

## Expression of *Bombyx mori* Transferrin Gene in Response to Oxidative Stress or Microbes

Eun-Young Yun<sup>1</sup>, O-Yu Kwon<sup>2</sup>, Jae-Sam Hwang<sup>1</sup>, Mi-Young Ahn<sup>1</sup> and Tae-Won Goo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Korea

<sup>2</sup>Department of Anatomy, School of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-747, Korea

Received October 12, 2011 / Revised October 19, 2011 / Accepted November 9, 2011

To analyze the role of *Bombyx mori* transferrin (BmTf) in response to microbes or oxidative stress, we investigated the level of BmTf transcripts in *B. mori* treated with various microbes and oxidative stress inducers. BmTf mRNA was mainly expressed in the epidermis and fat in the bodies of *B. mori* injected with *Escherichia coli*, and up regulated in response to microbes such as bacteria, fungi, or viruses, but was hardly altered in response to oxidative stress inducers such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cu, or FeCl<sub>3</sub>. We also confirmed that BmTf mRNA expression was increased in Bm5 cells treated with ERK, PLC, PKA, PI3K, MAPK, or JNK inhibitors, respectively. To identify the major inducer of BmTf expression, we analyzed the amount of serum iron in the hemolymph of *B. mori* after injection or feeding with *E. coli* or FeCl<sub>3</sub>. The results showed that the amount of serum iron was not changed by injection and feeding with *E. coli*, although BmTf mRNA was increased by injection with *E. coli*. On the contrary, injection and feeding with FeCl<sub>3</sub> significantly increased the amount of serum iron, although they did not alter the BmTf mRNA level. On the basis of these results, we assume that up-regulation of BmTf in *B. mori* is closely related to the defense of microorganism, and BmTf may be expressed at the basal constitutive level when it plays a role in iron metabolism by maintaining iron homeostasis and in the insect defense mechanism against oxidative stress.

**Key words** : *Bombyx mori*, transferrin, iron metabolism, innate immunity

### 서 론

곤충은 선천성 면역(innate immunity)으로 수동적인 구조적 장벽과, 세포성 및 체액성 면역 반응을 수행한다. 체액성 면역반응 중에서 항세균 펩타이드 같은 체액성 인자의 합성과 분비를 통해 침입하는 병원균과 기생충로부터 자신을 보호할 수 있으며[8,10], 수종의 곤충 트랜스페린(transferrin, Tf)이 미생물의 침입 후 과발현되어 Tf의 면역적 기능이 보고된 바 있다[3,11-14,17]. 최근 초파리에서 게놈 전체에 걸친(genome-wide) microarray 분석을 통해 항생 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP) 유전자뿐만 아니라 400개 이상의 초파리 면역관련 유전자(*Drosophila* immune-regulated genes, DIGRs) 들이 넓은 범위에서 숙주의 방어 메커니즘에 관련하는 것으로 알려져 있다[5]. 넓은 범위에서 곤충의 방어에 관련된 유전자들에는 병원체 인식(pathogen recognition), 식균작용(phagocytosis), 세포골격 재구성(cytoskeleton remodeling), 혈액응고(coagulation), 멜라닌화(melanization), 철 운반(iron transfer)과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 조절에 관련된 다양한 유전자들이 포함된다[1,4-6].

곤충의 면역관련 유전자로 추측되고 있는 Tf는 철결합 단

백질로써 강하게 Fe<sup>3+</sup>와 결합하므로(K<sub>d</sub>~10<sup>-22</sup> M), 철과의 결합을 통해 병원균이 복제를 위해서 숙주의 철을 이용하는 것을 제한함으로써 세균발육을 저지(bacteriostatic)할 수 있는 환경을 만들어 많은 병원균의 성장에 철이 이용될 수 없도록 한다[2,7]. 곤충 Tf의 역할에 관한 연구의 경우, 꿀벌 *Apis mellifera* Tf (AmTf)는 중추신경계(central nervous system)에서 활성산소 중간체(reactive oxygen intermediate)에 대한 방어 메커니즘에 중요한 역할을 수행할 것이라고 추정되었고, 또한 성충의 뇌와 눈에서 AmTf의 높은 수준의 발현을 통해 Tf가 비행과 방향감각에 철이 관련되었음을 추측한다. 그 외 곤충 Tf의 기능에 대한 연구가 미비한 실정이다[11]. 전사체 수준에서 곤충 Tf는 감염에 의해 과발현됨이 흰개미(termite), 모기(mosquito), 누에(silkworm) 등에서 보고되어, 선천성 면역과 관련이 있다고 추정되는 실정이다[12,14,17]. 초파리에서 Tf는 조직 손상과 항생 과정에 관련이 있음이 밝혀졌으며, 특히 그람 양성균의 감염동안 유도되는 Toll pathway와 관련이 있다고 보고 되었다[3]. 포유동물 Tf도 선천성 면역에 관련되었을 거라는 추측은 있지만 연구가 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 곤충 생체방어 메커니즘을 이해하기 위하여 누에 체내에 다양한 미생물 및 산화적 스트레스 유도제 처리 후 누에 Tf의 전사체 발현양상 분석을 통해 곤충 체내에서 Tf의 면역적 기능을 확인하는 것이다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-31-290-8532, Fax : +82-31-290-8503

E-mail : gootw@korea.kr

## 재료 및 방법

### 실험 곤충 및 곤충 배양세포주

본 연구에 사용된 누에(*Bombyx mori* Silkworm)는 장려 잠 품종인 칠보잠(잠123×잠124)으로 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육 기준(온도, 24~27°C; 상대습도, 70~90%)에 준하여 사육하였고, protein kinase inhibitor 처리는 Bm5 (*Bombyx mori*) 세포주를 사용하였다. Bm5 세포주는 누에 난소유래 세포주로서 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum를 첨가한 TC-100 medium을 이용하여 27°C에서 배양되었다.

Protein kinase inhibitor로는 20 µM extracellular signal regulated kinase (ERK), 10 µM phospholipase C (PLC), 500 nM protein kinase A (PKA), 20 µM phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), 20 µM p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 및 20 µM Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor를 사용하였다.

### 전사체 발현 분석

조직별 및 대장균 주사후 시간 경과별 BmTf (*B. mori* transferrin) 유전자 전사체 검정을 위하여 면역 유도 누에로부터 각각 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 이용하여 앞서 누에로부터 분리된 항생펩타이드인 enbocin [9], nuecin [16] 및 Tf 전사체 발현양상 비교를 위해 RT-PCR 및 real-time PCR을 수행하였다. Primer는 Beacon Designer 소프트웨어 (PREMIER Biosoft, USA)를 이용하여 enbocin의 sense (5'-TTTCTTGTTTCGTTGTTGTTTTCG-3') 및 anti-sense (5'-CGC GCTCGATTTCCCTTGA-3'), nuecin sense (5'-AAGGTGGGC GCATCGTT-3') 및 anti-sense (5'-CCGAGTAGTCATTCCGG TTGA-3')와 BmTf의 sense (5'-GGACTTGACGCTCCATTGT ATTAT-3') 및 anti-sense (5'-GCTGGGATTGTTCTCTGGTT TG-3') primer를 제작하였다. RT-PCR을 위해 우선 High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems Co., USA)을 이용하여 RNA부터 cDNA를 합성한 후 cDNA를 template로 각각의 primer를 이용하여 Bioneer (Korea)사의 AccuPower PCR Premix를 이용하여 [95°C (2분) → 1 cycle; 95°C (20초), 60°C (30초), 72°C (50초) → 25 cycle; 72°C (10분) → 1 cycle]을 수행한 후 PCR 산물은 1% 아가로스 겔에 전기영동 하였다.

누에의 조직별 및 다양한 스트레스제 주사 및 경구감염 후 시간 경과별 BmTf 유전자 전사체 검정을 위해 real-time PCR 및 정량적 (quantitative) RT-PCR을 수행하였다. TaKaRa (Japan)사의 SYBR premix Ex Taq 및 endogeneous control로서 *B. mori* actin의 sense (5'-GAAGCTGTGCTACGTCG CTCT-3')와 antisense (5'-CCGATGGTGATGACCTGACC-3') primer를 이용하여 relative quantification (RQ)를 수행하였다. 이때 사용한 stage별 condition은 ABI PRISM® 7300 real-time PCR System의 default 값을 취하였다. 정량적 RT-PCR

역시 real-time PCR과 동일한 primer를 이용하였으며 cycle 수는 25회를 취하였다.

### 유리 철(free iron) 양 측정

누에 혈림프(hemolymph) 내 유리 철 양 측정을 위하여 Serum Iron and Serum Iron Binding Capacity Assay Kit (Diagnostic Chemicals, USA)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 먼저 시료 및 standard에 ascorbic acid dissociating reagent를 섞은 후 595 nm에서 흡광도(A<sub>1</sub>)를 측정 한 후, color reagent를 부가한 다음 다시 595 nm에서 흡광도(A<sub>2</sub>)를 측정하였다. 그리고 누에 체액 및 standard에 ascorbic acid를 부가하고 binding buffer를 부가한 후 595 nm에서 흡광도(A<sub>3</sub>)를 측정하였다. 그리고 상온에서 20분간 반응 후 각각의 튜브에 color reagent를 부가한 후 상온에서 5분간 반응시키고 595 nm에서 흡광도(A<sub>4</sub>)를 측정하였다. 유리철분량(µM/l)은  $[(A_4 - A_3) \text{ hemolymph}] \div [(A_2 - A_1) \text{ standard}] \times \text{standard 농도}$ 에 의해 결정하였다.

## 결과 및 고찰

다양한 미생물 및 산화적 스트레스 부가 후 BmTf의 전사체 수준에서의 조직별 발현양상을 확인하기 위해 real-time PCR을 수행하였다(Fig. 1). BmTf의 조직별 발현양상은 정상누에 및 *E. coli*나 FeCl<sub>3</sub>를 각각 주사(injection) 및 경구감염(oral in-

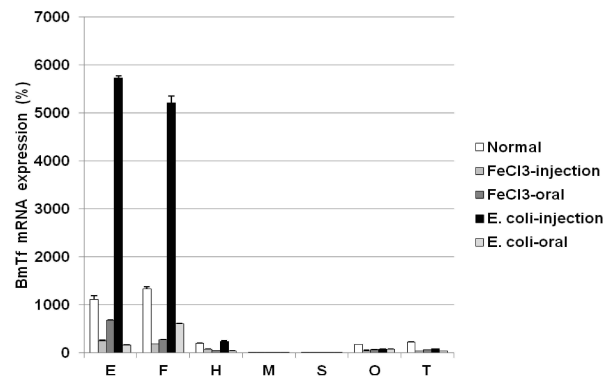


Fig. 1. Analysis of expression of BmTf transcript in various tissues after injection or feeding with *E. coli* or FeCl<sub>3</sub>, respectively. Total RNA was extracted from 5<sup>th</sup> instar larvae treated with *E. coli* or FeCl<sub>3</sub> (50 mM) at 12 hr post-infection. Total RNA was isolated from the following organs, E; epidermis, F; fat body, H; head, M; midgut, S; silk gland, O; ovary, T; testis, at 12 hr post infection, and cDNA was synthesized from the total RNA. To quantify the amount of BmTf gene expression, fluorescence real-time PCR was performed as described in Materials and Methods. The results are average of three independent experiments, and the error bar represents standard deviation.

fection) 시킨 후 12시간 경과한 누에를 사용하였다. 그 결과 *E. coli*를 주사한 경우에만 표피와 포유동물의 간에 해당하는 지방체(fat body)에서만 특이적으로 정상누에에서 보다 BmTf가 과발현됨을 확인할 수 있었고, *E. coli* 및 FeCl<sub>3</sub>의 경구감염과 FeCl<sub>3</sub>를 주사한 경우에는 BmTf의 전사체에서 과발현을 확인할 수 없었다(Fig. 1). 앞서 BmTf가 그람양성 및 음성세균, 곰팡이 및 바이러스의 주사에 의해 정상에 비해 과발현됨을 확인한 연구 결과[15]와 마찬가지로 그람음성세균인 *E. coli*를 경구감염한 경우에는 주사한 경우와 다르게 BmTf가 과발현되지 않으므로 세균이 혈림프 내에 들어왔을 때와 입을 통해 장으로 들어올 때 BmTf의 발현양상에서 큰 차이가 있음을 알 수 있었다.

선행 연구를 통해서 BmTf가 미생물의 종류와 상관없이 세균, 곰팡이 및 바이러스 주사에 의해 과발현됨을 확인하였으므로[15], 본 연구에서는 다양한 유도원으로 미생물뿐만 아니라 산화적 스트레스제를 주사한 후 BmTf의 발현양상을 체액성 면역에서 중요한 역할을 수행하는 항생펩타이드의 발현과 비교해 보았다. 기존에 누에로부터 보고된 cecropin계 항생펩타이드인 enbocin [9], attcin계 항생펩타이드인 nuecin [16]과 BmTf의 발현양상을 RT-PCR에 의해 비교해 보았다(Fig. 2). 그 결과, nuecin과 enbocin은 세균의 벽성분인 lipopolysaccharide (LPS)와 peptidoglycan에 의해서만 발현이 유도되는 반면, BmTf는 발현량 및 발현시기의 정도의 차이는 있지만 앞선 보고와 같이 세균뿐만 아니라 곰팡이 및 바이러스에 의해 과발현이 유도되었으나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> 및 Cu에 의한 산화적 스트레스에 의해서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 주사 후 발현이 다소 증가되었지만 거의 정상상태와 비슷한 수준의 발현을 보였다. 따라서 BmTf는 곤충 혈림프 내에 미생물의 종류와 상관없이 방어작용을 수행함을 추정할 수 있었고[15], 산화적 스트레스에 대해서는 Fig. 1에서와 유사하게 정상 상태에서와 거의 비슷한 수준의 발현을 나타내었다. 또한 항생 펩타이드인 enbocin과 nuecin은 미생물을 주사하지 않은 정상 상태에서는 거의 발현되지 않았지만, BmTf는 미생물이나 산화적 스트레스 유도제를 주사하지 않은 정상 상태에서도 일정량 발현이 유지됨을 확인할 수 있었다.

다음으로 BmTf의 생체방어적 역할이 포유동물의 면역 신호전달과정에 관련되어 있는지 여부를 조사하기 위해 누에 난소 유래 Bm5 세포주에 다양한 protein kinase inhibitor 처리 후 30분 및 2시간 경과시 BmTf 전사체 발현 양상을 조사하였다. Bm5 누에 세포주에 각각의 protein kinase (ERK, PLC, PKA, PI3K, MAPK, JNK) inhibitor 처리 후 30분 경과시에는 BmTf 전사체 발현수준이 정상 세포에 비해 대부분의 inhibitor를 처리한 경우 거의 정상세포주와 비슷한 수준을 유지하였다. 그러나 2시간 경과시에는 모든 처리구에서 BmTf 발현량이 증가하였으며 그 중 ERK inhibitor를 처리한 경우 정상에 비해 약 7.2배로 가장 발현량이 증가되었고 PLC inhibitor를

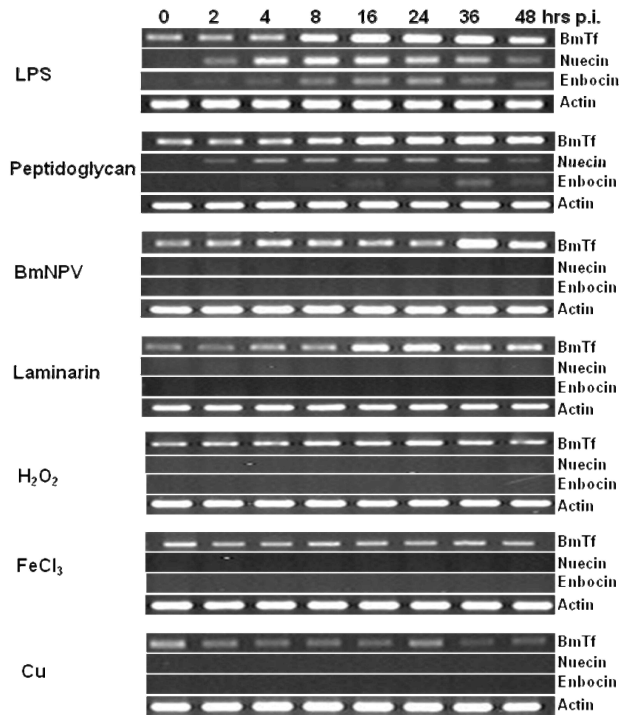


Fig. 2. Comparison of expression among transferrin, nuecin (attacin-like gene), and enbocin (cecropin-like gene) after treatment of various inducer. Total RNA was extracted from 5<sup>th</sup> instar larvae injected with LPS (1 mg/ml), peptidoglycan (1 mg/ml), laminarin (0.2 mg/ml), BmNPV (1×10<sup>5</sup> pfu/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM), FeCl<sub>3</sub> (50 mM), and Cu (1.2 mM) at 0, 2, 4, 8, 16, 24, 36, and 48 hr and cDNA was synthesized from the total RNA. We electrophoresed RT-PCR products amplified with each cDNA and BmTf, nuecin, and enbocin primers.

처리한 경우에 약 5.7배로 가장 적게 발현량이 증가되었음을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과를 통해서 BmTf는 Bm5 세포 내에서 ERK, PLC, PKA, PI3K, MAPK, 및 JNK에 의해 발현이 down-regulation됨을 추정할 수 있었다.

Tf의 주요 역할은 철 운반이지만 최근 곤충 Tf의 면역적 기능에 대한 많은 보고가 있었다[11,13,14,17]. 체내에 존재하는 유리 철(free iron)은 펜턴반응(Fenton reaction)으로 과산화자유기(superoxide radical) 형성을 통해 산화적 스트레스로 작용하여 세포 독성이 있으므로, Tf는 철 결합 단백질이어서 Fe<sup>3+</sup>와 결합을 통해 체내 유리 철 농도를 감소시켜 세포 독성을 줄이는 역할을 한다. 또한 체내에 유입된 병원균이 복제를 위해서 숙주의 철을 이용하는 것을 Tf가 Fe<sup>3+</sup>와 강하게 결합하여 병원균의 철 이용을 제한함으로써 세균발육을 저지(bacteriostatic)할 수 있는 환경을 만들어 병원균의 체내 생존을 힘들게 함으로써 생체방어 역할을 수행하는 것으로 추정되고 있으므로[2,6], 본 연구에서는 누에가 철과 미생물에 반응 후 체내 유리 철 양을 확인해 보았다(Fig. 4). 누에 5령 유충

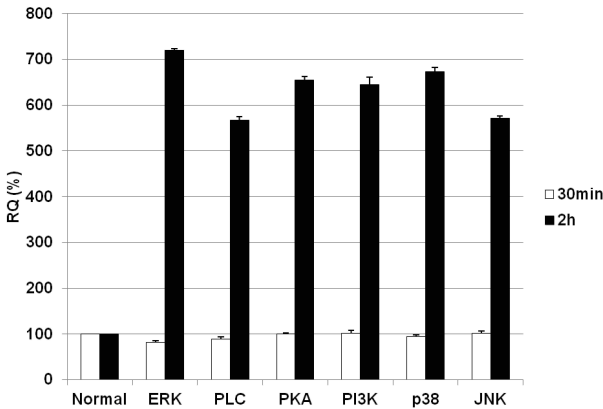
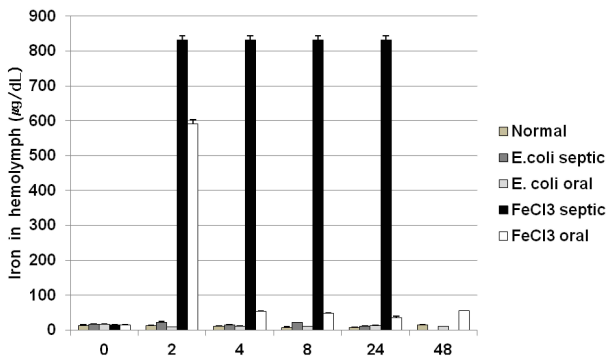


Fig. 3. Effects of various protein kinase inhibitors on BmTf mRNA expression. Bm5 cells were treated for 30 min and 2 hr with 20  $\mu$ M extracellular signal regulated kinase (ERK), 10  $\mu$ M phospholipase C (PLC), 500 nM protein kinase A (PKA), 20  $\mu$ M phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), 20  $\mu$ M p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK), and 20  $\mu$ M Jun N-terminal kinase (JNK), respectively. The values in the bar graph are the average of 3 repeated experiments.



	Normal	<i>E.coli</i> septic	<i>E. coli</i> oral	FeCl <sub>3</sub> septic	FeCl <sub>3</sub> oral
0	13.5	16	16	14	14
2	12.5	23	9.5	831.5	591
4	11	14	10.5	831.5	53.5
8	8	22.5	11.5	831.5	48
24	7	10.5	13	831.5	35
48	14	-	11.5	-	56

Fig. 4. Iron in hemolymph of *B. mori*. *B. mori* used in this experiment were normal, those injected and feeding with *E. coli* and FeCl<sub>3</sub>, respectively. Analysis of iron in hemolymph was executed using the Serum Iron and Serum Iron Binding Capacity Assay Kit (Diagnostic Chemicals, USA).

기점 때 철 대사 및 산화적 스트레스 유도원으로 FeCl<sub>3</sub> (50 mM)를 이용하고 면역반응의 유도원으로는 *E. coli* ( $1 \times 10^6$  cells/ml)를 이용해서 각각 주사 및 경구감염 후 0, 2, 4, 8, 24 및 48시간 경과시 누에 혈림프를 채취하여 혈림프 내 유리

철 양을 분석해 본 결과 *E. coli*를 경구감염 혹은 주사하였을 경우에는 혈림프 내 유리 철 양이 정상과 비슷한 수준이었다. 반면 FeCl<sub>3</sub>를 주사하거나 경구투여한 경우에는 고농도의 FeCl<sub>3</sub>를 투여하여서인지 일시적으로는 혈림프 내 유리 철 양이 정상상태보다 60-80배 정도 증가하였으나 경구투여의 경우에는 투여 후 4시간 쯤부터 감소되었는데 이는 체내 철 양의 항상성 유지 때문으로 추정된다. FeCl<sub>3</sub>를 주사한 경우에는 48 시간째에는 누에가 모두 치사하였으므로 철 양을 측정하지 못하였으나 치사 전 2~24시간 경과시까지 계속 철 양이 감소되지 못하고 혈림프 내에서 840  $\mu$ g/dl 이상이었다. 이러한 결과는 체내 도입한 철의 양이 매우 고농도여서 스스로 처리할 능력의 한계를 넘어섰기 때문에 체내에서 감소되지 않은 것으로 추정되고, 이러한 감소되지 않은 과다한 유리 철이 형성하는 과산화 자유기(superoxide radical)에 의한 산화적 스트레스로 인한 세포 독성 때문에 48시간 쯤 누에가 모두 치사된 것으로 추정된다. BmTf의 고유 기능이 철 운반 인데도 불구하고 체내에 존재하는 유리 철에 의해서는 BmTf의 발현은 거의 증가되지 않음을 알 수 있었고(Fig. 1, 2, 4), 미생물의 주사 시 정상에 비해 체내 유리 철 양의 변화는 거의 없었지만 BmTf는 세균, 곰팡이 및 바이러스 모두에 반응하여 과발현됨을 알 수 있었다(Fig. 1, 2, 4).

이상의 실험을 통해서 곤충 Tf의 고유기능인 철 운반 및 산화적 스트레스에 대한 방어 기능은 생존을 위해 필수적이지만 기본적인 발현수준으로 수행하는 것으로 추정되고, 미생물 침입시에는 미생물의 종류와는 무관하게 비특이적으로 과발현 되어 혈림프 내 미생물의 증식을 억제하는 역할을 수행하는 것으로 추정할 수 있다. 이 결과는 곤충 Tf의 또 다른 생체방어 메커니즘의 가능성을 제시한다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부에서 지원하는 2011년도 생명산업기술개발사업(311006-3)과 농촌진흥청에서 지원하는 어젠다 프로그램(#200902FHT010102002)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

### References

1. Agaisse, H., U. M. Petersen, M. Boutros, B. Mathey-Prevot, and N. Perrimon. 2003. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell* **5**, 441-450.
2. Aisen, P., Leibman, A. and J. Zweier. 1978. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem* **253**, 1930-1937.
3. Ampasala, D. R., S. C. Zheng, A. Retnakaran, P. J. Krell, B. M. Arif, and Q. L. Feng. 2004. Cloning and expression of a putative transferrin cDNA of the spruce budworm,

- Choristoneura fumiferana*. *Insect Biochem Mol. Biol.* **34**, 493-500.
4. Boutros, M., H. Agaisse, and N. Perrimon. 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev. Cell* **3**, 711-722.
  5. Gregorio, E. D., P. T. Spellman, G. M. Rubin, and B. Lemaitre. 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12590-12595.
  6. Gregorio, E. D., P. T. Spellman, P. Tzou, G. M. Rubin, and B. Lemaitre. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* **21**, 2568-2579.
  7. Gutteridge, J. M. 1994. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **738**, 201-213.
  8. Hultmark, D. 1993. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet.* **9**, 178-183.
  9. 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.
  10. Kimbrell, D. A. 1991. Insect antibacterial proteins: not just for insects and against bacteria. *Bioessays* **13**, 657-663.
  11. Kucharski, R. and R. Maleszka. 2003. Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* **3**, 1-8.
  12. Thompson, G. J., Y. C. Crozier, and R. H. Crozier. 2003. Isolation and characterization of a termite transferrin gene up-regulated on infection. *Insect Mol. Biol.* **12**, 1-7.
  13. Valles, S. M. and R. M. Pereira. 2005. *Solenopsis invicta* transferrin: cDNA cloning, gene architecture, and up-regulation in response to *Beauveria bassiana* infection. *Gene* **358**, 60-66.
  14. Yoshiga, T., V. P. Hernandez, A. M. Fallon, and J. H. Law. 1997. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12337-12342.
  15. Yun, E. Y., J. K. Lee, O. Y. Kwon, J. S. Hwang, I. Kim, S. W. Kang, W. J. Lee, J. L. Ding, K. H. You, and T. W. Goo. 2009. *Bombyx mori* transferrin: Genomic structure, expression and antimicrobial activity of recombinant protein. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 1064-1069.
  16. Yun, E. Y., S. H. Kim, S. W. Kang, B. R. Jin, K. Y. Kim, H. R. Kim, M. S. Han, and S. K. Kang. 1997. Molecular cloning and expression of the novel attacin-like antibacterial protein gene isolated from the *Bombyx mori*. *Korean J. Appl. Entomol.* **36**, 331-340.
  17. Yun, E. Y., S. W. Kang, J. S. Hwang, T. W. Goo, S. H. Kim, B. R. Jin, O. Kwon, and K. Y. Kim. 1999. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a transferrin homolog from *Bombyx mori*. *Biol. Chem.* **380**, 1455-1459.

## 초록 : 미생물 및 산화적 스트레스에 의한 누에 트랜스페린 발현

윤은영<sup>1</sup> · 권오유<sup>2</sup> · 황재삼<sup>1</sup> · 안미영<sup>1</sup> · 구태원<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부, <sup>2</sup>충남대학교 의과대학 해부학교실)

누에 트랜스페린(BmTf)의 면역적 기능을 분석하기 위해 다양한 미생물 및 산화적 스트레스를 부가한 누에에서 전사체 발현을 분석해 보았다. *E. coli*를 주사한 경우에만 표피와 지방체에서만 특이적으로 정상누에에서 보다 BmTf가 과발현 됨을 확인할 수 있었고, *E. coli* 및 FeCl<sub>3</sub>의 경구감염과 FeCl<sub>3</sub>를 주사한 경우에는 BmTf 전사체의 과발현을 확인할 수 없었다. 또한 세균에 의해서만 발현이 증가되는 항균펩타이드와는 다르게 BmTf는 미생물의 종류에 상관없이 세균, 곰팡이 및 바이러스에 의해 발현이 증가됨을 확인할 수 있었고, 이에 반해 산화적 스트레스인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cu 및 FeCl<sub>3</sub>에 의해서는 발현량의 변화가 없었다. 다양한 protein kinase inhibitor 처리 후 2시간 경과시에는 모든 처리구에서 BmTf 발현량이 증가하였으므로 BmTf는 ERK, PLC, PKA, PI3K, MAPK, 및 JNK에 의해 발현이 down-regulation<sup>4</sup>을 추정할 수 있었다. BmTf 발현의 주요 유도원을 확인하기 위해 *E. coli* 및 FeCl<sub>3</sub>를 각각 경구감염과 주사를 통해 누에 체내에 주입한 후 체내 유리 철 양을 분석한 결과, *E. coli* 주사 및 경구감염한 누에 체내에 철 양은 정상과 거의 유사한 수준이었고, FeCl<sub>3</sub>를 주입한 경우 철 양이 상당히 증가되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 통해 BmTf는 미생물 침입시 과발현되어 생체방어 작용을 수행하고, 기초적인 발현량으로 고유기능인 철 대사 및 산화적 스트레스 방어를 수행함을 추정할 수 있었다.