

Mariner-Like Elements (MLEs)를 이용한 누에의 분자적 계통 분석

황재삼[†] · 이진성* · 김영섭** · 성연문***

농촌진흥청 잠사곤충부, *생명공학연구소 유전체사업단
상주대학교 잠사생물학과, *대구보건대학 방사선과

Molecular Phylogenetics of Silkworm (*Bombyx mori*) Based on Mariner-Like Elements (MLEs)

Jae-Sam Hwang[†], Jin-Sung Lee*, Young-Sub Kim** and Yeon-Mun Seong***

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

*Genome Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-600, Korea

**Sangju University, Sangju, Kyungpook 742-711, Korea

***Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Abstract

In order to understand molecular phylogenetics of silkworm (*Bombyx mori*), we analyzed the sequences of BmoMAR isolated from *Bombyx mori* that is partial coding gene of transposase of mariner-like element(MLE). By pairwise comparing nucleotide sequences of BmoMAR with ten previously reported insect MLEs accessed in GeneBank, the average genetic distance was estimated to be 0.4840. The phylogenetics tree constructed from nine insect species except for human MLE(Hsmar1) by UPGMA method indicated that MLEs are divided into three clusters, and *Drosophila maritima* was independently subgrouped. *Bombyx mori*(BmoMAR) was subgrouped with microcaddishfly (*Orthotrichia cristata*), webworm(*Atteva punctella*), almond moth(*Ephesia cautella*), *Hyalopora cecropia* which are lepidoptera. Phylogenetics tree according to UPGMA principle, on the basis of informative nucleotide sequences of nine insect MLEs, indicated that *Bombyx mori* was more closely related to microcaddishfly(*Orthotrichia cristata*) and webworm (*Atteva punctella*) of lepidoptera. We suggest that insect MLEs are a useful key for studying molecular phylogenetics among intra species of insects.

Key words – *Bombyx mori*, Silkworm, BmoMAR, MLE, Phylogenetics tree

서 론

진핵생물부터 하등생물의 genome에 포함되어 자유로이 이동할 수 있는 유전자를 통틀어서 전이인자(transposable

genetic element)라고 불린다[2]. 다양한 종류의 전이인자들 중에서 mariner는 대부분의 곤충에서 발견되는 Class II family 로서 약 1.5kb의 크기를 갖는다[17]. 이미 밝혀진 mariner의 DNA 염기서열 유사성을 비교해보면 이들이

[†] Corresponding author

종간에 서로 유의한 유사성이 발견되고 있으며, 종간에 서로 subfamily로 계통진화 하는 것으로 알려지고 있다[16]. 따라서 mariner 전이인자가 어떻게 진화하는지, 숙주 생물을 통해서 어떤 기작으로 horizontal transfer를 하는지에 관한 진화적 측면에서의 연구가 활발히 진행되고 있다.

Hyalophora cecropia[12]와 *Drosophila mauritiana*[2, 14]의 mariner의 DNA 염기서열을 토대로 상당히 보존된 부위에 대한 primer pair가 작성되고 PCR 기법을 통해 상당히 많은 생물 종들에서 이들 mariner 전이인자의 전이효소를 coding하는 유전자(transposase)와 아주 유사한 DNA 염기서열 유사성을 보이는 mariner-like element(MLE)가 발견되고 있다[1,5-8]. 이들은 종 특이적으로 다양한 copy number를 가지고 있으며, D, D (34) E motif가 비교적 우세하게 보존되는 특징을 가지고 있다[13]. 그러나 나비목(lepidoptera), 특히 누에(silkworm, *Bombyx mori*)에서의 MLE에 관한 연구 및 mariner superfamily에서의 계통 진화적 위치에 관한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 본 저자에 의해서 DNA 염기서열이 결정된 누에 BmoMAR[9, 11]이 DNA 염기서열을 토대로 이미 보고된 다른 곤충의 MLE와의 분자적 계통관계를 이해하고자 수행하였다.

BmoMAR(GeneBank Accession Number: AB013347)은 본 저자들이 mariner 특유의 보존된 amino acid(WVPHLE and YSPDLAP)를 근거로 제작된 degenerative primer pair에 의해서 누에에서 cloning하여 Genebank에 등록된 PCR clone이다. BmoMAR의 DNA 염기서열을 GeneBank에 등록된 인간과 9 종의 곤충(honey bee : L10434, damsel bug : U91362, blister beetle : U91354, deer fly : L10503, *H. cecropia* : L10448, almond moth : L10481, microcaddishfly : U91375, webworm :U91342, *D. mauritiana* : L10450, *H. sapiens* : X84286) 유래의 MLE와 CLUSTAL W (www.clustalw.genome.ad.jp)[19]에 의해서 multi-alignment를 수행하였다. 이들은 다시 Tamura-Nei의 방정식에 의해서 genetic distance를 산출하였다. 계통수의 작성은 MEGA(Molecular Evolutionary Genetics Analysis program[8]의 UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) method에 의해서 작성되었으며, 계통수의 통계적 신뢰성을 위해서 1000번의 bootstrapping을 수행하였다.

누에 BmoMAR를 포함하여 전체 11 종의 곤충과 사람 MLE를 CLUSTAL W program을 이용하여 multi-alignment를 수행한 후, DNA 염기서열의 유사성을 분석하였다(Fig. 1). 이들의 alignment는 보존된 부위가 최대가 되도록 trimming 과정을 거쳐 정렬한 결과, BmoMAR은 web worm과 85%의 유사성을 보였으며, Robertson등[18]에 의해서 보고된 human MLE(Hsmar1)와는 15%의 상동성을 나타내었다. 이것은 상대적으로 human MLE가 독립적으로 진화하고 있음을 보여주는 것으로 사료된다. 따라서 이후의 계통수 작성에는 포함시키지 않았다. 또한, *Drosophila mauritiana*, honey bee 및 deer fly MLE의 염기서열에 의해서 4개 이상의 염기서열 gap이 10개의 부위에서 발생되었다(Fig. 1). 이것은 DNA 유사성에 있어서 비교한 8종간에서 상당한 유전적 변이가 있음을 간접적으로 보여주는 것이라 생각되며, 이것은 이후에 작성된 계통수에서도 알 수 있었다.

누에 BmoMAR를 포함하는 9 종의 곤충 MLE를 pairwise comparison에 의한 Tamura-Nei의 distance 방정식을 이용하여 genetic distance를 계산하였다(Fig. 2). 전체적인 genetic distance의 범위는 0.1033에서 0.7348로 산출되어 종간에 유전적 변이가 상당히 존재한다는 것을 알 수 있었으며, 평균 유전적 거리(average genetic distance)는 0.4840으로 나타났다. BmoMAR과 상대적으로 유연관계가 가까운 MLE는 web worm으로 분석되었으며(0.1033), damsel bug와는 상대적으로 제일 먼 유전적 차이(0.6676)를 보였다. 이 값을 토대로 하여 유전자의 진화가 다른 종간에 있어서 일정하다는 가정 하에 가중치를 두지 않고 grouping하여 계통수를 계산하는 UPGMA 방법으로 dendrogram을 작성하였다(Fig. 2). 본 연구에서 분석된 10 종의 MLE는 크게 3 개의 subgroup으로 이루어지는 것을 볼 수 있었다. 첫 번째 group은 genetic distance 0.5548에서 damsel bug와 blister beetle로 분지 되고, 두 번째는 honey bee와 deer fly가 genetic distance 0.4611에서 grouping되었다. 마지막으로 silkworm, *H. cecropia*, almond moth, web worm 그리고 microcaddishfly가 0.4336에서 분지 되었다. 이들의 계통분지에 대한 통계적 지지도는 1000번의 bootstrapping에 의해서 각각 84%, 68% 및 100%의 신뢰성을 가지는 것으로 나타났다.

분류학적으로 MLE subgroup중에서 coleoptera(딱정벌

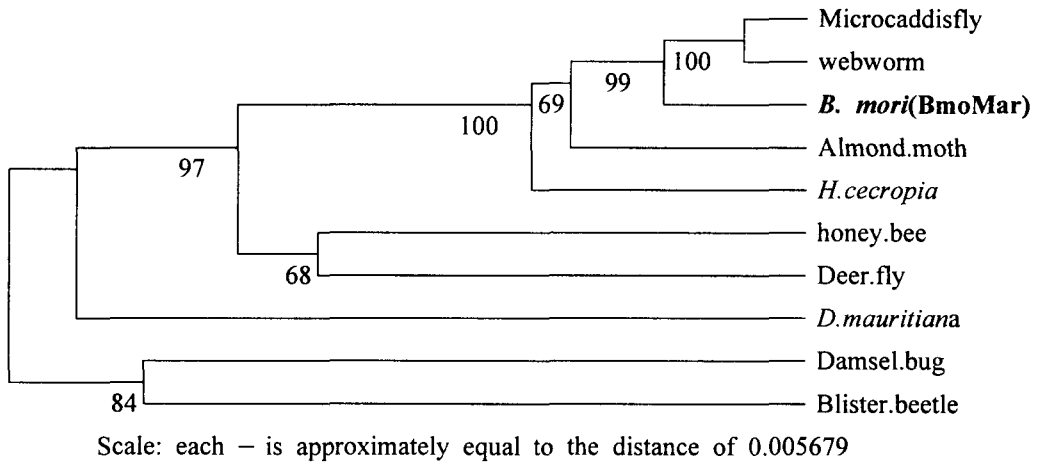


Fig. 2. Phylogenetics relationship of BmoMAR MLE and other members of MLE family, based on UPGMA analysis of their encoded partial transposase. Bootstrap percentages are shown below branches supporting nodes present in more than 50% of 1000 replications.

Table 1. Comparison pairwise of silkworm (BmoMAR) and nine insect MLEs sequence by Tamura-Nei distance

Species	SI	MI	WE	HC	AL	HO	DE	DM	DA
SI									
MI	0.1140								
WE	0.1033	0.0440							
HC	0.2392	0.2080	0.2057						
AL	0.2078	0.1707	0.1683	0.2144					
HO	0.5216	0.4617	0.4610	0.5211	0.4913				
DE	0.4473	0.3869	0.3869	0.4611	0.4201	0.4141			
DM	0.6332	0.5564	0.5564	0.6612	0.5662	0.6284	0.6174		
DA	0.6676	0.6539	0.6539	0.6845	0.6960	0.7348	0.6422	0.8384	
BL	0.6448	0.5425	0.5425	0.6602	0.5356	0.6280	0.5343	0.7020	0.5548

Note : SI, MI, WE, HC, AL, HO, DE, DM, DA, and BL indicate silkworm, microcaddisfly, webworm, *H. cecropia*, almond moth, hone bee, deer fly, *D. mauritiana*, damsel bug, and blister beetle, respectively

레목)와 hemiptera(노린재목)인 damsel bug와 blister beetle 이 가장 처음으로 분지 되었으며, honey bee(*Apis mellifera* : hymenoptera, 벌목)과 deer fly(*Chrysopa vittatus* : diptera, 파리목)이 두 번째로 group되어 분지 되었다. 마지막으로 모두 나비목(lepidoptera)에 속하는 microcaddisfly (*Orthotrichia cristata*), webworm(*Atteva punctella*), silkworm (*Bombyx mori*), almond moth(*Ephestia cautella*), *Hyalopora cecropia*가 분지 되었다. 파리목(diptera)에 속하는 *Drosophila mauritiana*는 가장 먼저 독립적으로 분지된 것으로 추정되

었다. 이와 같은 결과는 형태학적 분류와 거의 일치하였으나 *Drosophila mauritiana*가 파리목에 속하는 deer fly와는 별개로 분지된 것과 coleoptera(딱정벌레목)의 damsel bug와 hemiptera(노린재목)의 blister beetle이 함께 grouping 되는 것은 MLE의 DNA 염기서열 분석에 의해서 보다 새로운 분류가 이루어 질 수 있음을 예시하는 것이라 하겠다. 또한, 누에가 lepidoptera 종들과 일치하게 grouping되어 분지 되는 것으로 보아 MLE는 분자 진화 연구에 있어서 하나의 가치 있는 재료가 될 수 있음을 보여주는 것이

라 사료된다.

누에의 계통해석에 대한 연구는 PCR 기법을 응용한 RAPD 방법[4], RFLP 방법 및 mitochondrial DNA (mtDNA)[10]를 이용한 방법에 의해서 주로 수행되어 왔다. 그러나 RAPD와 RFLP 분석은 재현성의 문제, 적당한 probe DNA 선발 및 확보의 문제점등이 단점으로 지적되어 왔다. 물론 allozyme을 이용한 계통해석에 대한 방법이 시도되기도 하였으나, 한정된 marker 및 외부 환경 요인에 따른 유전자의 변화 등이 이들을 이용한 연구에 한계가 되고 있다[3,15].

따라서 전이인자를 이용한 곤충에서의 누에의 분자 계통해석에 관한 연구는 MLE가 전 세계적으로 분포하고 있는 누에의 지리적 계통간의 분석에 좋은 재료로서 이용될 수 있음을 보여준다고 생각되며, 또한 곤충 및 누에에서의 MLE의 horizontal transfer를 이해하는데 많은 분자적 통찰력을 줄 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 누에(*Bombyx mori*)에서 cloning한 BomMAR의 염기서열을 기초로 하여 곤충 MLE(mariner-like element)의 계통분석을 통한 누에의 분자적 계통 관계를 이해하고자 수행하였다. 전체 10 종의 MLE중에서 15%의 낮은 상동성을 보이는 인간 MLE(Hsmar1)을 제외한 9종의 MLE의 DNA 염기서열을 이용한 UPGMA 분석 결과, BmoMAR을 포함한 10종의 MLE가 세 가지의 subfamily로 grouping되는 것을 알 수 있었으며, 누에는 genetic distance 0.4332에서 같은 lepidoptera(나비목)의 *H. cecropia*, almond moth, webworm 및 microcaddishfly와 함께 grouping 되었다. 따라서 이와 같은 결과는 MLE가 곤충의 계통분석에 유용한 molecular tool이 될 수 있음을 보여준다.

인 용 문 헌

1. Ebert, P. R., Hilema, J. P. and Nguyen, H. T. 1995. Primary sequence, copy number, and distribution of mariner transposons in the honey bee, *Insect Mol. Biol.* **4**, 69-78.
2. Hartle, D. L. 1989. In mobile DNA, pp 531-536,

- Amer. Soci. Microbiol., Washington DC.
3. Hosaka, K., Matsubayash, M. and Kamijim, O. 1995. Peroxidase isozymes in various tissue for discrimination of two tuberous Solanum species, *Japan J. Breed* **35**, 375-382.
4. Hwang, J. S., Lee, J. S., Kang, H. A., Lee, S. M. and Suh, D. S. 1995. Analysis of genetic relationships among the silkworm, *Bombyx mori*, strains using RAPD-PCR, *Korean J. Genetics* **17(4)**, 291-300.
5. Jacobson, J. W., Medhora, M. M. and Hartle, D. L. 1986. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. USA.*, **83**, 8684-8699.
6. Jeyaprakash, A. and Hoy, M. A. 1995. Complete sequence of a mariner transposable element from the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* isolated by an inverse PCR approach, *Insect Mol. Biol.* **4**, 31-39.
7. Kidwell, M. G. 1993. Voyage of an ancient mariner, *Nature* **362**, 202.
8. Kumur, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Ver. 1.01). Pennsylvania Univ. PA. USA.
9. Lee, J. S., Hwang, J. S., Kim, Y. S., Suh, D. S. and Kwon, O. Y. 1998. Identification of mariner-like element(MLE) gene from *Bombyx mori*, Korea. *J. Life Science* **8(3)**, 285-293.
10. Lee, J. S., Hwang, J. S., Kim, Y. S., Lee, S. M., Kang, H. A. and Sohn, H. R. 1996. Genetic relationship among silkmoths by mtDNA RFLP, *Korean J. Gemtics* **18(1)**, 49-58.
11. Lee, J. S., Hwang, J. S., Kim, Y. S. and Suh, D. S. 1998. Molecular identification of mariner-like element from four silkmoth, *Korean J. Life Science* **8(4)**, 457-463.
12. Lidholm, D. A., Gudmundsso, G. H. and Boman, H. G. 1991. A highly repetative mariner-like element in the genome of *Hyalophora cecropia*, *J. Biol. Chem.* **266**, 11518-11521.
13. Lohe, A. R., Aguié, D. D. and Hartle, D. L. 1997. Mutation in the mariner transposase: The D, D(35), E consensus sequence is nonfunctional, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 1293-1297.
14. Muruyama, K. and Hartle, D. L. 1991. Evolution of the transposable element mariner in *Drosophila* species, *Genetics* **128**, 319-329.
15. Olivar, J. L. and Martinez-Zapater, J. M. 1985. A genetic classification of potato cultivar based on allozyme patterns, *Theor. Appl. Genet.*, **69**, 305-311.
16. Robertson, H. M. 1993. The mariner transposable

- element is widespread in insects, *Nature* **362**, 241-245.
17. Robertson, H. M. 1995. The Tc1 mariner superfamily of transposons in animals, *J. Insect Physiol.*, **41**, 99-105.
 18. Robertson, H. M. and Zumpano, K. L. 1997. Molecular evolution of an ancient mariner transposase, Hsmar1, in the human genome, *Gene* **205**, 203-217.
 19. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.