

누에 배양세포로부터 분리한 Protein Disulfide Isomerase 유전자의 발현 특성

구태원¹ · 윤은영¹ · 황재삼¹ · 강석우¹ · 권오유^{2*}

¹농촌진흥청 농업과학기술원

^{2*}충남대학교 의과대학

Molecular Characterization of a *Bombyx mori* Protein Disulfide Isomerase (bPDI)

Tae Won Goo¹, Eun Young Yun¹, Jae Sam Hwang¹, Seok Woo Kang¹ and O-Yu Kwon^{3*}

¹Department of Sericulture and Entomology, the National Institute of Agriculture Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-100, Korea

²Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-747, Korea

Abstract

Many secreted proteins have disulfide bonds that are important for their structure and function. Protein disulfide isomerase (PDI, EC 5.3.1.4.), an enzyme that catalyzes the formation and rearrangement of thiol/disulfide exchange reactions, is a resident of the endoplasmic reticulum (ER). The subcellular localization and its function as catalyst of disulfide bond formation in the biosynthesis of secretory and cell membrane proteins suggest that PDI plays a key role in the secretory pathway.

We have isolated a cDNA encoding protein disulfide isomerase from *Bombyx mori* (bPDI). It has been characterized under ER stress conditions (dominantly induced by calcium ionophore A23187, tunicamycin and DTT), which is known to cause an accumulation of unfolded proteins in the ER. Furthermore, It has also been examined for tissue distribution (pronounced at the fat body), hormonal regulation (juvenile hormone, insulin and juvenile +transferrin; however, it is not effected by transferrin alone), and the effect of exogenous bacterial (peak at 16 h after infection) on the bPDI mRNA expression. The results suggest that bPDI is a member of the ER stress protein group, and it may play an important role in exogenous bacterial infection in the fat body, and that hormones regulate its expression.

Key words – *Bombyx mori*; ER stress; Hormonal regulation; Protein disulfide isomerase

서 론

정확한 이황화 결합 (disulfide bonds, S-S)의 형성은 세
롭게 합성되는 단백질의 고차구조 형성과 기능발현에 필수

적인 반응이다[29,30]. 세포내 이황화 결합에 대한 특정적
인 역할이 명백하지 않았던 효소가 일종의 protein-folding
editor로 작용하여 부적절하게 접힌 단백질에 존재하는 비
정상적인 이황화 결합을 정확하게 접혀지게 하여 생체활성
기능이 있는 단백질로 이성질화 시킨다는 사실이 밝혀졌
다. 이 효소가 protein disulfide isomerase (PDI, EC 5.3.4.1)
이다[9].

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 042-580-8206, Fax : 042-586-4800
E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

PDI는 처음엔 thioredoxin의 활성부위 (active site) 아미노산 서열과 매우 유사한 2개의 protein-thiol oxidoreductase 활성부위가 아미노산 서열상에 존재하여 단지 산화환원효소로 특정 지었지만[6], 현재에는 액틴 필라멘트 중합, 유전자 발현, 세포-세포간 상호작용 및 수용체 조절 기능 뿐만 아니라 많은 단백질의 접힘, 조립 및 번역 후 변형과정에서 새롭게 합성되는 폴리펩타이드 사슬의 분자내 및 분자간 이황화 결합의 형성을 촉매하는 다기능 단백질로 정의된다[9,35,8,34]. 또한 PDI는 콜라겐의 프롤린 잔기를 산화하는 prolyl 4-hydroxylase (P4H)의 β -subunit [8,9]와 소포체 (endoplasmic reticulum; ER)에서 트리글리세이드를 리포단백질에 끼워 넣는 microsomal triglyceride transfer protein (MTP)의 subunit 하나와도 같은 단백질이며[38,12,19], 분자 샤페론으로 작용하여 단백질의 고차구조 형성을 촉진하는 기능도 가지고 있다[17,3,37]. 이는, 대부분의 분자샤페론이 에너지원인 포도당의 결핍, 당단백질화의 저해, 칼슘이온 교란, 소포체에서 골지체로의 단백질 이동 차단 및 환원제와 중금속 등에 민감하게 유도되는 것처럼 PDI 역시 heat shock, calcium ionophore A23187 및 tunicamycin 처리에 의해서 그 발현량이 증가하며[28], 또한 insulin을 포함하여 다양한 호르몬에 의해서도 그 발현량이 조절된다[27]. 이러한 PDI의 다기능에 관한 해석은 인간을 포함하여 효모 등에서 다양하게 연구되고 있으나 곤충에서는 유일하게 초파리 (*Drosophila melanogaster*)에서 PDI 유전자에 대한 1차 아미노산 구조 해석에 관한 보고가 있을 뿐 기능 해석에 관하여는 전무한 실정이다[23].

최근에 누에 (*Bombyx mori*) 배양세포 (Bm5)에 N-glycosylation 저해제인 tunicamycin을 처리하여 차별화선별 (differential screening) 결과 차별화 발현되는 40개의 클론을 선발하고[10], 이로부터 새롭게 합성되는 polypeptide chain의 분자간 및 분자내 정확한 이황화 결합의 형성을 촉매하는 protein disulfide isomerase를 코딩하는 유전자를 선발하여 구조를 분석하고[11] 기능을 해석하였다.

따라서 본 연구는 1차 아미노산 구조분석 결과 기존에 밝혀진 PDI 유전자와 유사한 기능을 할 것으로 추정되는 bPDI (*B. mori* PDI) 유전자의 기능을 해석하였으며, 이는 곤충에서 PDI 유전자에 대한 기능을 해석한 최초의 보고이다.

재료 및 방법

공시 곤충 및 배양세포주

본 연구에 사용된 공시 곤충 (누에)은 장려 잠풍종인 광식성 원종 (잠 306)으로 농업과학기술원 잠사곤충부의 표준사육 기준 (온도, 24~27°C; 상대습도, 70~90%)에 준하여 사육하였다. 곤충 배양세포주는 누에 (*Bombyx mori*:Silkworm) 난소 (ovary) 조직에서 수립된 Bm5 세포주였다. N-glycosylation 억제를 위해 배양세포에 tunicamycin을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하여 25°C에서 5시간 배양하였다[7].

Total RNA 및 poly (A)⁺RNA 분리

Tunicamycin이 처리된 배양세포를 5시간 후에 PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척한 다음 이로부터 total RNA 분리는 RNAgents Total RNA Isolation System (Promega Co., USA)을 사용하여 분리하였다. 분리한 total RNA는 전기영동으로 양상을 확인하고, 파장 260 nm에서 UV 분광광도계로 정량하여 poly (A)⁺RNA 분리에 사용하였다. Poly (A)⁺RNA의 정제는 Poly (A) Quik mRNA Purification Kit (Stratagene Co., USA)를 사용하여 정제한 후 cDNA 유전자은행을 제작하는데 이용하였다.

cDNA 유전자은행 제작

N-glycosylation이 억제된 곤충 배양세포주의 cDNA 유전자은행의 제작은 Stratagene사의 Uni-ZAP XR Vector Kit와 Gigapack Packaging Extract를 사용하여 제작하였다. 즉, poly (A)⁺RNA로부터 *Xho*I linker primer와 역전사효소를 이용하여 cDNA 말단을 평활말단으로 만들었다. 그리고 *Eco*R I adapter를 부착시킨 후, 제한효소인 *Xho*I로 절단하고 size fractionation을 거쳐 500 bp 이상 크기의 단편만을 취하였다. 이러한 cDNA를 Uni ZAP XR 벡터에 결합시켜 삽입한 후 완전한 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로 packaging하여 cDNA 유전자 은행을 제작 하고 기주세포 (XL1-Blue MRF' strain)내에 감염시킨 후 cDNA 농도를 적정하고 이를 적당한 농도로 증폭하여 시험에 사용하였다.

정상 및 N-glycosylation이 억제된 곤충 배양세포주의 차별화 선별

Tunicamycin을 처리하여 제작된 cDNA 유전자은행으로

부터 *in vivo* excision[31]에 의해 무작위로 768개의 클론을 선별하여 플라스미드를 분리하였다. 분리한 플라스미드를 95°C에서 10분간 가온하여 변성시킨 후 두 장의 나일론 막에 각각 동일한 0.5 µg의 플라스미드 DNA를 blotting 하였다. 두 장의 막을 각각 정상세포에서 분리한 poly (A)⁺ RNA와 N-glycosylation이 억제된 곤충 배양세포에서 분리한 poly (A)⁺ RNA를 M-MLV 역전사효소로 합성한 1st-strand cDNA를 탐침으로 사용하였다[5].

cDNA 탐침제조는 1.5 ml 튜브에 1 µg poly (A)⁺ RNA, 1 µg oligo (dT) primer (1 µg/µl), 20 units RNase inhibitor, 5 µl 5×reverse transcriptase buffer, dGTP, dCPT, dTTP (20 mM/each), 120 µM dATP, 10 µl [α -³²P] dATP (3000 Ci/mmol)와 20 units M-MLV 역전사효소를 넣고 1시간 동안 역전사하였다. 여기에 2 units RNaseH를 첨가하고 37°C에서 15분간 반응하여 poly (A)⁺ RNA만을 선택적으로 제거시킨 후 동위원소가 표지된 단선 cDNA를 G-50 Sephadex 칼럼을 이용하여 회수하였다.

RACE-PCR

차별화 선별된 클론의 전체 염기서열을 결정하기 위하여 Clontech 사의 Marathon cDNA Amplification Kit를 사용하여 3'-Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) PCR를 실시하였다. Tunicamycin이 처리된 누에 배양세포 (Bm5)로부터 분리한 poly (A)⁺ RNA를 사용하여 1st 및 2nd cDNA를 합성하고, Marathon cDNA Adaptor (5'-CTA ATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGG CAGGT-3')를 ligation 한 후 유전자내의 gene specific primer (GSP1 : 5'-CTGGAACACACCAAGATCACGTCCT TCTCAACGAT-3')와 adaptor primer (AP1 : 5'-CCATCCT AATACGACTCACTATAGGGC-3')를 사용하여 touch down PCR을 수행하였다. 증폭된 3'-RACE (GSP1/AP1) PCR 산물은 1.2% 아가로스젤에 전기영동하여 증폭된 단편의 크기를 확인한 후, pGEM-T 벡터 (Promega Co., USA)에 클로닝하고 염기서열을 확인하여 전체 염기서열을 결정하였다. 그리고 PDI 전체 cDNA 유전자는 유전자내의 GSP2 (5'-G GCACGAGGCCACGTCAAGTTTGGCAA-3')와 AP1를 사용하여 touch down PCR한 후, 증폭산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 protein disulfide isomerase (PDI) 전체 유전자를 확보하였다.

부분염기서열 분석 및 데이터베이스 검색

차별화 발현되는 클론의 부분 염기서열 분석은 자동염기서열 분석장치 (Perkin Elmer Co., USA, ABI377)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 각 염기의 표지는 Bigdye ready reaction kit (Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 반응액을 조제하고 PCR을 수행한 후, 반응산물을 정제하여 4.5% 아크릴아마이드겔에 전개하였다. 아크릴아마이드겔의 예비통전은 30 W로 20~30분간하였으며, 시료주입은 정제한 PCR 산물에 formamide 5 µl와 50 mM EDTA 1 µl를 넣어 100°C에 2분간 변성하고 급냉한 후 각 well에 2 µl씩 점적 (loading)하였으며, 염기서열은 DNA Sequencing Analysis Software (Perkin Elmer Co., USA)에 의해서 분석하였다. 그 후 얻어진 염기서열은 GenBank 데이터베이스를 통하여 상동성을 분석하고 DDBJ 및 GenBank 국제 유전자은행에 등록하였다.

RNA dot blot 분석

선발한 차별화 클론에 대하여 전사체 검정을 위하여 정상 배양세포주와 스트레스 유도제 및 호르몬이 처리된 누에 배양 세포주로부터 각각 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 65°C에서 10분간 가온하여 변성시킨 후 나일론 막에 각각 동일한 5 µg의 RNA를 blotting한 후, Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene Co., USA)를 이용하여 [α -³²P] dATP로 표지한 TmInc 131 cDNA 및 18S rRNA cDNA를 탐침으로 RNA dot blot 분석을 수행하였다. 조직별 및 *E. coli* 주사후 시간 경과별 bPDI 유전자 전사체 검정 역시 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

결과 및 고찰

조직별 bPDI 유전자의 발현

1차 아미노산 구조분석 결과 기준에 밝혀진 protein disulfide isomerase (PDI, EC 5.3.1.4) 유전자와 유사한 기능을 할 것으로 추정되는 bPDI (*Bombyx mori* PDI) 유전자 [10]의 기능을 해석하기 위하여 누에의 조직, 스트레스유도제 및 생장조절제 처리에 따른 bPDI 유전자의 발현조절을 전사 수준에서 해석하였다. 또한 곤충의 면역과 bPDI 유전자의 관계를 해석하기 위해 누에의 *E. coli* 주사에 따른 발현조절을 전사 수준에서 해석하였다.

조직별 전사체 분석을 위하여 누에 (*B. mori*)의 5령 3일째 유충으로부터 견사선, 지방체, 중장, 말피기관 및 표피를 분리하고, 이로부터 total RNA를 분리하여 각 5 μ g씩 blotting한 후 bPDI와 18S rRNA cDNA를 탐침으로 혼성화 반응을 수행하였다. 그 결과, 1995년 McKay 등이 초파리 (*D. melanogaster*) 성충의 두부와 몸통의 전사체 검정을 통하여 PDI는 거의 모든 조직에서 발현될 것이라는 추정 [23,21]과는 달리, bPDI는 지방체, 견사선, 표피, 말피기관 순으로 높게 발현되었으나 중장에서는 거의 발현되지 않았다 (Fig. 1). 척추동물의 경우 PDI가 가장 강하게 발현되는 구조는 다량의 단백질을 합성하는 간으로 전체 간세포 단백질의 0.7%를 차지한다는 보고와 같이 [9,24,15], bPDI 유전자 또한 포유동물의 간에 해당하는 누에의 지방체에서 가장 강하게 발현되었는데 [22,32], 이는 곤충의 지방체가 가장 많은 단백질을 발현하는 조직이기 때문으로 추정되었다.

소포체 스트레스 유도제에 의한 bPDI의 발현

세포는 분자샤페론이나 ER foldase인 PDI의 전사를 증가시키므로써 세포의 소포체 내강에 정확하게 접하지 않

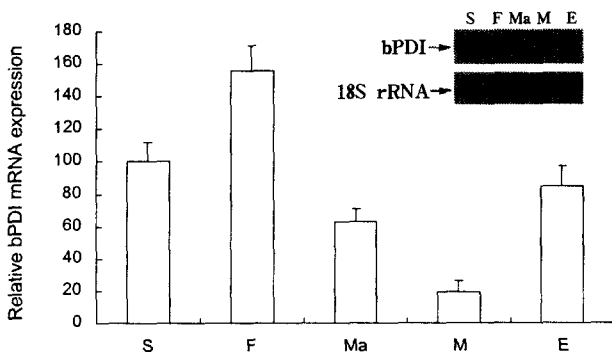


Fig. 1. Dot blot analysis of bPDI mRNA expression on the tissues.

Total RNA isolated from the following organs of S, silkgland; F, fat body; M, midgut; Ma, malpighian tubes; E, epidermis, and 5 μ g total RNA from each sample was transferred onto a Hybond-N nylon membrane. Hybridization was carried out using [α - 32 P]dATP-labeled bPdi cDNA as a probe. The quantitation of band intensities of bPDI was measured using the Image Quant software package and the bar graph shows the averages of the quantified data from three independent experiments. The inset shows the result from one experiment. 18S rRNA was used as a marker of quantitation.

았거나 조립되지 못한 폴리펩타이드에 대응한다 [18]. 따라서 bPDI 또한 세포내 이상한 구조를 가지는 단백질이 발생할 때 ER foldase나 분자 샤페론으로 작용하여 기능을 나타내는지 알아보기 위하여, 누에 배양세포 (Bm5)에 각종 스트레스 유도제를 처리하여 세포내 이상한 구조를 가지는 단백질을 유도하였다. 사용된 스트레스 유도제는 disulfide bond 형성 저해제인 DTT (dithiothreitol), ATP 저해제인 Antimycin A, 단백질의 glycosylation 형성 저해제인 tunicamycin, 칼슘이온의 항상성 저해제인 Ca^{2+} ionophore A23187, 단백질의 소포체에서 골지체 이동 저해제인 monensin 및 산화 스트레스제인 H_2O_2 였다 [25]. DTT, antimycin A, tunicamycin, Ca^{2+} ionophore A23187, monensin 및 H_2O_2 는 각각 3 mM, 8 μ M, 5 μ g/ml, 10 μ M, 100 μ M 및 100 μ M의 농도로 누에 배양세포(Bm5)에 처리하여 5시간 배양한 후, 이로부터 total RNA를 분리하여 조직별 전사체 분석과 동일한 방법으로 전사수준에서 발현량을 확인하였다. 1996년 Odani 등이 HeLa cell에 열충격과 스트레스유도제인 A23187, tunicamycin, cycloheximide, DTT 및 Δ 12-prostaglandin J2를 처리하여 PDI의 전사체 분석한 결과 [32]와 유사하게 bPDI 역시 다른 스트레스 유도제에 비하여 Ca^{2+} ionophore A23187 (~3배), tunicamycin (~2.3배) 및 DTT (~1.7배)를 처리한 세포주에서 강하게 발현되었다 (Fig. 2). 이것은 DTT, tunicamycin 및 Ca^{2+} ionophore A23187 처리에 의해서 각각 disulfide bond의 형성 저해, 비정상적인 구조를 가지는 단백질의 생성 및 칼슘이온의 항상성이 파괴됨으로써 상대적으로 bPDI가 전사수준에서 발현량이 증가한 것으로 판단되었다. 이 실험 결과는 bPDI 역시 기존에 밝혀진 PDI와 유사하게 ER foldase 나 분자 샤페론으로써 작용하여 이상한 구조의 단백질을 정상화시키는 기능을 가지며 [17,33,37], 또한 소포체의 주요한 칼슘결합 단백질임을 추정할 수 있었다 [30].

호르몬 및 성장인자에 의한 bPDI 발현 조절

Rat에서 PDI의 발현은 다양한 호르몬 및 성장인자에 의해서 전사수준에서 조절된다는 보고와 같이 [27], 호르몬 및 성장인자가 bPDI 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 누에 배양세포(Bm5)에 10% 소혈청을 첨가한 곤충 성장배지(TC-100 insect medium)에서 5일간 전배양한 후 배양액을 제거하고 10% FBS가 첨가된 곤충 배양액에 각종

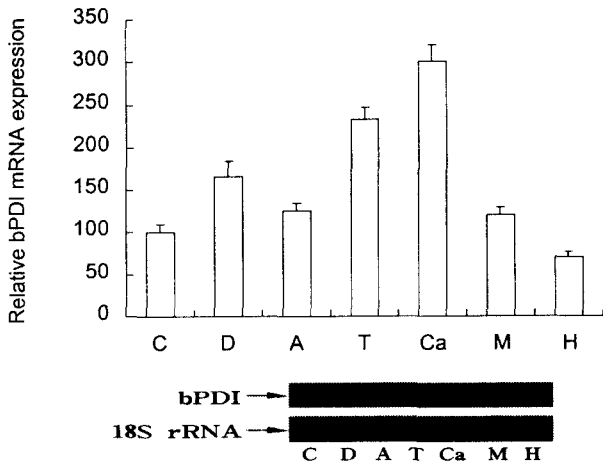


Fig. 2. Effects of various ER-stresses on bPDI mRNA expression.

Bm5 culture cells were treated for 5 h with 3 mM DTT (D), 8 μ M antimycin A (A), 5 μ g/ml tunicamycin (T), 10 μ M calcium inophore A23187 (Ca), 100 μ M monensin (M) and 100 μ M H₂O₂ (H), respectively, and C indicates the control without treatment of tunicamycin. Total RNA (5 μ g) from each sample was transferred onto a Hybond-N nylon membrane. Hybridization was carried out using [α -³²P]dATP-labeled bPDI cDNA as a probe. The quantitation of band intensities of bPDI was measured using the ImageQuant software package and the values in the bar graph are the averages of three repeated experiments. The bottom panel shows the result from one experiment. 18S rRNA was used as a marker of quantitation.

호르몬 및 성장인자를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 사용된 호르몬과 성장인자는 곤충 유약호르몬인 juvenile hormone (JH), 탈피호르몬인 20-hydroxyecdysone (20-HE), 혈당조절 호르몬인 insulin 및 철운반 단백질인 transferrin을 사용하였다. JH와 20-HE는 ml당 2 μ g의 농도로, insulin 및 transferrin은 각각 ml당 1 μ g 및 5 μ g의 농도로 누에 배양세포에 처리하여 24시간 동안 배양한 후 이로부터 total RNA를 분리하여 RNA dot blot 방법에 의해서 발현 분석을 하였다. 그 결과 20-HE 및 transferrin을 단독으로 처리하였을 때는 bPDI 유전자 발현에 거의 영향을 미치지 않았으나, JH 및 insulin 단독 처리에 의해서는 bPDI 유전자 발현에 두드러진 영향을 나타내었다[13]. 특히 JH를 단독으로 처리했을 때의 bPDI의 mRNA 발현량보다 JH를 transferrin과 함께 처리하였을 때 bPDI mRNA의 발현량이 훨씬 강하게 발현되었다 (Fig. 3). 이러한 결과로써 성장조절인

자와 bPDI와의 상호작용을 다음과 같이 추정할 수 있었다. JH는 세포막 확산을 통해서 세포질로 들어가는데, JH의 작용세포 (예: 표피세포, 난소, 지방체 등)에는 JH 수용체가 존재하며 이 JH-수용체 복합체가 DNA와 결합하여 새로운 mRNA가 합성된다는 것이 여러 곤충에서 확인되었다. 이 mRNA는 세포질로 이송되어 난황소전구체 (vitellogenin)로 합성되며, 또한 JH는 미토콘드리아의 단백질합성과 cytochrome oxidase 활성을 증진하는 것으로 보고되었다[33]. 따라서 누에 배양세포에 JH를 처리하였을 때 bPDI의 발현량이 증가하는 것은 JH 처리에 의해서 다양한 종류의 단백질이 합성되고 합성량이 증가함으로써 이의 일환으로 bPDI 역시 그 발현량이 증가한 것으로 판단된다. 한편, 무기이온들은 모든 생물에서 합성할 수 없기 때문에 당연히 외부에서 공급되어야 하지만 곤충의 경우에는 무기이온들의 농도변이나 균형에는 민감하게 반응하지 않는다. 왜냐하면 곤충은 체내 축적이나 배설기관을 통해서 이들의 체내 농도를

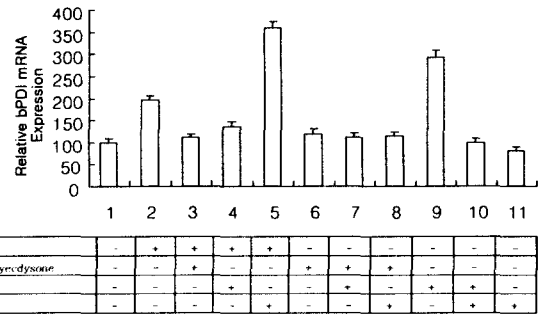


Fig. 3. Effects of various growth factors on the bPDI mRNA expression.

Confluent Bm5 culture cells were treated for 24 h either with (+) or without (-) 2 μ g/ml juvenile hormone and combined with 2 μ g/ml 20-hydroxyecdysone, 1 μ g/ml insulin, or 5 μ g/ml transferrin. Total RNA (5 μ g) from each sample was transferred onto a Hybond-N nylon membrane. Hybridization was carried out using [α -³²P]dATP-labeled bPDI cDNA as a probe. The quantitation of band intensities of bPDI was measured using the ImageQuant software package. The results in the bar graph are the average of three separate experiments. The bottom panel shows the result from one experiment. 18S rRNA was used as a marker of quantitation.

어느 정도 조절할 수 있기 때문에[22] transferrin의 단독 처리는 세포 내 단백질의 합성에 크게 영향을 주지 못하므로 bPDI 또한 그 발현량이 증가하지 않았는 것으로 판단된다. 그러나 transferrin을 JH와 동시에 처리하였을 때 bPDI의 발현량이 증가하는 것은 JH-수용체 분자가 특정 유전자에 결합하는 것을 transferrin이 활성화하기 때문으로 추정할 수 있었다[5]. 그리고 인슐린 처리에 의해서 bPDI의 발현량이 증가한 것은 인슐린이 아미노산을 단백질로 편입시키는 것을 촉진시키고 또한 아미노산이 포도당으로 전환하는 과정을 억제하였기 때문으로 추정된다. 그러나 생장조절인자와 bPDI와의 상호관계에 관한 해석은 앞으로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

곤충 면역과 bPDI의 발현조절

곤충은 미생물이나 외부물질 등의 침입에 대한 생체방어 수단으로 식작용, 결절형성, 캡슐형성 등으로 침입물질을 제거하는 세포성 면역과 지방체와 혈구에서 단백질을 합성한 후 혈림프로 분비하여 미생물을 제거하는 체액성 면역이 있으며, 특히 곤충의 체액성 면역반응은 세균이나 lipopolysaccharide (LPS) 등과 같은 다양한 면역원에 의해 표피의 상처 또는 체강 주입으로 유도된다[2]. 곤충의 면역과 bPDI와의 관계를 해석하기 위하여, 5령 1일째 누에의 체강에 비병원성 세균인 *E. coli* K12를 주사하여 면역을 유도하였다[26]. 주사 후 시간별 (0,2,4,8,16,24 hr)로 누에를 해부하여 지방체를 분리하였다. 분리한 지방체로부터 total RNA를 분리하여 RNA dot blot을 통하여 *E. coli* 주사에 따른 곤충의 면역과 bPDI 유전자의 발현조절을 전사수준에서 해석하였다. 그 결과 bPDI는 *E. coli* 주사 후, 2시간째부터 발현하기 시작하여 16시간째 최대로 발현하며 16시간 이후에는 발현량이 감소하였다 (Fig. 4). 이것은 누에에 *E. coli* 주사 후 시간별에 따른 항세균 펩타이드 및 항세균 단백질의 발현 양상[16,39]과 매우 유사한 결과로, bPDI가 곤충의 면역과 직접 또는 간접으로 관련이 있는 것으로 추정할 수 있었다.

이상의 결과는 곤충에서 PDI 유전자에 대하여 조직, 스트레스유도제 및 호르몬 처리에 따른 PDI 유전자 발현조절과 곤충의 면역과 PDI와의 관계를 전사수준에서 해석한 최초의 보고이며, 또한 이 결과로부터 bPDI가 기능이 밝혀진 척추동물의 PDI와 유사하게 지방체에서 최대 발현하며, 누에가 여러 종류의 스트레스를 받아서 체내의 소포체 내

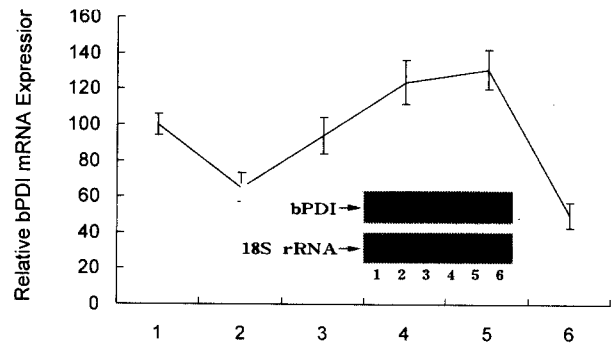


Fig. 4. Temporal induction of the bPDI gene expression following immunization.

Total RNA extracted from the fat body of *B. mori* immunized with *E. coli* for 0 h; control (lane 1), 2 h (lane 2), 4 h (lane 3), 8 h (lane 4), 16 h (lane 5) and 24 h (lane 6), respectively. Total RNA (5 μ g each) per sample was transferred onto a Hybond-N nylon membrane and hybridized with a [α - 32 P]dATP-labeled bPDI cDNA as a probe. The quantitation of band intensities of bPDI was measured using the ImageQuant software package. The dot graph represents an average of three separate experiments. The inset shows the result from one experiment. 18S rRNA was used as a marker of quantitation.

강에 비정상적인 구조를 가지는 단백질이 생성되었을 때는 발현량이 증가되어 비정상적 단백질의 정확한 고차구조를 형성함으로써 기능성이 있는 단백질로 전환해 주는 ER foldase로 역할을 할 것으로 추정할 수 있었다. 한편으로는 곤충의 성장 과정에서 필요한 단백질의 발현이 증가할 경우에도 bPDI가 대량 발현되어 발현 단백질이 정확한 고차구조를 가지도록 도와주고 또한 외래 미생물 침입시 생체방어에 관련된 단백질의 발현이 시간경과별로 증가할 때에도 bPDI 역시 생체방어 단백질의 발현량과 일치되게 시간경과별로 발현량이 증가되어 생체방어 단백질이 본래의 활성을 나타내도록 도와주는 것으로 판단되었다.

참고 문헌

1. Abel, T., R. Bhatt, R and T. Maniatis. 1992. A *Drosophila* CREB/ATF transcriptional activator binds to both fat body- and liver-specific regulatory elements. *Genes Dev.* 6, 466-480.
2. Boman, H.G. and D. Hultmark. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 41,103-126.

3. Cai, H., C. C. Wang and C. L. Tsou. 1994. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **269**, 24550-24552.
4. Creighton, T. E., D. A. Hillson and R. B. Freedman. 1980. Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. *J. Mol. Biol.* **142**, 43-62.
5. De Loof, A. 1986. Tissue specificity of steroid hormone action. *Insect Biochem.* **16**, 169-173.
6. Edman, J. C., L. Ellis, R. W. Blacher, R. A. Roth. and W. J. Rutter. 1985. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* **317**, 267-270.
7. Elbein, A. D. 1981. The tunicamycins-useful tools for studies on glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **6**, 219-221.
8. Frand, A. R., J. W. Cuozzo and C. A. Kaiser. 2000. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* **10**, 203-210.
9. Freedman, R. B., T. R. Hirst and M. F. Tuite. 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 331-336.
10. Goo T. W., E. Y. Yun, J. S. Hwang, S. W. Kang, J. S. Lee, S. J. Park, K. S. Lee and O. Y. Kwon. 2001. Construction of the cDNA library and selection of differentially expressed clones from *Bombyx mori* Bm5 cell line treated with tunicamycin treatment. *Kor. J. Genetics* **23**, 183-190.
11. Goo T. W., E. Y. Yun, J. S. Hwang, S. W. Kang, S. J. Park, K. S. Lee and O. Y. Kwon. 2001. Isolation and characterization of a gene encoding a protein disulfide isomerase from *Bombyx mori* Bm5 cell line. *Kor. J. Genetics* **23**, 295-305.
12. Gordon, D. A., H. Jamil, D. Sharp, D. Mullaney, Z. Yao, R. E. Gregg and J. Wetterau. 1994. Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 7628-7632.
13. Graham, L. A., W. G. Bendena and V. K. Walker. 1996. Juvenile hormone regulation and developmental expression of a *Tenebrio* desiccation stress protein gene. *Dev. Genet.* **18**, 296-305.
14. Helaakoski, T., P. Annunen, K. Vouri, I. A. MacNeil, T. Pihlajaniemi and K. I. Kivirikko. 1995. Cloning, baculovirus expression, and characterization of a second mouse prolyl 4-hydroxylase alpha-subunit isoform: formation of an α -2 β -2 tetramer with the protein disulfide-isomerase / β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4427-4431.
15. Höög. 1991. Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6123-6127.
16. Kim, S. H., B. S. Park, E. Y. Yun, Y. H. Je, S. D. Woo, S. W. Kang, K. Y. Kim and S. K. Kang. 1998. Cloning and expression of a novel gene encoding a new antibacterial peptide from silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 388-392.
17. LaMantia, M. and W. J. Lennarz. 1993. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell* **74**, 899-908.
18. Lee, A.S. 1987. Mammalian stress response : induction of the glucose-regulated protein family. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **4**, 267-273.
19. Leiper, J. M., J. D. Bayliss, R. J. Pease, D. J. Brett, J. Scott and C. C. Shoulders. 1994. Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 21951-21954.
20. Macer, D. R. and G. L. Koch. 1988. Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **91**, 61-70.
21. Marcus, N., D. Shaffer, P. Farrar and M. Green. 1996. Tissue distribution of three members of the murine protein disulfide isomerase (PDI) family. *Biochim. Biophys. Acta* **1309**, 253-260.
22. McFarlane, J.E. 1976. Influence of dietary copper and zinc on growth and reproduction of the house cricket. *Can. Ent.* **108**, 387-390.
23. McKay, R. R., L. Zhu and R. D. Shortridge. 1995. A *Drosophila* gene that encodes a member of the protein disulfide isomerase/phospholipase C-alpha family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 647-654.
24. Mills, E. N., N. Lambert and R. B. Freedman. 1983. Identification of protein disulphide-isomerase as a major acidic polypeptide in rat liver microsomal membranes. *Biochem. J.* **213**, 245-248.
25. Mkrтчian, S., C. Fang, U. Hellman and M. Ingelman-Sundberg. 1998. A stress-inducible rat liver endoplasmic reticulum protein, ERp29. *Eur. J. Biochem.* **251**,

- 304-313.
26. Natori, S., H. Shiraishi, S. Hor and A. Kobayashi. 1999. The roles of Sarcophaga defense molecules in immunity and metamorphosis. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 317-328.
 27. Nieto, A., E. Mira and J. G. Castano. 1990. Transcriptional regulation of rat liver protein disulphide-isomerase gene by insulin and in diabetes. *Biochem. J.* **267**, 317-323.
 28. Odani, N., M. Negishi, S. Takahashi and A. Ichikawa. 1996. Induction of protein disulfide isomerase mRNA by delta 12-prostaglandin J2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 264-268.
 29. Raina, S. and D. Missiakas. 1997. Making and breaking disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 179-202.
 30. Rietsch, A. and J. Beckwith. 1998. The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 163-184.
 31. Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge and W. D. Huse. 1988. λ ZAP: A bacteriophage λ expressed vector with in vivo expression properties. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7583-7600.
 32. Sondergaard, L. 1993. Homology between the mammalian liver and the Drosophila fat body. *Trends Genet.* **9**, 193.
 33. Stepien, G., M. Renaud, I. Savre and R. Durand. 1988. Juvenile hormone increases mitochondrial actinivites in Drosophila cells. *Insect Biochem.* **18**, 313-321.
 34. Tabb, J. S., B. J. Molyneaux, D. L. Cohen, S. A. Kuznetsov and G. M. Langford. 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J. Cell Sci.* **111**, 3221-3234.
 35. Terada, K., P. Manchikalapudi, R. Noiva, H. O. Jauregui, R. J. Stockert and M. L. Schilsky. 1995. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 20410-20416.
 36. Vouri, K., R. Myllyla, T. Pihlajaniemi and K. Kivirikko. 1992. Expression and site-directed mutagenesis of human protein disulfide isomerase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 7211-7214.
 37. Wang, C. C. 1997. Isomerase and Chaperone Activities of protein disulfide isomerase are both required for its function as a foldase. *Biochemistry* **63**, 407-412.
 38. Wetterau, J. R., K. A. Combs, L. R. McLean, S. N. Spinner and L. P. Aggerbeck. 1991. Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry* **30**, 9728-9735.
 39. Yun, E. Y., S. W. Kang, J. S. Hwang, T. W. Goo, S. H. Kim, B. R. Jin, O. Y. Kwon and Kim, K.Y. 1999. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a transferrin homolog from *Bombyx mori*. *Biol. Chem.* **380**, 1455-1459.

(Received June 22, 2001; Accepted July 31, 2001)