

## 누에 중장유래 생체방어 관련 유전자 개발 연구

최광호\* · 구태원 · 김성렬 · 박승원 · 김성완 · 강석우  
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

### A Study on the Development of an Immune Related Genes from Midgut of Silkworm

Kwang-Ho Choi\*, Tae-Won Goo, Seong-Ryul Kim, Seung-Won Park, Sung-Wan Kim, Seok-Woo Kang

Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

(Received April 18, 2012, Accepted October 16, 2012)

#### ABSTRACT

This study was aimed for identification of a useful genetic resources from the entomopathogenic bacteria infected-midgut of the silkworm, *Bombyx mori* L. We analyzed the appropriately midgut-immunizing condition of 4<sup>th</sup> instar larvae by a feeding infection using several entomopathogenic bacteria. *Xenorhabdus nematophila* was selected as a suitable bacteria for midgut immunization of Jam 123, *B. mori*. We constructed a subtraction cDNA library from the mRNA of the immunized midgut, respectively. A total of 1,000 clones were randomly selected from the subtracted cDNA library, and then performed a differential display hybridization analysis with forward and reverse probes. In conclusion, nine clones were identified as differential expressed genes, which presumed that these genes were involved in gut immunity of silkworm. The total number of clones analyzed in this work is not enough to have a brief overview of a understanding on the midgut immunity factors of silkworm. Therefore, further defined studies on these molecules biological roles will give us well-fined information about the innate immune mechanism of silkworm.

**Key words** : Silkworm, Midgut, Subtraction cDNA library

#### 서 론

곤충은 오랜 진화과정을 통해 자신들의 생명력 유지를 위해 다양한 방법의 세포성 및 체액성 면역기작을 발휘하고 있다(Ratcliffe et al. 1985). 세포성 면역은 혈구에서의 면역반응으로서 식균작용, 소낭형성, 피막형성 등으로 구분되며, 체액성 면역은 지방체와 일부혈구세포에서 합성되어지는 항생물질에 의한 살균 및 옵소닌(opsonin) 반응이 잘 알려져 있다(Stanley 2000).

누에(*Bombyx mori*)는 대표적 산업곤충으로서 또한, 나비목 해충을 대표하는 곤충으로써 오랜 연구 역사를 가지고 있으며, 특히 누에 체강에 침입한 세균침입에 대한 체액성 면역기작에 의한 cecropin(Steiner et al. 1981), attacin(Hultmark et al. 1983), defencine(Hara and Yamakawa, 1995) 및 moricin(Furukawa et al. 1999) 등 다수의 항균 단백질(펩타이드)이 분리된 바 있다. 하지만, 기존의 연구

가 면역원의 체강 내 인위적 주입에 의한 면역기작 유발에 의한 것으로서 혈구 및 지방체 등에 의해 분비된 항세균 펩타이드가 대부분이며, 섭식감염에 의해 유발된 면역관련 인자의 개발 및 이용에 관한 보고는 극히 드물어, 누에의 병원성 세균의 섭식 감염에 의한 중장 위식막 및 피막 세포층에서의 면역 현상 및 관련 면역 유전자 발굴 등 폭넓은 연구가 이루어지지 못한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 곤충 유래 신기능성 의약품 개발 및 환경친화형 표적 농약 개발을 위한 천연 소재 개발을 위한 기초연구로서, 병원성 세균의 섭식 감염을 유발한 누에 중장으로부터 유도된 면역 관련 인자를 발굴하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 공시 누에 품종

국립농업과학원 잠사양봉소재과에서 인공사료로 사육된

\*Corresponding author. E-mail: ckh@korea.kr

잠123, 잠124, 잠125 및 Daizo(sdi) 원종을 사용하였다. 누에 증장 면역기작 유발을 위한 적정 감염원 및 감염 조건 분석은 4령 누에를 이용하였다.

## 2. 공시 곤충병원성 세균

실험에 사용된 곤충병원성 세균류는 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양받은 *Xenorhabdus nematophila* (KACC 12145), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (KACC 10196), *Enterococcus faecalis*(KACC 11304), 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 *Proteus mirabilis* (KCCM 11797, KCCM 11798), 대조균으로서 *Bacillus cereus* 및 *Escherichia coli*를 사용하였다. 세균 배양은 NA(Nutrient agar, Difco, USA) 및 TSA(tryptical soy agar, Difco, USA) 배지에서 36시간 동안 26°C, 37°C에서 각각 배양하였다 (Kim et al. 2002, Park et al. 2003).

## 3. 병원력 조사

실험에 사용된 각각의 곤충병원성 세균은 배양 후 0.7% NaCl 용액을 이용해 10<sup>7</sup> cfu(colony forming unit)/ml 농도로 현탁액을 만들어 병원성 검정을 위한 접종원으로 사용하였다(Park et al. 2003). 병원성 검정은 4령 기잠 누에를 사용하였으며, 멸균된 누에 인공사료 2g에 100 µl씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 건조시켰다. 세균이 첨부된 인공사료는 누에 개체 당 2g씩 공급한 후 25 ± 2°C, 60 ~ 80% 상대습도 환경에서 사육하였다. 치사율은 24시간 단위로 조사하였으며, 자극에 대한 움직임 여부에 따라 치사 유무를 확인하였다.

## 4. 증장 total RNA 순수분리 및 cDNA subtraction

병원성 세균에 대한 적정 면역기작이 유발된 누에로부터 추출된 증장조직을 액체질소가 담긴 유발에서 마쇄한 후 Total RNA isolation kit(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 total RNA를 순수분리하고 분광광도계로 정량하였다. 100 µg의 total RNA로부터 Micro-FastTrack 2.0<sup>TM</sup> mRNA Isolation Kit(Invitrogen, Calsbad, CA)를 사용하여 10 µg의 mRNA(poly dA<sup>+</sup>RNA)를 순수 분리하였다. 순수 분리한 mRNA로부터 PCR-select<sup>TM</sup>cDNA Subtraction kit(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 subtraction cDNA 유전자은행을 제작하였다. 우선, 감염 누에 증장 및 정상 누에 증장 mRNA 동량(1 µg)으로부터 각각의 double strand cDNA를 합성한 후 제한효소 *Rsa* I으로 처리하였다. 제한효소로 절단된 감염 누에 증장 발현 유전자 cDNA(Tester)는 동량의 두 개 그룹으로 나누어 adaptor 1 과 adaptor 2를 각각 부착시켰다. Subtraction hybridization 은 제한효소(*Rsa* I) 처리된 정상 누에 증장 발현 유전자

cDNA(Driver)를 adaptor 1 및 adaptor 2가 부착된 각각의 tester cDNA 시료와 동량 혼합하고 95°C, 2분간 변성하고 68°C, 8시간 annealing 함으로서 1차 hybridization 반응을 종료하였다. 계속해서, 1차 hybridization 반응 산물인 두 개의 tester cDNA를 즉시 혼합하여 68°C, 20시간 반응함으로써 2차 hybridization 반응을 종료하였다. 1차 및 2차 차별화 hybridization 반응(normalization)을 통해 구축된 세균감염 면역관련 유전자 pool은 유전자(cDNA) 단편의 양편에 서로 다른 adaptors가 부착됨으로서 adaptors 특이서열 프라이머를 이용한 1차 PCR(94°C 30초, 66°C 30초, 72°C 90초; 27 cycles) 및 2차 PCR(94°C 30초, 68°C 30초, 72°C 90초; 12 cycles) 한 후, 순수 정제한 2차 PCR 산물(200 bp 이상)을 pGEM-T easy Vector (Promega)에 클로닝 함으로써 subtracted cDNA 유전자은행을 제작하였다.

## 5. Subtractive hybridization

제작된 subtracted cDNA 유전자은행으로부터 무작위 1,000개 클론을 선발, ampicillin이 첨가된 LB 액상배지 1 ml에서 37°C, 12시간 진탕배양한 후 Plasmid miniprep kit(Dyne Bio Inc, Korea)을 사용하여 각각의 플라스미드 DNA를 순수 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA는 100°C, 5분간 변성시킨 후 두 장의 나일론 막에 각각 동량(500 ng)을 점적하였다. 차별화선별을 위해 subtraction cDNA 유전자은행 제작에서의 1차 PCR 산물을 사용하였는데, forward probe(subtracted tester cDNA)와 reverse probe(subtracted driver cDNA) 각각 제작하여 면역관련 발현 유전자 선별을 위한 탐침으로 사용하였다. 탐침제조는 1.5 ml 튜브에 준비된 각각의 subtracted cDNA(100 ng)로부터 Prime-It II random Primer Labeling kit(Stratagene)을 사용하여 방사성동위원소[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP(3,000 Ci/mmol)로 표지 후, dot hybridization 분석에 사용하였다. Dot hybridization은 방사성동위원소가 표지된 각각의 subtracted cDNA가 포함된 hybridization 용액(20% × SSC, 5 × Denhardt's solution, 0.5% SDS, 50 mg/ml denatured salmon sperm DNA)에서 65°C, 16시간 반응시켰다. 이후 나일론 막은 3회의 세척 과정을 거친 후 X-ray film(Kodak)으로 감광하였다.

## 6. 부분염기서열분석 및 정보분석

선발된 차별화 발현 클론은 자동염기서열 분석 장치 CEQ 8000 Genetic Analysis System(Beckman caulter, USA)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 후 유전자 정보 분석은 BLAST alignments를 통하여 상동성 분석 후 선발 유전자 정보 및 GenBank accession number를 수록하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 세균 섭식감염 및 치사율

누에 병원성 세균으로서는 누에 소화기 계통의 무름병을 유발시키는 *B. sotto*, *B. prodigious*, *S. faecalis* 등이 대표적이며, 이들 세균이 누에 소화기관에서 번식하며 공동병, 축소병, 설사병 및 무름병 등을 유발한다고 알려져 있다(Dales 1979). 또한 누에 혈장에서 번식하여 패혈증을 일으키는 병원균으로서 *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Clostridium* *Micrococcus* 속이 알려져 있다. 특히, *Proteus*, *Serratia*, *Streptococcus* 및 *Xenorhabdus* 속 일부 균은 누에 체강주입 뿐 아니라 섭식감염에 의해서도 아주 높은 병원력을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Park et al. 2003, Kim et al. 2002, Dales 1979).

본 연구에 사용된 세균은 *X. nematophila* 및 *P. mirabilis* 등 5종을 배양 후 적정 농도로 준비하고 섭식 누에 개체당 세균농도를  $5 \times 10^6$  cfu 이상으로 멸균된 인공사료에 첨가하여 4령 기잠 누에에 섭식시킴으로서 감염을 유도하였다. 병원성 세균 섭식감염에 의한 치사율은 매 24시간 간격으로 치사된 개체 수를 조사한 결과, 실험에 사용한 병원성 세균류는 누에 품종에 따라 병원력의 현저한 차이를 나타내었다. 잠124와 sdi 누에 품종에서는 사용한 모든 세균에서 대체로 저조한 치사율을 나타낸 반면, 잠123과 잠125 품종에서는 사용한 대부분 세균에서 대체로 높은 이병률을 나타내었다. 누에 품종별 최고치사일수는 잠123과 잠

125에서는 섭식감염 후 약 8일경과 후, 잠124와 sdi에서는 각각 약 7일과 약 12일 이후로 조사되었다(data not shown).

Fig. 1은 세균 섭식감염 후 8일째의 치사율을 나타낸 것으로서, 잠123은 *X. nematophila*에 의한 치사율이 약 65%로서 가장 높았으며, 잠125에서는 *S. aureus* 및 *P. mirabilis*에 의한 치사율이 각각 약 80% 및 약 95%로 조사되었다. 또한 잠124와 sdi에서는 *P. mirabilis*와 *X. nematophila*가 각각 45%와 32%의 병원력을 보였다. 이상의 결과로서 곤충 병원성 세균의 섭식감염에 의한 누에 중장면역기작 관련 인자 선발을 위한 누에 품종 및 세균으로서 *X. nematophila*에 감염 후 7일 경과된 살아있는 잠123 누에의 중장 발현 전사체를 사용하기로 결정하였다.

Kim et al.(2002)은 칠보잠(F1, 잠107×108) 체강에 세균을  $5 \times 10^6$  cfu 농도로 누에 체강에 주사 감염 시켰을 때 접종 6일 후부터 치사되기 시작하여 10일 경과 후 처리된 유충이 모두 치사된다고 하였는데, 치사된 누에는 뚜렷한 무름병 증상을 나타내었다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 치사된 누에 유충에서 뚜렷한 무름병 증상을 확인할 수 있었으나 최고치사일수에 있어서는 다소 차이가 있는 것으로 확인되었다. 이러한 현상은 누에 품종별 병원체 감수성의 차이 때문으로 사료된다(Choi et al. 2003).

### 2. cDNA subtraction 및 hybridization

세균 섭식감염 후 7일 경과 후 살아있는 누에 중장(Tester) 및 무처리 누에 중장(Driver)으로부터 각각 3 µg의 mRNA

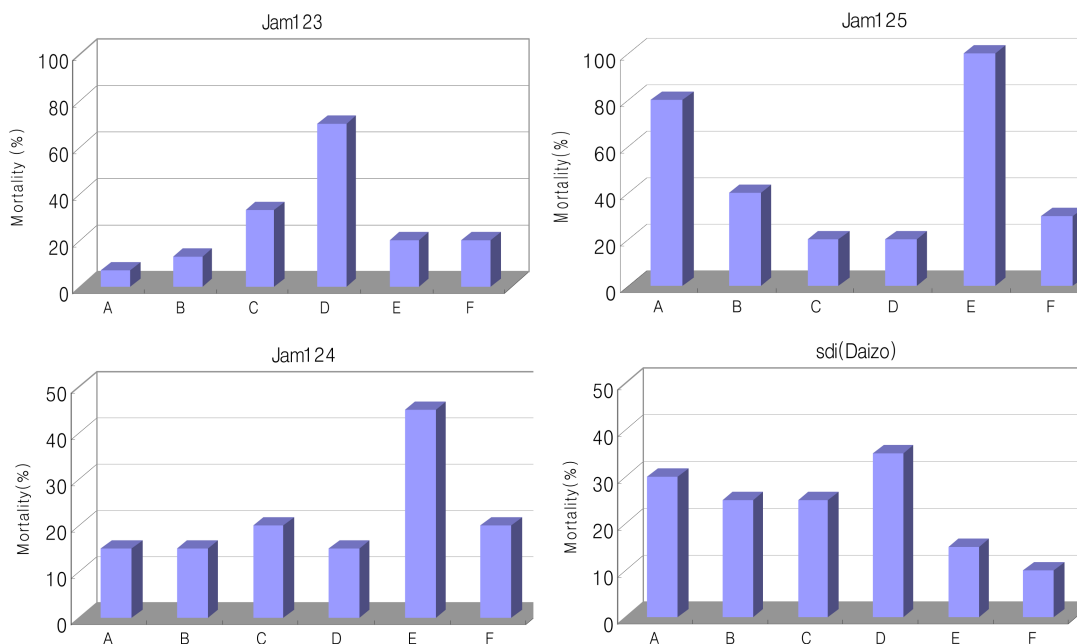
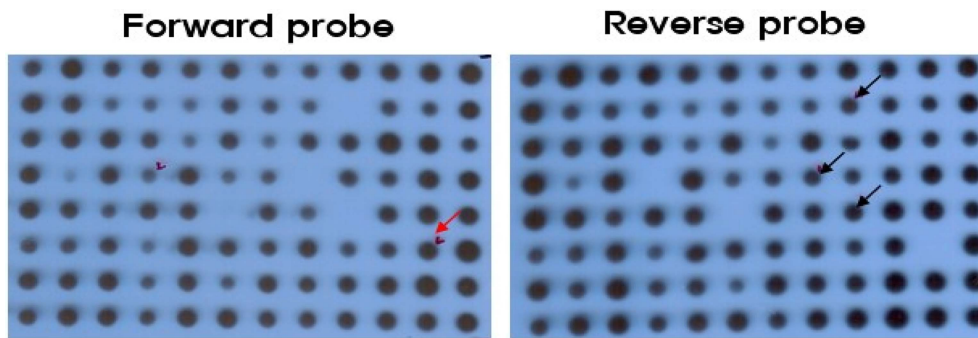


Fig. 1. Mortality ratio of the larvae by feeding-infection of several entomopathogenic bacteria. A, *S. aureus*; B, *B. cereus*; C, *E. faecalis*; D, *X. nematophila*; E, *P. mirabilis*; F, *P. mirabilis*.

**Table 1.** Identification of up-regulated clones related to a gut defence system of silkworm, *Bombyx mori*

clone ID	bp	Identification	species
GD011	208	heat shock protein 20 mRNA	B. mori
GD143	180	Qingahou mitochondrion	B. mandarina
GD167	300	B. mori J037 cytochrome C oxidase subunit I-like mRNA	B. mori
GD175	360	Unknown mRNA	M. capitata
GD187	320	mRNA for dicentrarchus labrax CC chemokine 2	D. labrax
GD268	508	transposase mRNA partial CDs.	S. chuatsi
GD282	280	Ribosomal protein L5 mRNA	B. mori
GD332	180	Trypsin-like protease mRNA	B. mori
GD454	608	Troponin I(Wupa)	B. mori



**Fig. 2.** Differential display hybridization. Red and black arrows indicate up-regulated clones by the forward and reverse probes, respectively.

를 순수분리하여 subtracted cDNA pool을 제작하고 pGEM-T vector 클로닝 함으로써 subtraction cDNA 유전자은행을 제작하였다. 제작된 subtraction cDNA 유전자은행으로부터 무작위 선발된 1,000여개 클론은 각각 배양, 순수 분리하였다. 분리된 플라스미드는 고온에서 변성 후 동량 (500 ng)씩 두 장의 나일론 막에 점적하여 차별화선별을 수행하였다. 차별화선별에 사용된 탐침은 동일한 조건으로 각각 제작된 subtracted tester cDNA(forward probe)와 subtracted driver cDNA(reverse probe)를 사용하였다. 차별화선별 결과, forward probe에서의 과발현 clone은 1점, reverse probe에서 과발현 클론은 8점이 각각 선발 되었다 (Fig. 1).

### 3. 누에 중장 면역 유전자 정보분석

선발된 누에 중장 면역 관련 클론은 유전정보 분석을 위해 부분 염기서열 분석 후 BLAST 검색엔진 및 online DB를 활용하여 유전정보 상동성을 분석 한 결과, 유일하게 forward probe에서 과발현 한 클론(GD282)은 ribosomal protein L5 mRNA와 높은 상동성을 나타내었다(Table 1). Ribosomal protein L5는 5S rRNA binding protein의 large subunit으로서 5S rRNA 분자 결합을 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Takashi et al. 2001). 최근 RNA

molecules은 spliceosome에서 mRNA 전구체 splicing 기작 및 ribosome에서의 peptide-bond 형성 과정에 관여하는 등 세포의 성장에 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고 되고 있다(Burge et al. 1999, Nissen et al. 2000). 또한, RNA molecules의 기능이 RNA binding proteins 과의 밀접한 연관성을 갖고 있어 생명현상의 이해도를 높이기 위한 RNA-protein 상호작용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Takashi et al. 2001), 또한, 본 연구결과 Reverse probe에서의 과발현 클론 즉, 병원성 세균에 의해 중장 내 발현량이 감소된 전사체는 heat shock protein 20 mRNA(GD011) 등 8종이 확인되었는데, 이들 대부분은 세포 내 단백질의 전사조절에 관여하는 유전자로서 세포사멸 기구와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 곤충병원성 세균 *X. nematophila*의 섭식 감염 후 중장에서 유도된 천연 면역 인자를 선발하기 위해, subtraction 유전자은행 제작 및 differential display hybridization 기술을 이용하여 최종 9점의 유전인자를 선발하였다. 본 연구에서는 폭 넓은 누에 천연 면역 메커니즘을 이해하기 위한 수준의 많은 수의 유전자 분석이 이루어지지 못하였다. 하지만 본 연구를 통해 선발된 9종의 누에 중장 유래 면역 인자들은 향후 지속적인 분자생물학적 특성 구명과 함께 면역기구에 기여하는 생리학적 기

능해석 연구를 지속한다면 향후 천연 의약품 개발을 위한 선도물질로서 활용도 가능할 것으로 기대된다.

## 적 요

본 연구는 누에 증장으로부터 면역 관련 유전자를 대량 발굴하고 발현 특성을 분석함으로써 곤충 유래 신기능성 의약품 개발을 위한 유전자 소재를 발굴하고자 하였다. 우선 곤충병원성 섭식에 의한 누에 품종에 따른 증장 면역원으로서 적성 병원성 세균인 *X. nematophila* 등을 선발하고 누에 천연 면역인자의 발굴을 위해 최적 감염 조건을 설정하였다. 감염된 누에 증장 mRNA를 순수 분리하여 subtraction cDNA 유전자은행 1종씩 제작하고, subtractive differential display hybridization 방법에 의해 누에 증장 면역관련 유전인자를 선발하였다. 선발된 유전자의 정보 분석 결과, 세포 내 다양한 생물학적 기능을 수행하는 것으로 알려진 ribosomal protein L5 mRNA 등 면역 관련 유전자 9종을 선발하였다. 본 연구에서 선발된 누에 천연 면역 관련 인자는 신기능성 의약품 소재로 개발하기 위해서는 기능분석 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (No. PJ008475012012)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

Burge CB, Tuschl T, Sharp PA(1999) Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In: Gesteland RF, Cech TR, Atkins JE, eds. The RNA world, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. pp. 525~560.

Choi KH, Kang SW, Hwang JS, Goo TW, Yun EY, Lee SM, Sohn HD, Jin BR(2003) Construction of a transgenic silkworm carrying the fibroin gene of the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*. Int J Indust Entomol **6**, 49~55.

Dales RP(1979) Defence of invertebrates against bacterial infection. J R Soc Med **72**(9), 688~696.

Furukawa S, Tanaka H, Nakazawa H, Ishibashi J, Shono T, Yamakawa M(1999) Inducible gene expression of moricin, a unique antibacterial peptide from the silkworm(*Bombyx mori*). Biochem J **340**, 265~271.

Hara S, Yamakawa M(1995) A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem J **310**, 651~656.

Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG(1983) Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. EMBO **2**(4), 571~576.

Kim GH, Park YG, Kim YG(2002) Identification of pathogenic bacterium, *Staphylococcus gallinarum*, to *Bombyx mori*. Korean J Appl Entomol **41**(4), 279~284.

Nissen P, Hasen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA(2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science **289**, 920~930.

Park YG, Kim GH, Kim YG(2003) Comparative analysis of host insect immunodepression induced by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* and *Staphylococcus gallinarum*, with differential pathogenicities. J Appl Entomol **42**(4), 353~360.

Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Rhodes CP(1985) Invertebrate immunity-basic concepts and recent advances. Invertebr Rev Cytol **97**, 183~350.

Stanley DW(2000) Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. Princeton university Press. pp. 277. New Jersey.

Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG(1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. Nature **292**, 246~248.

Takashi N, Yao M, Kawamura S, Iwasaki K, Kimura M, Tanaka I(2001) Ribosomal protein L5 has a highly twisted concave surface and flexible arms responsible for rRNA binding. RNA **7**, 692~701.