

## 견사곤충에서 *Mariner* Transposase-like Element의 분자적 동정

이진성 · 황재삼\* · 김용성 · 서동상\*\*†

생명공학연구소 유전체사업단  
\*농촌진흥청 잠사곤충연구소  
\*\*성균관대학교 유전공학과

## Molecular identification of *Mariner* Transposase-like Element from Four Silkmoths

Jin Sung Lee, Jae Sam Hwang\*, Yong Sung Kim\*, and Dong Sang Suh\*\*†

Genome center, Korea research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejon, 305-600, Korea

\*National Sericulture & Entomology Research Institute, R. D. A., Suwon 441-100, Korea

\*\*Dept. of Genetic Engineering, SungKyunKwan Univ., Suwon 440-746, Korea

### Abstract

As a first step for developing universal genetic transformation vector of silkmoths, we identified the presence of *mariner*-like element(MLE) which is one of transposable element discovered from many of insects to human species, from *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*, *Antheraea yammamai* and *Antheraea pernyi*. We used a degenerative primer pair designed from a transposase gene of *Drosophila mauritiana* and *Hyalophora cecropia* MLE. As results, major PCR product of 500bp expected as a part of transposase of MLE was detected from all the silkmoths used of this study using these primer. And hybridization assay using pBmoMAR as a probe DNA that was previously cloned from *Bombyx mori* by the same primer pair, confirmed the presence of MLE from all the silkmoths. This assay showed also that the endogenous MLE in genome of the silkworm is present as high copy number unlikely *Drosophila mauritiana* which has 10-20 copy number. This data will be a fundamental genetic information for developing *mariner*-derived vector to transform the silkmoths and other useful insects.

*Key words* : *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*, *Antheraea yammamai*, *Antheraea pernyi*, MLE

### 서 론

Transposable element는 모든 진핵세포의 genome 내에서 발견되는 이동성 유전자를 통칭해서 일컫는 말이다<sup>1, 2)</sup>. 따라서 이들 genetic mobile element의 분자적 이용은

gene mapping 뿐만아니라 생식세포내로 외래 유전자의 도입 및 형질전환 생물계를 위한 훌륭한 vector system으로 이용될 수 있다. 이들 중 *P element*는 *Drosophila*에서만 유일하게 gene transfer system이 확립되어 다양한 연구가 보고 되고 있다<sup>3)</sup>.

† Corresponding author

약 1.5kb 정도의 *Mariner* transposable element는 전이에 필수적인 transposase를 coding하는 한개의 open reading frame과 숙주 genome의 insertion 및 excision에 필요한 short inverted terminal repeat element로 구성되어 있다(Fig. 1)<sup>4)</sup>. 최초로 *Drosophila mauritiana*에서 발견된 이후, *mariner* element는 insecta 뿐만 아니라 arthropode 그리고 인간에서 기능적으로 아주 유사한 형태, 즉 *mariner*-like element(MLE) 라는 명칭으로 폭넓게 존재하고 있다<sup>5)</sup>. 따라서 *mariner* element는 다양한 생물종, 특히 산업적으로 중요한 곤충에서 gene transfer system의 개발을 위한 target molecule이 되고 있다. 이것은 *mariner* element가 *D. melanogaster*로 germ line transformation을 매개할 수 있다는 Lidholm의 연구에서도 그 가능성이 입증되고 있다<sup>6)</sup>.

견사곤충, 즉 누에(*Bombyx mori*), 작잠(*Antheraea pernyi*), 천잠(*Antheraea yamami*)은 인간에게 silk를 제공하는 유용한 산업곤충이다. 견사곤충중 누에는 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)와 함께 곤충중에서 다양한 유전적, 생리학적, 육종학적 연구가 많이 이루어진 곤충이며, 현재까지 약 400종류 이상의 형태적 돌연변이가 알려져 있다<sup>7)</sup>. 그러나 초파리의 *P element*에 상응할만한 외래 유전자 도입계에 관한 연구는 아직 초보적인 수준이다. 이것은 누에에서 효율적으로 작동하는 vector system이 개발되지 못하였기 때문으로 여겨진다. 본 저자들은 앞서서 누에에서 한 종류의 MLE를 cloning(BmoMAR) 하였다. 이것은 누에에서도 이들 전이인자들이 존재한다는 것임을 암시하는 것이다. 그러나 현재 천잠, 작잠 그리고 누에의 지리적 품종내에서도 이들 전이인자가 존재한다는 보고는 없다. 그러므로 이들 견사곤충간의 MLE의 존재 여부는 앞으로 이들 곤충에서 종 특이적인 유전자의 형질 전환계 또는 곤충 발현계에 관한 연구를 위해서는 우선적으로 탐색될 과제라 사료된다.

따라서 본 연구는 MLE가 공통적으로 가지고 있는 transposase 유전자의 보존 부위를 coding하는 primer를 이용하여 견사곤충에서 *mariner*-like element(MLE)의 존재여부를 탐색하여 이들의 vector 개발에 대한 연구자료를 얻고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### Genomic DNA Isolation

견사곤충의 genomic DNA는 Suzuki<sup>9)</sup>의 방법을 일부 변

형하여 분리하였다. 시료는 시료무게 2.5배의 DNA 추출용 완충액[0.5% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate), 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.1 M NaCl, 10 µg/ml의 proteinase K]을 첨가한 후, 유리균질기로 마쇄하여 37°C에서 15분 반응시킨 다음, 2 ml의 1 M Tris-HCl(pH 7.5)과 3 ml의 phenol을 가하여 천천히 혼합, 저온원심(5,000, 5°C)후 상등액을 모으고 2회의 phenol/chloroform추출 후 3배의 salted ethanol (2% potassium acetate 포함)을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 유리봉으로 모아 TE 완충용액(20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA)에 녹인 후 다시 3배의 salted ethanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 70% ethanol에 washing한 후 건조시켜 1 ml의 TE 완충액을 가한 다음, 10 mg/ml이 되도록 RNaseA를 처리하였다. 37°C에서 2시간 반응시킨 후 phenol/chloroform으로 2회 추출하고 salted ethanol (2% potassium acetate 포함)로 DNA를 침전시켜 70% ethanol에 washing한 다음 건조시켜 TE 완충액에 녹여 실험용 genomic DNA로 사용하였다.

### PCR amplification

*Mariner* like element(MLE)의 동정을 위한 primer는 *Drosophila mauritiana*와 *Hyalophora cecropia*의 *mariner* element의 고도로 보존된 amino acid의 퇴화성 염기서열인 MAR124F(5'-tgggtncncaygaryt-3')와 MAR276R(5'-ggngcnarrtngngswrta-3')를 사용하였으며, PCR 반응은 다음과 같이 수행하였다. 25 µl 용량에 대해 DNA 30 ng, dNTP mixture(Promega, USA) 200 µM, 각 primer 400 nM를 첨가해서, 95°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 다음 *Taq* DNA polymerase(Bioneer, Korea) 0.5 unit를 첨가한 다음, 95°C에서 30초, 50°C에서 60초, 72°C에서 1분 동안의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycles 반응후, 72°C에서 5분간 last extension하였다. 5 µl의 PCR product를 1.0% agarose gel(Sigma)에 loading하여 0.5X TBE 완충용액(0.0045M Tris-borate, 0.001M EDTA pH 8.0)에서 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색, UV하에서 사진 촬영하였다.

### Southern hybridization

견사충 genomic DNA 10 µg을 *EcoRI*과 *BamHI*으로 6

시간 이상 처리한 후, 0.8% agarose gel에서 5 V/cm로 전기영동을 하여 gel을 depurination 용액(0.2M HCl), 변성용액 (0.2M NaOH, 0.5M NaCl) 그리고 중화용액(1.0 M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH7.6)으로 각각 20분씩 2회 처리하고 capillary 방법으로 DNA를 nylon membrane에 transfer하였다<sup>10)</sup>. DNA는 314nm의 UV를 조사(0.7J/cm<sup>2</sup>)하여 고정하고, Dig detection kit(Boehringer Mannheim)의 방법에 준하여 prehybridization solution(5X SSC, 0.02% SDS, 0.1% N-Lauroylsarcosine, 1% blocking reagent)를 첨가하여 65°C에서 2시간이상 반응시킨후, 여기에 Dig으로 labelling된 probe DNA를 넣고 65°C에서 16시간 이상 반응시켰다. 세척은 5X SSC, 0.1% SDS로 실온에서 30분간 2회, 0.5X SSC와 0.1% SDS로 65°C에서 15분간 2회 세척하였다. 발색을 위해서 buffer 1 (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5)으로 세척한 후, 다시 buffer 2(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후 buffer 1에 Dig-antibody를 희석하여 30분간 실온에서 반응시킨 뒤, 다시 buffer 1로 세척하였다. 최종적으로 buffer 3(100 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)으로 equilibration한 후 AMPPD로 발색시켰다.

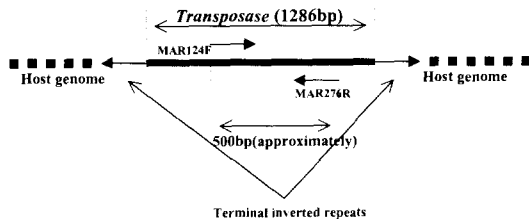


Fig. 1. Schematic diagram of molecular structure of general mariner elements. The bolded line indicates open reading frame(ORF) encoding a transposase. The closed arrows indicate the terminal inverted repeats of the element. The primer, MAR 124F and MAR 276R, is a degenerative primer pair which is designed with contiguous identical amino acids of the *D. melanogaster* and *H. cecropia* elements.

### Probe DNA

Probe DNA(Fig.2)는 본 저자들이 MAR124F와 MAR 276R을 primer로 증폭하여 pGem-T easy vector에 cloning한 pBmoMAR(GeneBank accession number : AB01 3347)를 *EcoRI*으로 절단하여 얻은 제한단편(472bp)을 agarose gel에서 회수하여 Dig DNA labelling kit(Boehringer Mannheim, Germany)의 random primed labelling method에 따라 Digoxigenin-11-dUTP로 표지하여 probe DNA로 사용하였다.

### 결 과

누에에서 *mariner*-like element(MLE)가 존재한다는 것이 보고<sup>12, 13)</sup>된 후, 누에와 같은 *genus*에 속하는 멧누에 및 산 누에 나방과에 속하는 작잠, 천잠에서도 이들의 존재 가능성이 추정되므로, 누에(JAM113), 멧누에, 작잠, 천잠을 재료로하여 MLE의 존재 여부를 PCR 방법에 의한 분자적 동정을 수행하였다. Fig. 3에서 나타나는 것과 같이 이미

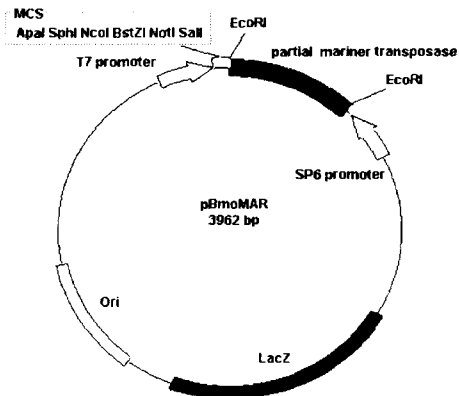


Fig. 2. pBmoMAR used as probe DNA for southern blot analysis. The insert DNA, partial *mariner* transposase gene, is cloned from silkworm strain 74 09 using the primer used this study. The nucleotide sequences of a partial transposase gene will appear in the DDBJ/EMBL/GeneBank databases with the accession number AB013347.

cloning된 BmoMAR를 positive control(lane 5)로 하여 비교해 본 결과, 전체적으로 많은 non-specific PCR product들이 증폭 되었으나, 약 500bp 부근에서 major PCR product가 모든 종에서 관찰되었다. 이들 band가 positive control인 BmoMAR의 크기가 472bp 라는 것과 비교할 때 멧누에(lane 2), 작잠(lane 3) 그리고 천잠(lane 4) 모두 에서 누에(lane 1)에서와 같이 MLE가 존재한다는 것을 알 수 있었다.

또한, 지리적 누에품종인 일본종계(JAM113, JAM119, JAM121, JAM123, JAM125), 중국종계(JAM114, JAM120, JAM122, JAM124, JAM126) 및 유럽종계(Zebra) 를 공시하여 증폭한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 major PCR product가 품종간에 따라 그 선명도가 다르게 관찰되었지만, 전반적으로 모든 지리적 품종에서 MLE가 endogenous하게 존재한다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 또한, annealing 온도 55℃는 50℃에서 보다 더 특이적으로 MLE를 증폭할 수 있음을 보였다.

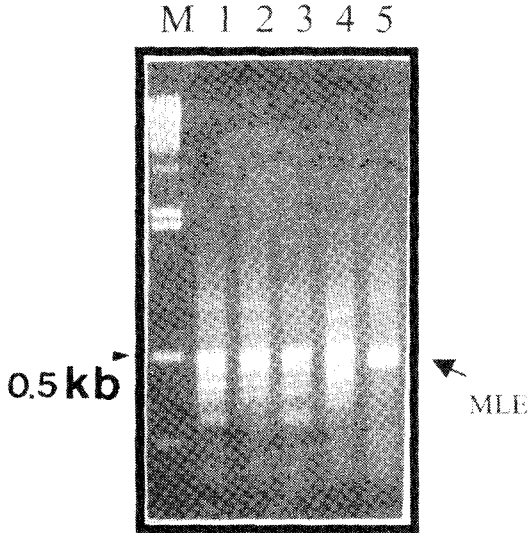


Fig. 3. PCR amplification of *mariner*-like element(MLE) from four silkworms. The lanes are : (M) 1 kb ladder, (1) *Bombyx mori*, (2) *Bombyx mandarina*, (3) *Antheraea yamamai*, (4) *Antheraea pernyi*, (5) pBmoMAR that is positive control for MLE which is amplified with T7 and SP6 promoter-specific primers.

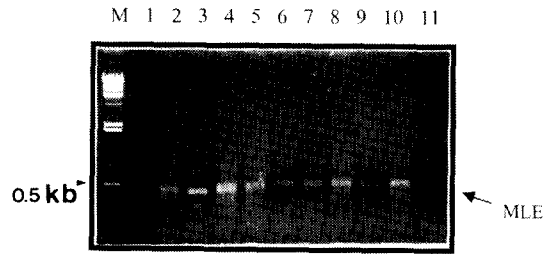


Fig. 4. PCR amplification of MLE from geographical silkworm strains. The lane are : (1) - (5) ; Japanese silkworm strains, JAM111, 113, 115, 117 and 119, (6) - (10) ; Chinese silkworm strains, JAM 112, 114, 116, 118 and 120, (11) ; European silkworm strain, Zebra. The lane M is molecular DNA size marker,  $\lambda$ /HindIII.

작잠 8 계통의 MLE 동정에 대한 PCR 결과, 모든 작잠 계통에서도 MLE가 존재하는 것으로 분석되었다(Fig. 5). 그러나 다른 견사곤충과는 다르게 모든 계통의 작잠에서는 약 1kb 정도에서 선명한 band들이 나타났으며, 예상되는 약 500bp 부위에서는 몇 개의 band들이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 작잠 MLE의 PCR 조건은 누에 지리적 품종에서 MLE 동정을 위한 PCR 반응 조건과 동일하게 수행 한 것임을 비교한다면 작잠에서 이러한 band들의 검출은 이들 genome의 complexity가 다른 견사충의 genome과 상당히 다르거나 본 실험의 primer pair가 상당한 degeneracy를 갖음으로 해서 이와 같은 비특이적인 band가 증폭된 것으로 여겨진다.

한편, 현재까지 보고된 *mariner*의 종간의 copy number 는 *D. mauritiana*와 *Mayetiola destructor*(Hessian Fly)가 20-30 copy의 low copy number를, *H. cecropia*의 *cecropin A* 유전자의 intron 부위에 insertion된 *mariner*는 1000 copy 이상의 high copy가 genome에 존재하는 것으로 보고되고 있다<sup>4, 5, 14</sup>. 이와 같이 견사곤충에서도 MLE의 존재 여부의 확인 및 이들의 genome내 copy number를 분석하는 것은 각 견사곤충의 genome에 존재하는 MLE의 양적인 차이의 정도와 MLE의 horizontal inheritance를 이해하는데 하나의 정보가 될 것이다. 이미 cloning된 pBmoMAR를 probe DNA로 하여 southern hybridization을 수행한 결과, smear 한 일련의 band들이 상당히 많이 관찰되었다(Fig.

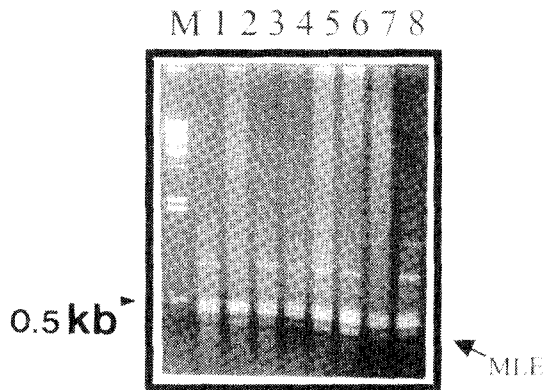


Fig. 5. PCR amplification of MLE from eight *Antherae pernyi*. The lane are : (1) - (8) ; *Antherae pernyi* strains, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7 and O8. The lane M is molecular DNA size marker,  $\lambda$ /*Hind*III.

6). 이것은 앞에서 기술된 결과와 같이 MLE가 공시곤충인 누에, 멧누에, 천잠 및 작잠 모두에 존재한다는 것을 확인시켜 주는 것이며, MLE가 각 견사충의 genome내에 모두 high copy number로 존재한다는 것을 추정할 수 있게 해주었다. 또한 앞으로 보다 정확한 genome내의 copy number는 competitive PCR 등에 의해서 분석될 수 있을 것이다.

## 고 찰

*P element*가 *Drosophila*의 일부 subgroup에서만 발견되는 것<sup>15)</sup>과 대조적으로 *mariner*-like element(MLE)는 거의 모든 진핵생물에서 발견되는 transposable element이다. 이와 같은 의미는 *mariner*가 진핵생물의 유전자 전달을 위한 vector로써 이용될 수 있음을 시사하는 것이라 여겨진다. 이것은 최초로 *D. mauritiana*에서 발견된 *mariner* element인 *Mos1*이 *Drosophila* subgroup의 하나인 *D. melanogaster*의 genome으로 transposition 할 수 있다는 선구적인 연구로부터 이들이 진핵생물 특히, 곤충에서의 universal genetic transformation vector로써 개발을 더욱 더 가능하게 하는 예라고 하겠다. 그러나 현재까지 밝혀진 다양한

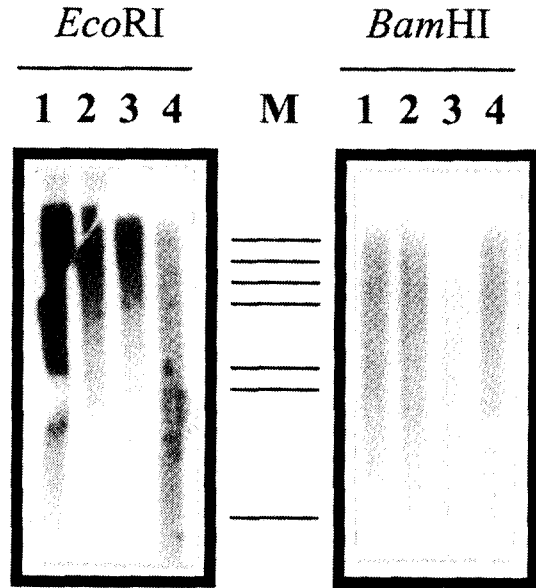


Fig. 6. Southern analysis of four silkworms genomic DNA. 5 ug of *Eco*RI and *Bam*HI digested DNA were loaded in each lane for agarose gel electrophoresis. Probe DNA were pBmoMAR which is cloned from silkworm 7409 strain. Molecular size markers(lane) were phage lambda DNA digested with *Hind*III. The lanes are : (1) *Bombyx mori*, (2) *Bombyx mandarina*, (3) *Antherae yamamai*, (4) *Antherae pernyi*

생물종에서, MLE는 기능적, 즉 전이성을 갖고 숙주에서 자율적으로 이동할 수 있는 것과 이들이 coding하는 transposase 유전자의 frame-shift mutation, 또는 이 유전자 내에서 점 돌연변이에 의해서 전이성 기능을 상실한 비 기능적인 것의 두가지 형태가 함께 다양한 copy로서 발견되고 있다. Robertson은 *D. mauritiana*와 *H. cecropia*의 putative *mariner* transposase 유전자의 높은 보존성 부위에 대한 PCR primer를 개발하여 12종의 insect에서 PCR을 수행하여 각 종에서 8개의 MLE를 cloning하여 각각 8개의 nucleotide 서열과 deduced amino acid의 multi-alignment를 분석한 결과, 각각의 종에 대해서 공통적으로 기능적, 비 기능적인 MLE가 함께 공존하고 있음을 보고하였다<sup>10)</sup>. 이와 같은 이유로 해서 기능적인 *mariner* 유래의 vector 개발은

기능적인 *mariner*의 일차적인 cloning이 수행되어야 가능할 것이다. 본 저자는 이전에 누에에서 472bp로 구성된 partial *mariner* clone을 확보하였다. 이 clone은 *mariner* transposase의 일부로서 5개의 stop codon이 존재하는 비 기능성 *mariner*로 추정되었다<sup>2)</sup>. 결국, *mariner* 유래의 vector 개발은 기능성을 갖는 *mariner* clone이 우선적으로 확보되어야만 가능할 것이다.

현재 견사곤충은 유전학적으로 장점이 많은 곤충이므로 외래 유전자 도입을 위한 host system으로써 이용 가능성이 대두되고 있다. 최근 일본에서는 다양한 전이 vector를 이용하여 그 형질전환 능력에 관한 연구가 진행중이지만, 효율적인 vector system이 개발되지 못함으로 인해서 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있다. 형질전환 vector의 개발을 위해서는 초파리의 *P element*의 경우에서도 볼 수 있듯이, 가장 중요한 것은 host 자체의 endogenous한 mobile element를 modification 또는 manipulation하는 것이 제일 바람직한 것이다. 따라서 새로운 숙주 및 vector계의 개발을 위해서 제일 먼저 수행할 연구는 형질전환 대상 생물 내에 특정 mobile element가 존재하는지의 여부와 이들의 copy number를 분석하는 것일 것이다.

본 연구는 미래의 견사충의 형질전환용 vector 개발을 위한 첫 시도로서 현재 모든 생물, 특히 곤충에서 그 기능적인 전이성 능력이 평가되고 있는 MLE가 견사곤충에서 존재하는 지를 탐색하는 것이 일차적인 목적이다. 앞에서의 결과에서 볼 수 있듯이 MLE가 공시한 모든 견사곤충에서 그 존재가 간접적으로 증명되었으며, 또한 이미 cloning한 pBmoMAR를 probe로 한 southern hybridization 분석에서도 모든 견사충의 genome 내에서 high copy로 존재하는 것이 추정되었다. 이것은 이들 genome내에 기능적인 MLE의 존재 가능성을 암시하는 것이라 여겨진다. 따라서 앞으로의 연구는 기능성 MLE의 cloning 및 특성에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

누에, 멧누에, 천잠 및 작잠에서의 형질전환용 vector 개발을 위한 첫단계로 이미 인간을 포함한 여러 곤충에서 그 존재가 확인된 *mariner* transposable element가 이들 견사곤충에 존재하는지의 여부를 탐색하기 위해서 이미 보고된

*Drosophila mauritiana*와 *Hyalophora cecropia*의 *mariner* transposase 유전자의 고도로 보존성이 높은 부위에 대한 degenerative primer pair를 제작하여 이들의 존재 여부를 탐색하였다. 결과적으로, 예상되는 약 500bp의 PCR product가 관찰됨에 따라서 모든 견사곤충의 genome에는 *mariner*-like element(MLE)가 존재한다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 이것은 이미 cloning된 pBmoMAR를 probe DNA로하여 southern hybridization을 수행한 결과에서도 확인 할 수 있었으며, 각 견사충의 genome 내에 high copy로 존재한다는 것을 추정할 수 있었다. 따라서 이와 같은 결과는 견사곤충에서 MLE가 vector system으로써 개발될 수 있는 기초자료로 제공될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Berg, D. E. and Howe, M. M. : Mobile DNA, American Society of Microbiology(1989).
2. Finnegan, D. J. : Transposable element and DNA transposition in eukaryotes, *Curr. Biol.* 2, 47, 1-477 (1990).
3. Coe L., Kelley, R. and Sprading, A. : Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single *P element*, *Science* 239, 1121-1128(1988).
4. Lidholm, D. A., Gudmundson, G. H. and Bowman, H. G. : A highly repetitive, *mariner*-like element in the genome of *Hyalophora cecropia*, *J. Biol. Chem.* 266, 11518-11521(1991).
5. Medgora, M., Maruyama, K. and Hartl, D. L. : Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in *Drosophila*, *Genetics*, 128, 311-318(1991).
6. Lidholm D. A., Lohe, A. R. and Hartl, D. L. : The transposable element *mariner* mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 134, 859-868(1993).
7. Kafatos, F. C., Louis, C., Savakis, C., Glover, D. M., Ashurer et. al. : Integrated map of *Drosophila* genome(Progress and Prospects), *Trends Genetics*, 7, 155-161(1991).
8. Robertson, H. M, and Zumpano, K. L. : Molecular evolution of an ancient *mariner* transposon, *Hsmar1*, in the human genome, *Gene*, 205, 203-217(1997).
9. Suzuki, y., Takiya, S., Suzuki, T., Hul, C., Matsuno, K., Fukuda, M., Nagata, T. and Ueno, N. : Developmental transition of silk gene expression in the *Bo-*

- mbyx mori*, "In molecular insect science", Plenum press, New York(1990).
10. Robertson, H. M. : The *mariner* transposable element is widespread in insects. *Nature*, **362**, 241-245(1993).
  11. Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis, T. : Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1992).
  12. Lee, J. S., Hwang, J. S., Kim, Y. S., Suh, D. S. and Kwon, O. Y. : Identification of *mariner*-like element (MLE) gene from silkworm, *Bombyx mori*, *Korean J. Life Science*, **8**(3), 285-293(1988)
  13. Robertson, H. M. and Asplund, M. L. : Bmmar1 : a basal lineage of the *mariner* family of transposable elements in the silkworm moth, *Bombyx mori*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26**(8-9), 945-954.
  14. Shukel, R. H. and Russell, V. W. : *Mariner* transposase-sequence from the Hessian fly, *Mayetiola destructor*, *Journal of heredity*, **86**, 364-368(1995).
  15. Torti, C., Gomulski, L. M, Malacrida, A, R., Capy, P. and Gasper, G. : Characterization and evolution of *mariner* elements from closely related species of fruit flies(Diptera : Tephritidae), *Journal of molecular evolution*, **46**, 288-298(1998).