

Characterization of the Promoter Controlling the Stage-Specific Gene Expression of *Bombyx mori*Seung-Won Park<sup>1\*</sup>, Gwang-Ho Choi<sup>2</sup>, Tae-Won Goo<sup>1</sup>, Seong Ryul Kim<sup>1</sup> and Seok-Woo Kang<sup>1</sup><sup>1</sup>Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Korea<sup>2</sup>Research Policy Planning Division, Rural Development Administration, Suwon, Korea

Received August 19, 2011 / Revised September 15, 2011 / Accepted September 16, 2011

We characterized embryo early gene (EEG)-704 promoter of the silkworm *Bombyx mori*, which is specifically regulated in the development stages. To determine core promoter region, 10 different partial mutant clones were tested by luciferase assay in Sf9 cells. About 1.5 kb promoter shows higher luciferase activity than constitutive promoter (BmA3). Interestingly, EEG-704 shares the same DNA sequences with BmHsp20.8 by the result of BLAST analysis; its expression is also increased under heat shock condition. Development of such promoter inducible, directly or indirectly in the developmental-stage, is very useful in making recombinant proteins in transgenic silkworms.

**Key words** : *Bombyx mori*, embryo early gene, promoter, luciferase assay

## 서 론

누에나방과에 속하는 누에는 약 5천년 전 중국에서 최초로 사육되었고, 이후 한국, 일본, 인도 등지에서 생사를 생산하기 위해 지금까지 사육되고 있는 가장 유용한 곤충 가운데 하나이다[6,10]. 이와 같이 전통적인 누에의 가치는 생사를 생산하기 위함이 목표였으나 최근에는 생명과학 기술의 발달로 유전자 재조합 기술을 이용한 형질전환 누에 또는 의약품 곤충으로서 개발하기 위한 노력이 진행되고 있다[10]. 생사의 주요 성분 가운데 하나인 실크 피브로인 단백질은 조직공학 분야에서 지지체의 재료로 다양한 연구가 진행되고 있다. 현재 조직공학용 재료는 합성 고분자 재료를 이용해 연구 및 생산되고 있으나, 누에로부터 생산된 실크 피브로인 단백질은 천연 고분자 재료로서 합성 고분자 재료의 가장 큰 단점인 생체적합성의 문제를 해결 할 수 있는 유일한 재료로 인식되고 있다[3,10]. 또한 Baculovirus 등을 이용해 외래의 유용 유전자가 도입된 누에는 해당 유전자의 고 발현 및 인간과 유사한 단백질의 발현이 가능한 발현체계를 가짐으로 의약품 단백질 생산 공장으로서 연구가 진행이 되고 있다[3,4,10].

이미 일본에서는 2004년에 약 500 Mb 정도의 누에 게놈을 해독하였고[7], 11,000 개가 넘는 expressed sequence tags (EST) 유전자의 분석을 완료하였다[8,9]. Parthasarathy 등에 의해서 150,000개 이상의 유용한 누에 특이적 EST 정보가 활용 될 수 있게 되었으며[11], 2008년에는 일본과 중국 두 나라의 연구자들에 의해서 28개 전체 게놈을 해독하기 위한 연구가 개시되었다[6]. 누에 전체 게놈의 정보 해독을 통하여 모델

곤충으로 누에의 이용은 발생학과 유전학 분야에서 조직 및 시기 특이적인 발생에 관련한 유전적인 조절 기작을 이해하고 연구하는데 많은 도움을 줄 수 있다[6,10].

본 연구와 관련하여 선행된 연구에서는 누에(백옥잠) 초기 배아시기 특이적 발현 유전자(embryo early gene; EEG)의 발현 양상을 microarray 방법을 통하여 분석하여 1차 고 발현 유전자를 선발하였다. 선발된 유전자는 dot blot hybridization 방법을 사용한 2차 선발 과정을 통하여 총 10개의 누에 초기 배아시기 특이적 발현 유전자 후보로 결정하였다. 본 연구에서는 총 10개의 후보 유전자 가운데 하나인 EEG-704 유전자를 대상으로 선발하여 초기 배아시기 특이적 유전자의 발현 조절이 가능한 promoter를 결정하고자 하였다. 이를 위하여, 우선 EEG-704 유전자의 초기 배아시기 특이적 고 발현 양상은 RT-PCR 방법을 사용하여 확인 한 다음에 EEG-704 유전자의 개시 codon 상위의 예상 promoter 영역을 확보하고 적당한 유전자 분절(deletion mutant)을 구성하였다. Promoter의 활성을 분석하기 위한 방법은 Dual-Luciferase Reporter Assay 방법을 이용하였고, 대조군으로는 기존의 BmA3 (*Bombyx mori* Actin-3) promoter 유전자를 사용하여 활성을 비교하였다. 결과적으로 본 연구를 통하여 우리는 약 1,578 bp 크기의 누에 초기 배아시기 특이적 고 발현 promoter 영역을 결정하였다. 향후 본 연구를 통하여 개발된 시기 특이적 promoter 단편은 형질전환 누에 개발 등에 적용 될 경우 도입된 목적 유전자의 시기 특이적인 발현 조절을 통하여 효율적인 재조합 단백질 생산 뿐만 아니라 형질전환 누에 선발 시 초기 배아 시기에 형질전환 유무를 판단 할 수 있어서 시간 및 비용을 줄여 결과적으로 형질전환 효율을 증대 시킬 수 있는 중요한 요소가 될 수 있다.

## \*Corresponding author

Tel : +82-31-290-8493, Fax : +82-31-290-8503

E-mail : microsw@korea.kr.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용된 누에 배아는 잠123과 잠124의 교잡종인 백옥잠을 사용하였다. 각 시기별 배아 시료는 산란 직후(0 시간)부터 부화 직전인 최대 101 시간까지로 정하여 채취하였다. 간략히 설명하면, 우선 잠123과 잠 124 종을 교잡 후 채취된 누에 알은 산란 후 2시간에 처음 침산 전 누에 알 시료로 채취하며 5시간째에는 46°C로 고정된 16%의 염산액을 준비하여 약 6분간 침산처리를 하였다. 이후 시료는 일정한 시간 간격으로 채취하였고 액체질소에서 동결하여 -70°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

### Total RNA 추출

Total RNA는 각 시기별로 채취된 누에 알로부터 TRIZOL Reagent (MRC, Cincinnati, OH)를 사용하여 분리하였다. 적당량 양의 시기별 누에 알을 막자 사발에 액체질소와 함께 동결하여 잘 분쇄하고 분쇄된 시료는 1 ml의 TRIZOL Reagent를 첨가하여 혼합한 다음 200 ul의 chloroform을 더하여 교반한다. 14,000 rpm에서 원심분리하고 상등액을 새로운 튜브에 옮겨준 다음 500 ul 부피의 isopropanol을 첨가하여 교반한 후 14,000 rpm에서 원심분리한다. 이렇게 수집된 pellet은 70%의 에탄올을 사용하여 세척하여 건조해 준다. 잘 건조된 pellet은 0.2 % DEPC로 처리된 증류수를 첨가하여 녹여준 다음 -70°C에 보관하였다.

### cDNA의 합성 및 RT-PCR

각 시료로부터 분리한 total RNA는 5 unit의 DNase I 효소 (TAKARA Bio Inc., Japan)를 37°C에서 30분간 처리하여 genome DNA를 모두 제거하였다. 다음으로 Phenol/chloroform/isoamylalcohol (PCI) 추출 방법을 사용하여 RNA를 순수 분리하고 내재유전자인 Actin-3를 PCR 증폭하여 DNase I 효소에 의한 genome DNA의 제거를 확인하였다. 최종적으로 cDNA합성은 1 µg의 RNA를 *MaXim* RT-PCR Premix (iNTRON Biotechnology, KOREA) kit를 사용하여 제조사가

지시한 방법에 따라 합성을 실시하였다. EEG-704 cDNA 유전자의 발현 확인을 위한 RT-PCR 수행은 최초 95°C에서 2분 동안 예비 변성을 시킨 다음, 변성반응은 95°C 30초, 중합반응은 57°C에서 30초, 그리고 합성반응은 72°C 30초 반응을 조건으로 하여 30회 반복 수행을 한 후 최종적으로 72°C에서 2분간 반응하여 종결하였다. 본 연구에서 사용된 모든 primer에 대한 염기서열 정보는 Table 1에서 표시하였다.

### 예상 promoter 유전자 영역의 확보 및 유전자 분절 construct 제작

예상 promoter 영역은 우선 개시 codon 상위의 1,578 bp 영역을 최대 promoter 예상 영역으로 결정하고 게놈 DNA를 이용하여 PCR을 실시하여 확보하였다. 각 primer 쌍은 PCR 산물을 pGL3-Basic plasmid DNA (Promega, Madison, WI)에 삽입하기 위하여 forward primer는 *Xho*I 그리고 reverse primer는 *Hind*III 제한효소 인식 염기서열을 첨가하여 주었다 (Table 1). 주형 genomic DNA는 잠124로부터 추출하였고, PCR 수행은 최초 94°C에서 2분 동안 예비 변성을 시킨 다음, 변성반응은 94°C에서 30초, 중합반응은 56°C에서 30초, 그리고 합성반응은 72°C에서 2분 동안 반응을 조건으로 하여 20회 반복 수행을 한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 반응하여 종결하였다. PCR 증폭된 유전자는 pGEM-T Easy 벡터 (Promega)에 삽입한 다음 염기서열 분석방법을 이용하여 염기서열을 확인하였다. 확인된 1,578 bp의 최대 promoter 예상 영역 유전자는 *Xho*I (NEB, Ipswich, MA)과 *Hind*III (NEB) 제한효소를 사용하여 절단하고 분리하여 pGL3-Basic plasmid DNA의 동일한 제한효소 부위에 삽입하여 완성하였고 이를 pGL3-EEG704(A)로 명명하였다. 이후 예상 promoter는 핵심 promoter 영역을 확인하기 위하여 유전자 분절을 구성하였다. 서로 다른 크기의 유전자 분절은 각각 제작된 새로운 internal primer를 이용하였으며 (Table 1), 이 primer들 또한 pGL3-Basic plasmid DNA에 삽입하기 위하여 forward primer는 *Xho*I 그리고 reverse primer는 *Hind*III 제한효소 인식 염기서열을 첨가하여 주었다. PCR 증폭을 위한 주형 DNA는 pGL3-EEG704(A)를 사용하였다. PCR 증폭된 유전자는

Table 1. Primer pairs sequences

Primer Names		Sequences
Actin3	Forward	5'-gaagctgtgctacgtcgtc-3'
	Reverse	5'-ccgatggatgacacgacc-3'
EEG704 CDS	Forward	5'-tctgccggaagagatttcg-3'
	Reverse	5'-tgacagtcgcatccacag-3'
EEG704 Promoter(A)	Forward	5'- <i>ctcgagt</i> gttactagaactatttagtaaat-3'
EEG704 Promoter(B)	Forward	5'- <i>ctcgagt</i> tacacaattattgcagaca-3'
EEG704 Promoter(C)	Forward	5'- <i>ctcgagt</i> tacagtaattacaatcatg-3'
EEG704 Promoter	Reverse	5'- <i>aagctt</i> ggtgtattgtaattgtagta-3'

\* *Italic* means restriction enzymes recognition sites

pGL3-Basic plasmid DNA의 동일한 제한효소 부위에 삽입하였다.

Dual-Luciferase Reporter Assay 실시

Sf9 세포는 promoter의 활성을 분석하기 위해 각 plasmid 유전자를 도입하기 24시간 전에 24-well plate에 분주한 다음 27°C 배양기에서 배양하였다. Luciferase assay 실험은 대략 24-well plate 바닥에 80% 정도로 자란 세포를 이용하여 실시하였다. 각 1 µg의 deletion mutant plasmid DNA들과 대조군으로 pGL3-BmA3 plasmid DNA는 Fugene transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 Sf9 세포에 도입하였다. Renilla를 발현하는 pRLA-A3 plasmid DNA는 각 실험군과 대조군에 함께 세포에 도입함으로써 Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega)을 사용한 promoter의 활성분석 방법을 이용하였다. 방법을 간략히 기술하면, renilla를 발현하는 pRLA-A3 각 plasmid DNA는 실온에서 Fugene transfection reagent와 함께 혼합한 다음, 최종적으로 100 ul 부피가 될 수 있도록 무혈청, 무항생제 배지를 첨가하여 주었다. 100 ul 부피의 유전자 도입을 위한 혼합액은 이 후 상온에서 15분 동안 더 정치한 다음, 각 Sf9 세포가 자라고 있는 well에 첨가하여 주었다. 배양기에서 4시간 동안 배양한 다음 혈청과 항생제가 포함된 배지를 첨가하여 주고 72시간 동안 배양하였다. 각 promoter 후보 유전자의 활성 측정은 1X PBS로 세포를 세척하고 100 ul의 Passive lysis buffer를 첨가하여 세포를 파쇄한 다음 luminometer를 사용하여 luciferase와 renilla의 활성을 측정하였다.

또한 열충격에 의한 promoter 유전자의 활성 비교는 위와 동일한 방법을 사용하여 해당 유전자를 세포에 도입한 다음 27°C 배양기에서 68시간 동안 배양하고 42°C 배양기에서 1시간 동안 열충격을 시도하였다. 이후 열충격을 가한 세포는 다시 정상의 27°C 배양기에서 3시간 동안 배양한 다음 luciferase assay를 실시하였다.

결과 및 고찰

누에 EEG-704 유전자 발현 양상 분석

EEG-704 유전자의 초기배아 시기 특이적인 유전자 고발현 현상을 확인하기 위하여, 먼저 누에 알 시료는 시간 별로 수집하였다. Fig. 1에서 보여준 것 처럼, EEG-704 유전자의 발현양상은 침산처리 전과 후를 기준으로 약 9시간 까지 최대 발현을 보이다가 20시간 이후 현저히 감소하는 현상을 보였다. 초기 배아시기 고 발현 유전자 후보로써 본 연구에 사용된 EEG-704 유전자는 염기서열 분석 및 BLAST 검색을 통해서 누에 열충격단백질(BmHsp20.8; *Bombyx mori* Heat Shock Protein 20.8)임을 확인 할 수 있었다. Hsp20.8 단백질은 여러 열충격단백질 가운데 작은 크기에 속하는 단백질이다[13,15]. 현재 열충격단

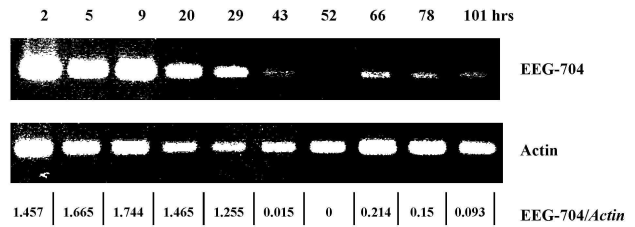


Fig. 1. RT-PCR expression patterns EEG-704 gene of *B. mori* in the embryo stage. We used RT-PCR method to amplify stage-specific and internal reference genes from the embryo tissue. Endogenous internal control gene (*Actin*) was detected in the whole embryo development stages. However, embryo stage-specific (EEG-704) gene was used to verify their stage-specific expression in this work. EEG-704 gene was tissue specifically expressed in the early embryo stage. The EtBr staining of PCR products are shown as a control for equal loading. Densitometric analysis of RT-PCR data obtained with ImageJ software. Representative results are shown. Fold enrichment = EEG-704/*Actin* cDNA.

백질의 역할에 대해서는 많은 연구보고가 있으며 세포의 발생 시기 또는 환경에 따라 발현이 조절되는 특징이 알려져 있다[15]. 본 연구에서는 특이적으로 Fig. 1에서 보인 것처럼 EEG-704 유전자는 초기 배아시기에 고 발현하는 현상을 보였다. 그러나 EEG-704 유전자는 초기 배아시기 이후 점차 감소하는 경향을 보이나 완전히 발현이 소실되는 것은 아니었다. 최근 연구보고는 초기 배아의 배발생(embryogenesis)과 관련하여 휴면기 알과 산란 후 48시간 이내에 다화성(multivoltine)을 유도한 비 휴면기 알에서 대사와 관련한 효소 및 열충격단백질의 발현율이 차이가 나는 결과를 보였다[12]. 따라서 본 연구에서 초기 배아시기 고 발현 유전자로서 EEG-704 유전자는 배(Embryo) 발생과 관련하여 중요한 유전자 가운데 하나로 예상된다. 또 다른 특성으로 52시간째 시료에서는 발현율이 완전히 소실되는 결과를 보였다. 열충격단백질의 특성에 관한 연구는 현재도 진행중인 상황으로서 완전히 이해되지 못한 상태이다. 다만 초파리 열충격단백질 70(HSP70)을 통하여 연구된 예를 보면, 이러한 단백질들은 배아시기와 G1 유충기 등 양쪽 시기에 특이적으로 발현함이 확인되었다[1,2,16], 배아시기 및 유충시기에 특이적으로 발생할 수 있는 열충격으로 부터 안정성을 유지하고자 하는 것으로 알려져 있다[15-17]. 본 결과는 이를 뒷받침 할 수 있는 결과이며 향후 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

EEG-704 유전자 발현 조절 예상 promoter 염기서열 분석 및 유전자 분절 구성

대상 유전자의 promoter 발굴을 위하여, 본 연구자들은 미국 국립생물정보센터(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)로부터 EEG-704 유전자의 개시 codon 상위의 약 2.0 kb 크기의 유전



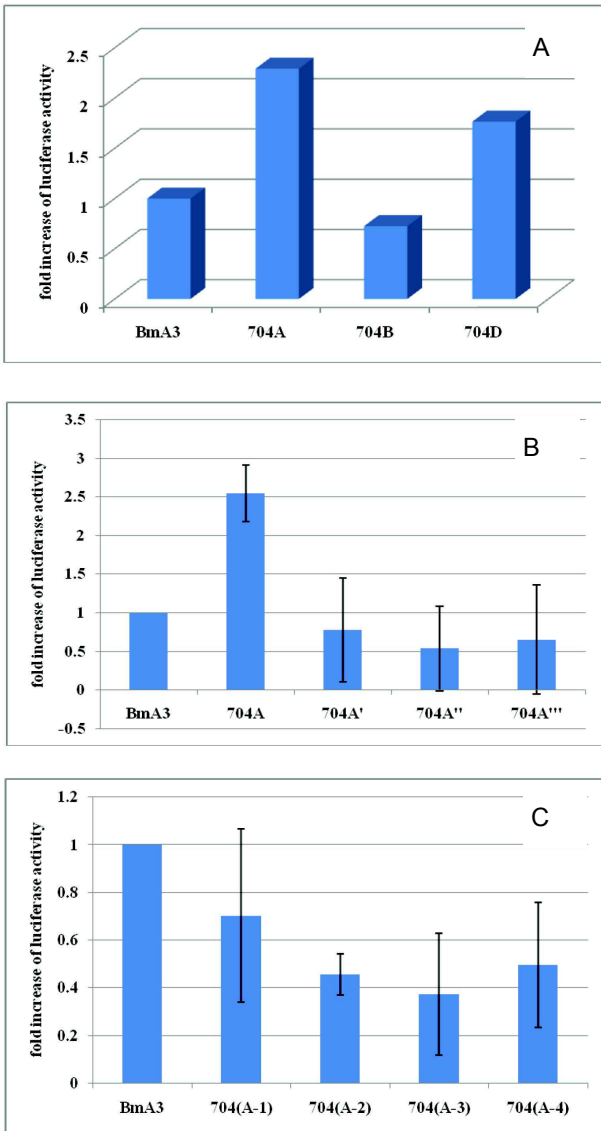


Fig. 3. Distribution of promoter strengths. The distribution of the promoter strengths for the 10 deletion mutant constructs we tested is shown in the Sf9 cells. We calculated promoter strength as a fold increase of luciferase activity over the positive controls (BmA3 promoter) in a given cell type. A, 5'-deletion mutant constructs were shown that whole promoter sequences more higher than BmA3 promoter. B and C, We calculated the coefficient of variance for each individual promoter in the Sf9 cells to estimate the variance of promoter strength. By measuring the standard deviation relative to the mean, we compared the variation between both strong and weak promoters.

이상의 결과를 통하여, 본 연구에서는 누에 배아시기 특이적 발현을 유도 할 수 있는 promoter로서 EEG-704 유전자의 개시 codon 상위의 약 1,578 bp 크기의 유전자 영역임을 확인 할 수 있었다. 앞서 Fig. 2B의 경우 promoter의 활성을 나

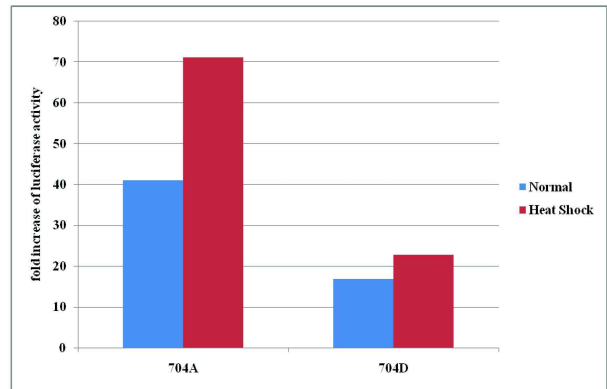


Fig. 4. Change promoter strengths of 704A and 704D by heat shock treatment. We calculated promoter strength as a fold increase of luciferase activity over the normal controls in the heat shock condition. The blue bars indicate promoter activity under the normal condition that fall above our threshold value for a functional promoter as an Hsp20.8.

타내기 위한 여러 요소들은 대부분 704(B) 영역 내부에 포함 이 되어 있어 이 영역이 promoter의 활성을 나타내는 핵심 영역으로 예상되었다. 그러나 예상과 달리 704(B) 영역보다 상위의 염기서열이 promoter의 활성을 증가시키는 핵심 영역으로 확인이 되었다. 본 연구와 유사하게 선행된 연구에서는 누에의 열충격 단백질-70(*BmHSC70-4*) promoter의 활성 검증의 경우 누에 유래의 세포주인 BmN 세포와 5령의 누에를 이용하여 각각 *in vitro*와 *in vivo* 시험을 실시하여 활성을 비교하였다[14]. 이 결과 *in vitro*와 *in vivo* 상태에서의 promoter 활성은 동일한 경향을 보였다. 다만, 그 활성을 나타내는 수치는 *in vitro*에 비하여 *in vivo*의 경우가 10배 높은 수치를 보였다[14]. 따라서 본 연구의 결과로 보여준 누에 배아시기 특이적 발현이 가능한 promoter 후보는 *in vitro*의 결과와 동일하게 전체 1,578 bp 유전자 영역을 포함하는 704(A) 영역과 동일할 것으로 판단되며 *in vivo*를 대상으로 하는 연구 및 개발에 사용 될 경우 이 보다 10배 정도 더 높은 활성을 보일 것으로 예상된다.

열충격에 의한 누에 배아시기 특이적 유전자 promoter의 활성 검증

위에서 설명한 것 처럼, EEG-704 유전자는 염기서열 분석 및 BLAST 검색을 통해서 누에 열충격단백질 20.8 (*BmHsp20.8*) 임을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서는 열충격에 의한 promoter의 발현조절 및 활성을 확인하였다. 전체 promoter 염기서열을 포함하는 704(A)와 704(D)는 정상 조건과 42°C 배양기에서 1시간 동안 열충격 조건을 시도한 경우와 비교하였을 때 각각의 발현율은 173.34% [704(A)]와 134.56% [704(D)]를 나타내어 열충격에 의한 유전자 발현이 증가하는

현상을 보였다(Fig. 4).

최근 연구보고에 의하면, 누에 열충격단백질70(BmHSP70)은 배아시기와 G1 유충기 등 양쪽 시기에 특이적으로 발현함이 확인되었고[1,2,16], 초파리를 대상으로 하는 연구에서 Hsp70 유전자 역시 열충격으로 부터 안정성을 유지하고자 배아시기 및 유충시기에 발현하는 것으로 알려져 있다[15-17]. 또 다른 연구 보고는, 누에 조직을 이용하여 여러 열충격단백질들(Hsp20.4, Hsp20.8, Hsp40, 그리고 Hsp70 등)의 발현율을 semi-quantitative RT-PCR 방법을 이용하여 확인하였다. 결과에 따르면, Hsp20.8의 경우는 38℃의 열충격 조건 보다 42℃의 조건에서 cDNA의 발현율이 더 높게 나타났으며 42℃ 조건에서 2시간 보다 1시간 열충격 조건이 좀 더 높은 발현율을 보였다. 또한 비 열충격 조건과 열충격 조건을 비교하였을 때 42℃에서 1시간 동안 열충격 후 cDNA의 발현은 약 150% 정도 더 증가하는 현상을 나타내었다[15]. 이러한 증가 현상은 본 연구결과보다 열충격에 의한 발현을 증가가 적은 것으로 본 논문의 결과와 차이가 있는 것으로 보인다. 그러나 우리는 외래 유전자를 곤충 세포주를 대상으로 도입하여 단백질 발현을 확인한 결과로서 semi-quantitative RT-PCR 방법을 이용한 것과의 차이로 해석된다.

본 연구를 통하여 개발하고자 하는 EEG-704 유전자 발현 조절 promoter는 형질전환 누에 개발 시 배아 시기특이적 고 발현이 가능함으로써 초기에 형질전환 유무를 쉽게 판단 할 수 있다는 장점을 이용하고자 함이 목적이었다. 즉, 형질전환 누에 제작을 위한 누에 알을 대상으로 목적 유전자의 도입 후 48시간 이내에 유전자의 도입 및 발현 유무를 판단 할 수 있으므로 형질전환 누에 개발에 소요되는 비용 및 시간을 현저히 줄일 수 있기 때문이다. 또 다른 관점으로, 열충격 조건에 의해 유도되는 유전자 발현 조절의 경우 누에 배아시기 특이적인 발현 목적의 promoter와 달리 704(D) 영역의 유전자 만으로도 충분히 inducible promoter로 사용이 가능함을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과를 통하여 개발된 누에 배아시기 특이적 고 발현이 가능함은 물론 열충격 조건에 의해 인위적으로 유도되는 promoter를 누에 형질전환에 적용함으로써 초기 배아시기에 형질전환 유무를 판단 할 수 있음은 물론 더 나아가 형질전환 누에를 확립한 다음 열충격에 의한 목적 단백질의 고 발현을 유도함으로써 형질전환 누에 개발의 가치를 높일 수 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 논문은 농촌진흥청의 에젠다 프로그램에 의한 연구비지원사업(과제번호: PJ006650022011)에 의해 연구되었음.

### References

1. Feder, M. E. 1996. Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model. In I. A. Johnston, and A. F. Bennett, eds., *Animals and Temperature: Phenotypic and Evolutionary Adaptation*, pp. 79-102, Cambridge University Press, Cambridge.
2. Feder, M. E., and R. A. Krebs. 1997. *Environmental stress, Adaption and Evolution*. pp. 155-173, Birkhauser, Basel.
3. Fuchs, S., X. Jiang, H. Schmidt, E. Dohle, S. Ghanaati, C. Orth, A. Hofmann, A. Motta, C. Migliaresi, and C. J. Kirkpatrick. 2009. Dynamic processes involved in the pre-vascularization of silk fibroin constructs for bone regeneration using outgrowth endothelial cells. *Biomaterials* **30**, 1329-1338.
4. Gong, Z. H., H. Q. Jin, Y. F. Jin, and Y. Z. Zhang. 2005. Expression of Cholera Toxin B Subunit and Assembly as Functional Oligomers in Silkworm. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 717-724.
5. Goo, T. W., S. W. Kim, S. R. Kim, S. W. Park, S. W., Kang, K. G. Lee, O. Y. Kwon, and E. Y. Yun. 2010. Utilization of the *Bombyx mori* Hypothetical Protein 32 Promoter for Efficient Transgene Expression. *Int. J. Indust. Entomol.* **20**, 107-114.
6. International Silkworm Genome Consortium. 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 1036-1045.
7. Mita, K., M. Morimyo, K. Okano, Y. Koike, J. Nohata, H. Kawasaki, K. Kadono-Okuda, K. Yamamoto, M. G. Suzuki, T. Shimada, M. R. Goldsmith, and S. Maeda. 2003. The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14121-14126.
8. Mita, K., M. Kasahara, S. Sasaki, Y. Nagayasu, T. Yamada, H. Kanamori, N. Namiki, M. Kitagawa, H. Yamashita, Y. Yasukochi, K. Kadono-Okuda, K. Yamamoto, M. Ajimura, G. Ravikumar, M. Shimomura, Y. Nagamura, T. Shin-I, H. Abe H, T. Shimada, S. Morishita, and T. Sasaki. 2004. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* **29**, 27-35.
9. Ote, M., K. Mita, H. Kawasaki, M. Seki, J. Nohata, M. Kobayashi, and T. Shimada. 2004. Microarray analysis of gene expression profiles in wing discs of *Bombyx mori* during pupal ecdysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 775-784.
10. Park, S. W., S. W. Kang, T. W. Goo, S. R. Kim, G. G. Lee, and S. Y. Paik. 2010. Tissue-specific gene expression analysis of silkworm (*Bombyx mori*) by Quantitative Real-Time RT-PCR. *BMB Rep.* **43**, 480-484.
11. Parthasarathy, R., and K. P. Gopinathan. 2005. Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Gene Expr. Patterns* **5**, 323-339.
12. Ponnuvel, K. M., G. N. Murthy, A. K. Awasthi, G. Rao, and N. B. Vijayaprakash. 2010. Differential gene expression during early embryonic development in diapause and non-diapause eggs of multivoltine silkworm *Bombyx mori*. *Indian J. Exp. Biol.* **48**, 1143-1151.
13. Sakano, D., B. Li, Q. Xia, K. Yamamoto, H. Fujii, and Y. Aso. 2006. Genes encoding small heat shock proteins of the

- silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **70**, 2443-2450.
14. Tang, S., Q. Zhao, Y. Yi, Z. Zhang, and Y. Li. 2005. Homologous region 3 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus enhancing the transcriptional activity of heat shock cognate 70-4 promoter from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **69**, 1014-1017.
15. Velu, D., K. M. Ponnuel, and S. M. Hussaini Qadri. 2008. Expression of the Heat Shock Protein Genes in Response to Thermal Stress in the Silkworm *Bombyx mori*. *Int. J. Indust. Entomol.* **16**, 21-27.
16. Welte, M. A., J. M. Tetrault, R. P. Dellavalle, and S. L. Lindquist. 1993. A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Curr. Biol.* **3**, 842-853.
17. 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.

---

초록 : 누에를 이용한 시기 특이적 발현 조절 유전자 promoter 개발

박승원<sup>1\*</sup> · 최광호<sup>2</sup> · 구태원<sup>1</sup> · 김성렬<sup>1</sup> · 강석우<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과, <sup>2</sup>농촌진흥청 연구정책국 연구정책과)

본 연구에서는 누에의 초기 배아시기에 유전자 발현 조절이 가능한 EEG-704 promoter를 개발하고자 하였다. Promoter의 핵심 영역을 결정하기 위하여, 10개의 서로 다른 partial mutant clone들을 만들고 이를 Sf9 곤충세포주에 도입하여 luciferase assay 방법을 사용하여 각각의 clone의 활성을 분석하였다. Constitutive promoter인 BmA3 promoter에 의한 활성과 비교하였을 때, 약 1.5 kb의 promoter 염기서열을 포함하는 clone이 가장 높은 luciferase 발현율을 나타내었다. 특히 EEG-704 유전자의 경우 BLAST를 이용한 유전자 비교·분석의 결과 누에의 열충격 단백질20.8 (BmHsp20.8) 과 동일한 것으로 밝혀졌으며, 정상 온도조건과 비교하였을 때 열충격을 가한 조건하에서 발현율이 증가하는 현상을 나타내었다. 특이적으로 발생단계에서 직·간접적으로 발현 조절이 가능한 이러한 promoter는 여러 유용 재조합 단백질 생산을 위한 형질전환 누에 개발 시 매우 유용할 것으로 생각된다.