively (GenBank, AF005384).

Nuecin	MSKSVALLLLCACLASGRHVPTRARRQA-GSFTVNSDGTSGAALKVPLTGNDKNVLSAIGS
Bmatt	
Basic attcin	LVEEPGYDYKQYEEQPQQW NS V AL I VV I ENHKF
Acidic attacin	LIVSEPVYYYIEHYEPELASS V D H AL L VV FA IV
Sarcotoxin II A	GIDFKPQLSSSSLALQGDRLGASISRDV-NLGVSDTLTKSVSANRFRNDNHNRDNSVFRSD
Nuecin	ADFNDRHKLSAASAGLALDNVNGHLSLTGTRIPGFGEQLGVAGKVNLFHNNN--HDLSAKA
Bmatt	N N
Basic attcin	V LTNQM G T Y AT K H DKMTA D F
Acidic attacin	V LT Q G T V I D H DKMTA V D IT
Sarcotoxin II A	VRQNGFNFKQKTGGM DYSFA F NAGL FS I N AT G YST RS DGLTS K N
Nuecin	FAIRNSPSAIPNAPNFNTLGGGVDMFKQKVGASLSAAHSDVINRNDYSAGGKLNLFKSP
Bmatt	
Basic attcin	TK MN- QV V A D I AN T F L KT
Acidic attacin	T M -D A V V I D I A T F LD KD
Sarcotoxin II A	GGSQWLSGPFA QRDY-SF L LSFNAWRG
Nuecin	SSSLDFNAGFKKFDTPFYRSSWEPNVGFSFSKFF
Bmatt	LL
Basic attcin	TT W FK STS Y
Acidic attacin	DT I MK L Y
Sarcotoxin II A	

Fig. 2. Comparison of the amino acid sequences of nuecin and several attacin family. Differences in amino acid sequence are represented under the nuecin sequence. Blanks denote identical amino acid.

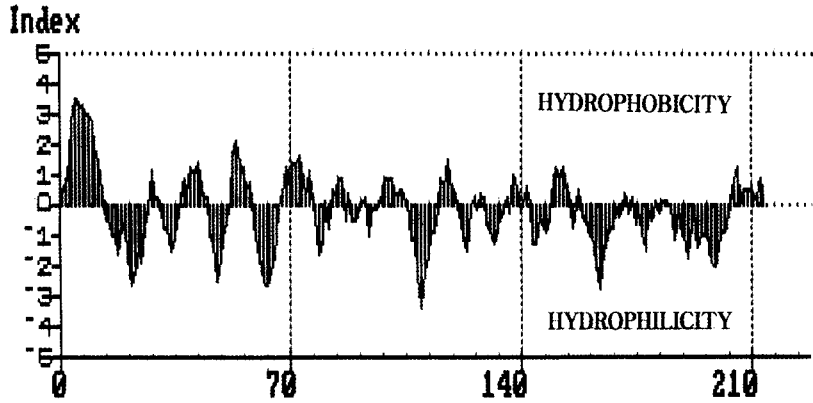


Fig. 3. Hydropathy analysis of the putative nuecin protein. Hydropathy plot was carried out by the method of Kyte & Doolittle (1982).

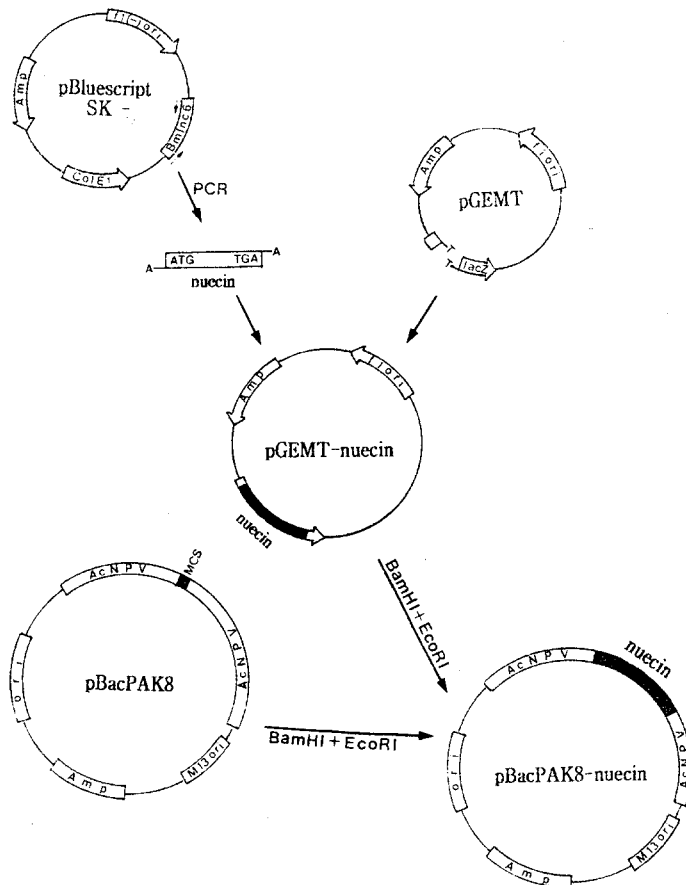


Fig. 4. Construction of the recombinant expression vector, pBacPAK8-nuecin. The region for open reading frame of the nuecin gene was amplified by the polymerase chain reaction with specific primers. The PCR product was cloned into the pGEMT vector, the nuecin gene in the vector was, in turn, introduced into the *Bam*HI/*Eco*RI sites of pBacPAK8.

여 *nuecin* 유전자를 분리하고, pBacPAK8의 *Bam*HI/*Eco*RI 위치에 클로닝하여 재조합 전이벡터 pBacPAK8-*nuecin*을 제작하였다(Fig. 4).

이러스 DNA를 곤충 세포주인 Sf9에 동시 감염시켜 *nuecin* 유전자가 야생형 바이러스의 다각체 단백질 유전자의 promoter 하류에 도입된 재조합 바이러스(vAc-*nuecin*)를 선별하였다. 재조합 여부 확인을 위

재조합 전이벡터(pBacPAK8-*nuecin*)와 야생형 바

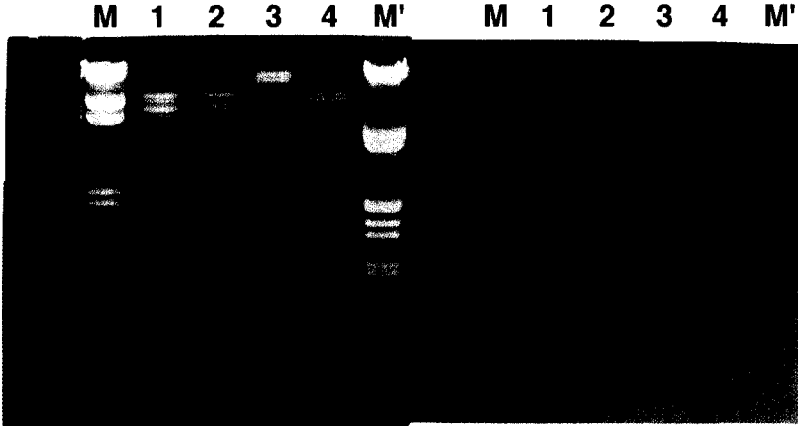


Fig. 5. Southern blot analysis of the recombinant baculovirus, vAc-*nuecin*. Viral DNAs were extracted from wild type virus (lane 1) and recombinant virus, vAc-*nuecin* (lane 2, 3 and 4). Viral DNAs digested with restriction enzymes *Eco*RI (lane 1 and 2), *Bam*HI (lane 3) or *Bam*HI/*Eco*RI (lane 4), were electrophoresed (left panel), electroblotted and hybridized with biotin-labeled *nuecin* cDNA probe (right panel). Lane M, λ -*Hind*III marker; Lane M', λ -*Eco*RI/*Hind*III marker.

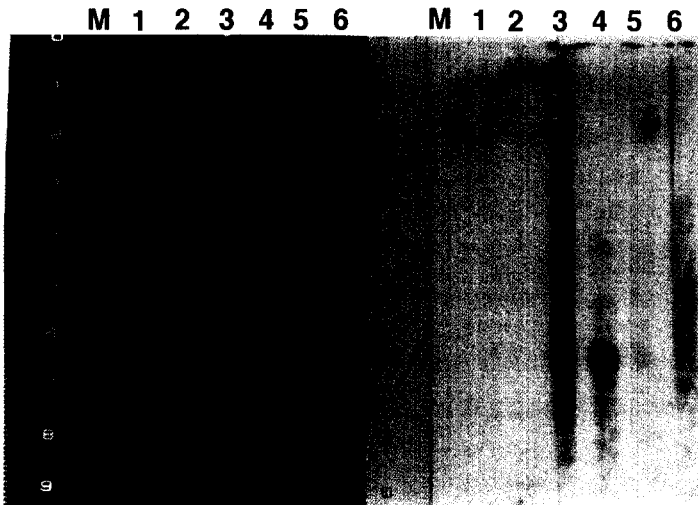


Fig. 6. Northern blot analysis of the Sf9 cells infected with recombinant baculovirus, vAc-*nuecin*. Total RNA was extracted from vAc-*nuecin* at 24 (lane 3), 48 (lane 4), 72 (lane 5) and 96 (lane 6) hrs post-infection, and electrophoresed on a 1.2% formaldehyde denaturing agarose gel (left panel). The agarose gel was transferred on the nylon membrane and then hybridized with a biotin-labeled *nuecin* cDNA probe (right panel). Lane M, RNA size marker; Lane 1, total RNA from uninfected Sf9 cells; Lane 2, total RNA from Sf9 cells infected with wild type virus.

해 선발한 재조합 바이러스의 DNA를 추출하고 *EcoR* I, *BamH* I 및 *BamH* I/*EcoR* I 제한효소를 처리한 후 nuecin cDNA를 탐침으로 Southern blot 분석을 수행하였다(Fig. 5). 그 결과 *EcoR* I을 처리한 재조합 바이러스 DNA의 경우 약 4.3 kb, *BamH* I을 처리한 경우에는 약 2 kb, 그리고 *BamH* I/*EcoR* I을 처리한 경우에는 약 0.6 kb에서 각각 탐침과 결합된 밴드를 확인하였다. 그러나 대조구로 사용한 야생형 바이러스(BacPAK B6)의 DNA에서는 밴드를 확인할 수 없었으므로, 재조합 바이러스는 nuecin 유전자를 포함하고 있음을 알 수 있었다.

곤충세포주에서 nuecin 단백질의 발현

곤충세포주에서 nuecin 유전자의 전사체를 분석하기 위하여, 재조합 바이러스를 감염시킨 Sf9 세포주로부터 전체 RNA를 분리한 후 nuecin cDNA를 탐침으로 Northern blot을 수행하였다(Fig. 6). 그 결과 nuecin 유전자의 주 전사체는 약 950 bp 정도의 크기를 확인할 수 있었다.

Nuecin 단백질의 세포내 발현을 확인하기 위해 nuecin 유전자가 도입된 재조합 바이러스를 곤충 세포에 감염시킨 후 1일 간격으로 3일간 세포를 수집하여 SDS-PAGE를 수행한 결과, 세포내에서 발현된 nuecin의 분자량은 약 23 kDa이었다(Fig. 7). 이는

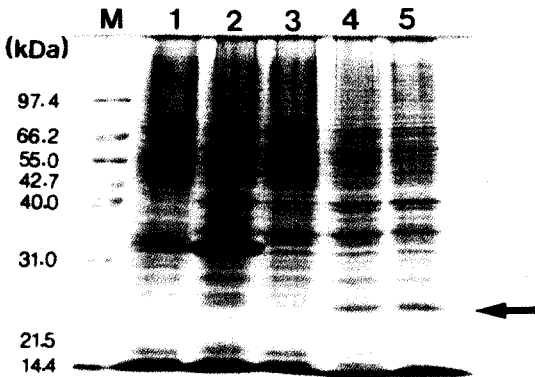


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of nuecin. The mock-infected Sf9 cells (lane 1) and Sf9 cells infected with wild type AcNPV (lane 2) or recombinant virus, vAc-nuecin were harvested at 24 (lane 3), 48 (lane 4) and 72 (lane 5) hrs postinfection. Total cellular lysates were extracted from Sf9 cells and then analysed by 12.5% SDS-PAGE. Lane M, mid range protein size marker. An arrow indicates prepro nuecin protein.

연역된 아미노산에 의해 추정되는 signal 펩타이드를 포함한 nuecin 전구체의 분자량과 일치하였다. 따라서, 세포내에서는 nuecin 전구체의 발현이 확인되었으며, nuecin 전구체는 감염 24시간부터 나타나기 시작하여 48~72시간 경과시 최고로 발현함을 확인할 수 있었다. 또 signal 펩타이드가 절단된 성숙 nuecin을 분석하기 위하여, 무혈청 배지를 사용하여 재조합 바이러스를 접종한 후 3, 4, 5일 경과된 세포 배양액과 대조구로 정상 세포와 야생형 바이러스를 접종한 세포 배양액들을 각각 농축한 후, urea-SDS phosphate PAGE를 수행한 결과, 세포내에서 발현된 nuecin 분자량에 비해 약 3 kDa이 감소된 약 20 kDa의 밴드를 확인하였다(Fig. 8). 이러한 결과로부터 nuecin은 세포내에서 해독 후 변형 (post-translational modification) 과정에 의해 signal 펩타이드가 arginine-arginine을 인식하는 효소에 의해 제거된 후 N-말단의 glutamine이 pyroglutamyl로 전환되면서 활성을 띠는 (Pfeffer와 Rothman, 1987; Gunne 등, 1990) 성숙 nuecin이 세포외로 분비되는 것으로 추정할 수 있었다. 그리고, 세포외로 분비된 성숙 nuecin의 발현량을 측정한 결과, 세포 배양액 1 ml당 약 2 μg의 nuecin 단백질이 분비됨을 알 수 있었다.

Nuecin 단백질의 항세균 활성

곤충 세포내에서 발현되어 세포외로 분비된 성숙 nuecin 단백질의 항세균 활성과 스펙트럼을 조사하기 위하여, 수종의 그람 음성 및 양성 세균에 대한 inhibition zone assay는 각종의 검정용 세균이 함

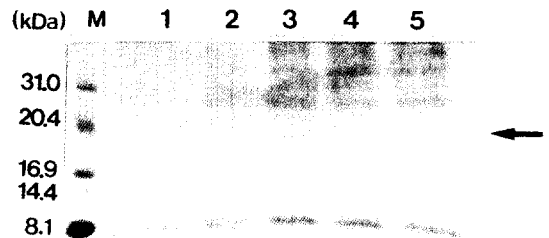


Fig. 8. Urea-SDS phosphate PAGE analysis of the mature nuecin. The mock-infected Sf9 cells (lane 1) and Sf9 cells infected with wild type AcNPV (lane 2) or recombinant virus, vAc-nuecin were harvested at 3 (lane 3), 4 (lane 4) and 5 (lane 5) days postinfection. The concentrated culture media were analysed by 15% urea-SDS phosphate PAGE. An arrow indicates the mature nuecin.

유된 LB 배지상의 3MM paper에 약 0.4, 0.8 및 1.2 μg 의 nuecin을 접종한 후, 37°C에서 16시간 배양하여 형성된 억제환의 크기를 조사하였다(Fig. 9). 그 결과, 그람 음성 세균의 경우는 혐기성 세균인 *E. coli*와 *E. chrysanthuemi*에는 항세균 활성이 높았으나, 호기성 세균인 *Xanthomonas*속의 *X. campestris pv. citri*에서는 비교적 활성이 낮았으며, *X. campestris pv. oryzae*에 대한 활성은 관찰되지 않았다. 그람 양성 세균 중에서는 토양과 고초(枯草)에 널리 분포하면서 밥 등 부패의 원인균이 되는 *B. subtilis*에 대한 활성이 가장 높았다. 그리고, 장독소(enterotoxin)를 생산하여 식중독을 유발하는 *S. aureus*와 병원성이

없는 *B. megaterium*에는 비교적 높은 활성을 나타내는 반면 곤충류에 병원성을 나타내는 *B. thuringiensis subsp. kurstaki*에서는 활성을 나타내지 않았다.

이상의 결과로 볼 때, 새로운 항세균성 단백질인 nuecin은 DNA와 연역 아미노산의 상동성 분석 결과 그 유전자는 attacin family에 속하나, *H. cecropia*의 attacin이 한정된 그람 음성 세균에만 활성을 나타내는데 비하여(Engström 등, 1984), nuecin은 그람 음성 세균에 대한 활성은 물론 그람 양성 세균에 대해서도 항세균 활성을 나타내므로, 보다 넓은 항세균 활성 스펙트럼이 관찰되었다.

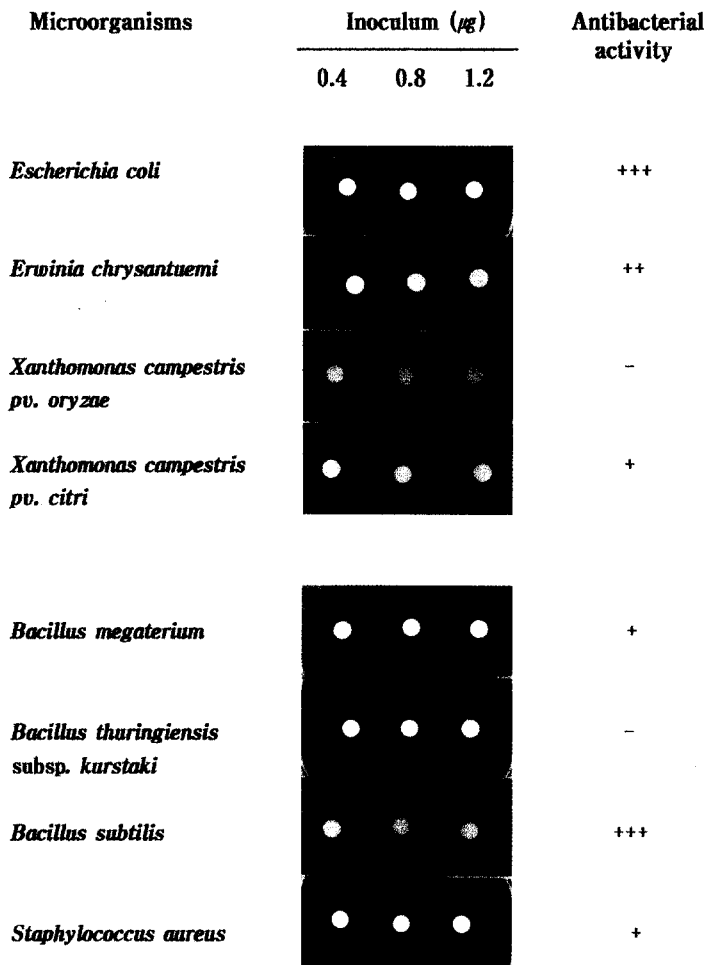


Fig. 9. Antibacterial activity of the mature nuecin. The antibacterial activity was determined by the clear zone size of 1.2 μg inoculum in the inhibition zone assay as follows: +, 10 to 15 mm; ++, 15 to 20 mm; +++, above 20 mm; -, no inhibition.

인용문헌

- Ando, K. and S. Natori. 1988.** Molecular cloning, sequencing, and characterization of cDNA for Sarcotoxin IIA, an inducible antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochemistry*. **27**: 1715-1721.
- Boman, H.G. and H.G. Hultmark. 1981.** Cell free immunity in insects. *Trends Biochem. Sci.* **6**: 306.
- Boman, H.G. and D. Hultmark. 1987.** Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 103-216.
- Carlsson, A., P. Engström, E.T. Palva and H. Bennich. 1991.** Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. *Infect. Immuno.* **59**: 3040-3045.
- Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck and P. Tempst. 1989.** Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* **8**: 2387-2391.
- Dimarcq, J.L., E. Keppi, B. Dunbar, J. Lambert, J.M. Reichhart, D. Hoffmann, S.M. Rankine, J.E. Fothergill and J.A. Hoffmann. 1988.** Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A. *Eur. J. Biochem.* **171**: 17-22.
- Dunn, P.E. 1986.** Biochemical aspects of insect immunology. *Annu. Rev. Entomol.* **31**: 321-329.
- Engström, P., A. Carlsson, A. Engstrom, Z.T. Tao and H. Bennich. 1984.** The antibacterial effect of attacins from the silkworm *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *E. coli*. *EMBO J.* **3**: 3347-3351.
- Gunne, H., M. Hellers and H. Steiner. 1990.** Structure of preproattacin and its processing in insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Eur. J. Biochem.* **187**: 699-703.
- 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.
- Ito, K., T. Date and W. Wickner. 1980.** Synthesis, assembly into cytoplasmic membrane, and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein. *J. Biol. Chem.* **255**: 2123.
- Kanai, A. and S. Natori. 1990.** Analysis of a gene cluster for Sarcotoxin II, a group of antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6114-6122.
- Kim, S.H., Y.H. Je, E.Y. Yun, S.W. Kang, K.Y. Kim and S.K. Kang. 1996.** Isolation and characterization of inducible genes from *Bombyx mori* injected with *E. coli* by differential screening. *Korean J. Seric. Sci.* **38**: 19-24.
- Kyte, J. and R.F. Doolittle. 1982.** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lambert, J., E. Keppi, J. Dimarcq, C. Wicker, J. Reichhart, B. Dunbar, P. Lepage, A. Dorsselaer, J. Hoffmann, J. Fothergill and D. Hoffmann. 1989.** Insect immunity. Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 262-266.
- Park, H.Y., S.S. Park, D.S. Park, S.W. Shin and C.K. Joo. 1994.** Bacteria-induced antibacterial peptide, Hyphancin from the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Korean J. Entomol.* **24**: 191-198.
- Pfeffer, S. R. and J. E. Rothman. 1987.** Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and golgi. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 829-852.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* pp. 174-184, Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Simon, S.M. and G. Blobel. 1991.** A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell.* **65**: 371-380.
- Sugiyama, M., H. Kuniyoshi, E. Kotani, K. Taniai, K. Kadono-Okuda, Y. Kato, M. Yamamoto, M. Shimabukuro, S. Chowdhury, J. Xu, S. K. Choi, H. Kataoka, A. Suzuki and M. Yamakawa. 1995.** Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**: 385-392.
- 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.