

호박벌의 휴면 제어 관련 유전자 탐색 및 특성 분석

황재삼* · 박인균 · 윤은영 · 정덕웅 · 윤희주 · 이상범 · 김성렬 · 이준하 · 김인우 · 권용남
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Molecular characterization of diapause-related genes in the bumblebee, *Bombus ignitus*

Jae-Sam Hwang*, In-Gyun Park, Eun-Young Yun, Duck-Oung Jung, Hyung Joo Yoon,
Sang Beom Lee, Seong-Ryul Kim, Joon-Ha Lee, In-Woo Kim, Young Nam Kwon

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-100, Korea

(Received October 7, 2012, Accepted 2012)

Abstract

To find diapause-related genes, we were performed by differential hybridization with three types of [α -³²P]dCTP-labeled total cDNA probes synthesized from diapause-prepared, diapause-maintained and diapause-activated stage of *Bombus ignitus* queen. Nine individual cDNA clones were found to be differentially expressed in diapause-maintained and diapause-activated stage. Among these clones, BIDC9(BIDC ; *Bombus ignitus* differentially expressed clone) was analyzed through full-length sequencing and expression pattern analysis. This clone was specifically expressed in the thorax organ. The effect of Juvenile hormone analog(JHA) and CO₂ treatment was examined. JHA treatment induced the expression of BIDC9 cDNA clone abruptly after 4 day of treatment. CO₂ treatment induced also the clone after 2 day of treatment. BIDC9 cDNA was identified as *Bombus ignitus* diapause gene contained an open reading frame of 1376 bp encoding 255 amino acids.

Key words: *Bombus ignitus*, Diapause-related gene

서 론

일반적으로 곤충의 휴면은 불리한 환경조건에서 살아남기 위한 수단이다. 휴면은 호르몬에 의해 개시와 종료를 조절하게 되며, 휴면의 조절자 역할을 하는 핵심적인 호르몬은 여러 가지 있지만 휴면이 일어나는 발생적 단계와 종에 따라 다르다. 곤충 중에 따라서 난휴면, 유충휴면, 번데기휴면, 성충휴면을 하기도 한다. 호박벌 여왕벌을 포함하는 뒤영벌 속(*Genus Bombus spp.*) 여왕벌은 성충시기에 휴면하는 특징을 갖는데, 모든 성충 휴면 곤충이 그러하듯이 이 기간 동안에는 난소 발육이 정지된 상태로 있게 된다. 특히 성충 휴면은 주로 유약호르몬(JH: Juvenile Hormone) 결핍이 원인이다. 곤충에서는 많은 생식과정이 유약호르몬(JH)에 의해 조절되는데 유약호르몬(JH)분비가 억제되면서 휴면동안 부속샘의 발육이 정지되

고 날개 근육이 퇴화되며, 교미와 관련한 활동이 정지된다.

호박벌 여왕벌을 포함하는 뒤영벌속(*Genus Bombus spp.*) 여왕벌은 일정한 기간 동안 저온에 의한 월동을 거치게 됨으로서 자연적으로 휴면이 타파되고 이듬해 봄 영양공급과 함께 난소의 발육이 자극된다(Heinrich 1979). 자연계에서 이러한 휴면 타파과정은 차후 경제적 목적으로 동시에 많은 수의 뒤영벌을 대량으로 생산하고자 할 경우 여왕벌 산란을 유도하는데 장애가 될 수 있다(Larrere and Couillaud 1993). 이와 같이 뒤영벌속의 휴면을 인위적으로 타파하는 기술은 Roseler and Roseler(1984)에 의해 처음으로 시도 되었다. 탄산가스 마취로 휴면을 타파하는 방법은 뒤영벌속의 연중 실내 계대 사육을 가능케 하였고 나아가서는 뒤영벌속을 대량으로 생산하여 화분매개용으로 판매하는 기업이 탄생하는 계기가 되었다(van den Eijnde et al. 1991).

*Corresponding author. E-mail: hwangjs@korea.kr

Denlinger(2002)는 휴면 관련하여 발현하는 유전자들을 휴면과 무관하게 일정하게 발현하는 유전자, 휴면 동안 발현이 억제되는 유전자, 휴면동안 발현이 증가하는 유전자, 휴면동안 간헐적으로 발현되는 유전자 등 4가지로 구분하였다. 휴면동안 발현이 증가하는 유전자는 다시 휴면 초기동안에 발현되는 유전자, 휴면 후기에서 발현되는 유전자, 그리고 휴면 내내 지속적으로 발현되는 유전자의 3가지로 소분류 하였다. 본 연구는 지금까지 분자수준에서 연구가 거의 수행되지 않은 호박벌 여왕벌의 휴면제어와 관련된 클론을 차별화 선별법을 이용하여 탐색하였고, 이들 각각의 클론들 중 기슴부위에서 특이적으로 발현되는 BDC9클론에 대해서 유약호르몬 유사체(JHA: Juvenile Hormone Analog) 및 CO₂처리에 의한 전사체 발현양상 및 전체 유전자의 구조를 밝혔다.

재료 및 방법

1. 실험곤충 및 사육

호박벌 사육은 Yoon et al.(2002, 2004)의 방법에 준하여 사육하였다. 즉 여왕벌은 산란용 종이 상자, 봉군 증식용 및 숙성용 종이상자를 이용하여 사육하였다. 산란용 상자(10.5 × 14.5 × 6.5 cm)는 창설여왕벌을 실내에 정착시켜 산란을 유도하기 위한 것으로 뚜껑에는 5.5 × 6.5 cm의 환기용 철창망을 만들고, 산란을 쉽게 하기 위하여 화분단자를 넣어 주었다. 첫배의 일벌이 출현하면 봉군 증식용 종이상자로(21.0 × 21.0 × 15.0 cm)로 옮겨 사육하였고, 일벌이 50마리 이상 출현하면 봉군 발달을 위해 봉군 숙성용 종이상자(24.0 × 27.0 × 18.0 cm)로 옮겨서 사육하였다. 먹이로는 40%의 설탕물과 화분단자를 공급하였다. 화분은 신선화분을 40%의 설탕물로 혼합하여 단자로 만들어 급이하고, 설탕물은 조류 급이기(3 × 14 cm, 60 ml 용량의 원통 플라스틱)를 이용하여 주 3회 급이하였다. 사육환경은 27 ± 1°C, 65 ± 55% RH 및 항암조건으로 사육하였다. 호박벌의 교미는 교미용 상자(55 × 65 × 40 cm)에 우화 5일째의 여왕벌 1마리당 수벌 2-3마리를 넣고 교미를 시켰다. 교미상자 안에는 화분단자와 설탕물을 공급하였고, 상자내 한 구석에 부엽토로 둔덕을 만들어 여왕벌이 숨을 수 있게 해주었으며, 1주일간 교미 기회를 준 후 실험에 사용하였다(Yoon et al. 1999). 교미한 여왕벌은 2.5에 보관 후 각 발육 단계별 휴면제어관련 유전자를 확보하기 위하여 실험 곤충으로 사용하였다.

2. RNA 추출

교미후 처리조건별 호박벌 여왕벌의 total RNA는 SV Total RNA Isolation System(Promega, USA)을 이용하여 분리하였다.

3. 차별화 선별법에 의한 차별화 클론 선발

교미 후 2.5°C에서 1개월 저온 처리한 호박벌 여왕벌을 액체질소 하에서 마쇄하여 Maruyama and Sugano's method(1994)를 이용하여 cDNA 유전자 은행을 제작하였다. 임의로 선발한 클론을 pCNS vector의 forward primer(5'-AGC AUC GAG UCG GCC UUG UUG GCC UAC UG)와 reverse primer(5'-GGG AGG GGC AAA CAA CAG AT)를 사용하여 증폭한 다음 정제하였다. 그 산물을 hybri-dot manifold system(BRL Co., USA)을 이용하여 3장의 나일론 막에 각각 100ng씩 동일량으로 blotting 하고 3종의 탐침으로 혼성화 하였다. 이때 사용한 탐침은 휴면에 들어가기 전단계, 휴면이 유도되는 단계, 휴면이 어느 정도 타파되는 시기 단계로 나누어 호박벌 여왕벌로부터 분리한 total RNA를 이용하여 합성한 1st-strand cDNA를 사용하였다.

4. Northern 분석에 의한 유전자의 발현 양상

선발된 유전자의 발현양상을 보기위해서 교미전, 2.5°C에서 1개월 및 2개월 간 냉장 처리된 여왕벌로부터 SV Total RNA Isolation System(Promega, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 또한 조직별 유전자 발현 양상을 보기 위해서는 머리, 가슴, 배 부분으로 나누어서 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA는 1.2% 포름알데히드겔에 전기영동한 후, 겔을 20 X SSC 용액(3M NaCl, 0.3M Sodium citrate)으로 나일론 막에 전이 시킨 후 UV 크로스링크로 RNA를 고정시켰다. 처리된 나일론 막을 방사성 동위원소인 [α -³²P] dCTP 표지한 휴면제어관련 후보 유전자의 cDNA를 탐침으로 반응시켜서 확인하였다. 또한 유약호르몬 유사체(JHA) 및 CO₂처리에 대해서 어떤 반응을 보이는지를 확인하기 위해서 먼저 유약호르몬 유사체(JHA)를 여왕벌 마리당 20을 주사기로 복부관절 사이에 투여한 후 경과일수별로 total RNA를 분리하였고, 탄산가스 처리는 CO₂농도를 60% 이상 30분간 처리하여 경과일수별로 total RNA를 분리하여 발현양상을 분석하였다.

5. 염기서열분석

각각 선발된 클론의 유전자 서열 분석을 위해 BigDye Ready Reaction kit(Applied Biosystems, USA) 와 ABI 377 DNA sequencer(perkin Elmer, USA)를 이용하였다. 분석된 서열은 Blast search를 통해 다른 유전자와의 상동성을 조사 하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

결과 및 고찰

호박벌의 휴면제어 관련 유전자를 확보하기 위하여

Table 1. Inventory of differentially expressed clones ESTs isolated from diapause-maintained and diapause-activated stage of queen *Bombus ignitus*

| Clones | Putative Identification | Species | Identity(%) | Score |
|--------|------------------------------------|------------------------------|-------------|-------|
| BIDC1 | Immune reactive protease inhibitor | Glossina morsitans morsitans | 51 | 84 |
| BIDC2 | Lim protein | Bombyx mori | 74 | 78 |
| BIDC3 | Pheromone binding protein | Apis mellifera | 71 | 84 |
| BIDC4 | Heat shock protein 70 | Cotesia rubecula | 93 | 97 |
| BIDC5 | Ligase | Bombyx mandarina | 44 | 92 |
| BIDC6 | ADP/ATP Translocase | Apis mellifera | 92 | 287 |
| BIDC7 | Unknown | - | - | - |
| BIDC8 | Unknown | - | - | - |
| BIDC9 | Unknown | - | - | - |

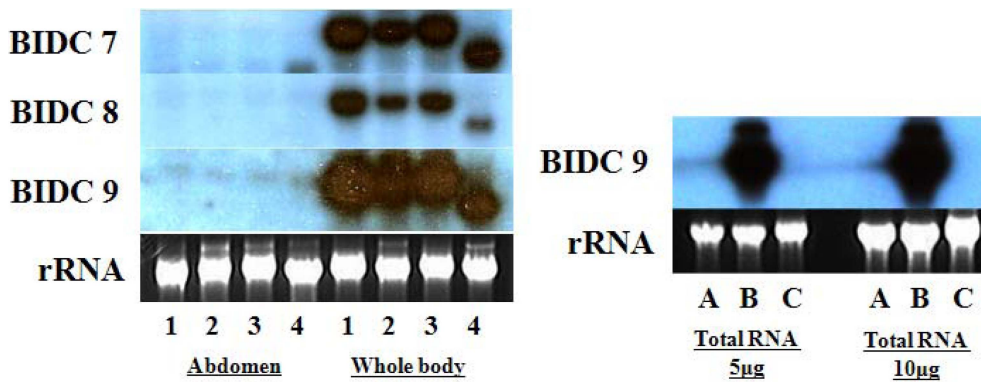


Fig. 1. Gene expression of *B. ignitus* diapause-related BIDC7, BIDC8 and BIDC9 clone. Total RNA was isolated from several stages and organs. Total RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis, transferred on to a nylon membrane and hybridized with radio-labelled BIDC7, BIDC8 and BIDC9. 1, before mating ; 2, 1 month treatment at 2.5 ; 3, 2 months treatment at 2.5 ; 4, 2 months treatment at 2.5 ; A, Head ; B, Thorax ; C, Abdomen.

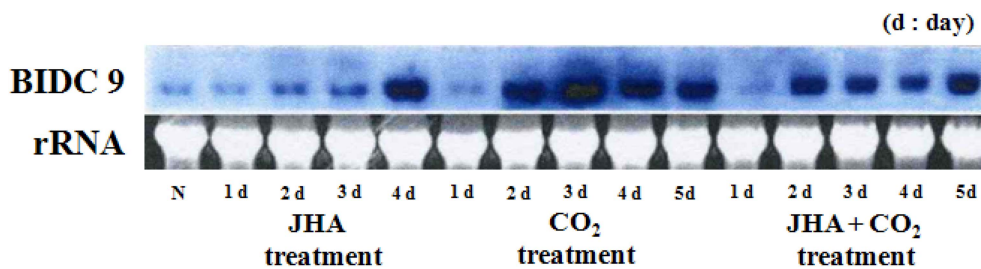


Fig. 2. Gene expression of *B. ignitus* diapause-related BIDC9 gene. Total RNA was isolated from several stages exposed by JHA and CO₂. The RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis, transferred on to a nylon membrane and hybridized with radio-labelled BIDC9 cDNA.

Maruyama and Sugano's method(1994)를 이용하여 제작된 cDNA 유전자 은행에서 임의로 선발한 클론을 증폭한 다음, 정제하여 그 산물을 hybrid-dot manifold system(BRL Co., USA)을 이용하여 3장의 나일론 막에 각각 동일량으로 blotting하고 3종의 탐침으로 혼성화 하여 휴면이 유지되는 단계 및 휴면이 타파 시에 특이적으로 반응하는 클론을 선발할 수 있었다(Table 1).

이들 각각의 클론에 대해서 여왕벌의 배 부위와 whole

body에 대해서 발육 및 휴면 단계별 전사체 발현 양상을 검토하였다. 그 결과 기존에 밝혀진 유전자와 상동이 있는 known 유전자인 BIDC1, BIDC2, BIDC3, BIDC4, BIDC5 및 BIDC6 클론의 경우 휴면 단계별 발현량의 차이는 있지만 배부위 및 whole body 모두에서 발현됨을 확인할 수 있었다(data not shown). Unknown 클론인 BIDC7, BIDC8 및 BIDC9 클론의 경우 배 부위에서는 전혀 발현하지 않고 whole body에서만 발현됨을 확인하였다(Fig.

```

TGG AGT GAT TGC CGC AAT TAA TAA CAC GAA GCA AAC ATG GCT CCG AAA GTT TTG TAT CTC      60
                                     M   A   P   K   V   L   Y   L
CTG CTC ATC GCC TGT ATT TTT GGC ACC ATC ATC CAG ATG AGT TTT GCC GCC TCA TCC GAG      120
L   L   I   A   C   I   F   G   T   I   I   Q   M   S   F   A   A   S   S   E
TCA TCC AAC TCA TCT GAC TCA TCC TCT TCA TCC TCT TCA TCC TCT TCA TCC TCT TCA TCC      180
S   S   N   S   S   D   S   S   S   S   S   S   S   S   S   S   S   S   S
GAG TCA AAG GAA AAA CTG GTG ATA AAA CCT GTA CAG AAT AAG GAC GAC CAA AAC CCA CAA      240
E   S   K   E   K   L   V   I   K   P   V   Q   N   K   D   D   Q   N   P   Q
AAA TCG GAG GAA GAA TCT GCA CAG CAT AAG GAC GAC CAA AAC TCA CAA AAA TCG GGG GAA      300
K   S   E   E   E   S   A   Q   H   K   D   D   Q   N   S   Q   K   S   G   E
GAA TCT GCA CAG CAT AAG GAC GAC CAA GAA CCA CAA AAA CCG GTG GTA GAA CCT GCA CAG      360
E   S   A   Q   H   K   D   D   Q   E   P   Q   K   P   V   V   E   P   A   Q
AAT AAG GAC GAC CAA AAA CCA CAA AAA TCG GAG GAA GAA CCT GCA AAG GAT AAG GAC GAC      420
N   K   D   D   Q   K   P   Q   K   S   E   E   E   P   A   K   D   K   D   D
CAA AAA CCA CAA AAA TCG GAG GAA GAA CCT CCA AAG GAT AAG GAC GAC CAA AAA CCA CAA      480
Q   K   P   Q   K   S   E   E   E   P   A   K   D   K   D   D   Q   K   P   Q
AAA TCG GAG GAA GAA CCT GCA AAG AAT AAG GAC GAC CAA AAA CCA CAA AAA CCG GCG GTA      540
K   S   E   E   E   P   A   K   N   K   D   D   Q   K   P   Q   K   P   A   V
GAA CCT GCA AAG AAT AAG GAC GAC CAA AAA CCA CAA AAA CCG GCG GTA GAA CCT GCA AAG      600
E   P   A   K   N   K   D   D   Q   K   P   Q   K   P   A   V   E   P   A   K
GAT AAG GAC GAC CGA AAA CCA CAA AAA CCG GCG GTA GAA CCT GCA CAT GAT AAG AAC GAC      660
D   K   D   R   K   P   Q   K   P   A   V   E   P   A   H   D   K   N   D
CGA AAA TCA AAA AAA CCG GTG GTA GAA CCT GCA CAA GAT AAG AAC GAC CGA AAA CCC AAA      720
R   K   S   K   K   P   V   V   E   P   A   Q   D   K   N   D   R   K   P   K
ATA CCG GTG GTT AGA ACC TGC ACA GGG GTA AGA ACC GAA AAC CCA AAA ATA CCG GTG      780
I   P   V   V   R   T   C   T   G   V   R   T   T   E   N   P   K   I   P   V
GTG GTG GGA ACC TGC ACG GGA TAG AAC GAC CGA AAA TCA CAA AAA CCG GTG ACA AAA CCT      840
V   V   G   T   C   T   G   -
ATA CAT AAT AAG GAC AAC CGA AAA CCA CAA AAA CCG CCC ACC AAA GCG GAA GAA GCT GAA      900

AAC AAG GTT GTG GTG AGG AGA CTC GAG ATC ACG TTA CCA ACG GTT CCA ATT ATC TCC CCG      960

GTC CTA GGA CTT AGA TCG AAC GTC GAT AAA GCT AAA CAG TTG GCT GCA CGC CGT TTG AAC      1020

AAC GAA GAG AAT TTT GTC AAC GCC GTT GCG AAC AGT GTA AGG CTT GCG GTC CAT GCT GCT      1080

AAG CCT CTC CTA GCC ATA ACC AAA TTG ATC ACT ACC ATT GTA GAA GTA TTC GCT GAG GTA      1140

GCA GTA TTA AAC CCA GCC CGA CTC GGA GTT CTT GTT CTT CAG GAA GGT GTG AAA ATT GGC      1200

TTG AGT ATT TTG ACC GTG TCC CTT CCT CTT CTG ATA AAT GGA ATT ATA ACG GCT GTG TAT      1260

TAA ATA ATC AAT TAT AAT GTA TTA TAG TAG AGC ATT TAC TTT ATA TGC AAC TAT GTA TTA      1320

GTT TTT GTT GCA AAT ATA TTT ACG CAT AAT AAA AAA AAA AAA AAA AGG GCC      1380
    
```

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *B. ignitus* diapause related B IDC9. The open reading frame of *B. ignitus* diapause related B IDC9 is shown as uppercase. The predicted amino acid sequence(single-letter abbreviation) is shown below the nucleotide within the open reading frame.

1). Unknown 클론 중 전사체 발현량이 높은 B IDC9 클론에 대해서 머리, 가슴, 배 부위에 대해서 전사체 발현 양상을 검토한 결과, 가슴 부위에서만 특이적으로 발현됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 가슴 부위에서는 곤충의 전흉선 자극호르몬을 비롯하여 유충호르몬의 조절 기능이 있음으로 가슴 부위에서의 특이적으로 발현되는 것은 성충 휴면과 관련이 있을 것으로 사료된다.

한편, 이 클론이 유약호르몬(JH)에 대해서 어떤 반응을 보이는지를 확인하기 위해서 먼저 유약호르몬 유사체(JHA)를 여왕벌 두당 20 µg 처리 후 경과일수별로 발현양상을 비교한 결과 4일째 발현량이 현저하게 증가됨을 확인 할 수 있었다. CO₂ 농도를 60% 이상 30분간 처리한 경우는 처리 후 2일째부터 발현량이 증가함을 확인할 수 있었다. CO₂ 및 유약호르몬 유사체(JHA)를 동시에 처리한 경우는

CO₂를 처리한 경우와 유사한 발현 양상을 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 B IDC9 클론의 경우 호박벌의 휴면에 직간접적으로 관여됨을 시사할 수 있으며, Roseler and Roseler(1984)가 휴면전 여왕벌을 탄산가스로 마취시키면 유약호르몬(JH)이 많이 생성됨으로써 난생성이 활성화되어 결과적으로 휴면이 타파된다는 결과와 일치되는 것으로 보아 추후 더 많은 연구가 진행되어야 될 것으로 사료된다(Fig. 2).

이 유전자의 구조를 분석한 결과, 전체 크기는 1,376 bp이며, 37번째 염기에서 개시되어 804번째 염기위치에서 종결되는 암호화 영역(open reading frame)을 가지고 있었고, 3'끝부분의 염기서열에는 poly A염기를 포함하여 잠정 전사 종결신호인 "AATAAA"가 존재함을 확인할 수 있었으며, cDNA의 ORF로부터 255개의 아미노산을 연역

할 수 있었다(Fig. 3).

결 론

호박벌 휴면에 관련된 유전자를 선별하기 위하여 휴면에 들어가기 전단계, 휴면이 유도되는 단계, 휴면이 어느 정도 타파되는 단계의 여왕벌을 탐침으로 차별화 선별법에 의해 휴면제어관련 클론을 9개 선별하였다. 이들 클론 중 휴면 제어관련 BIDC9 클론에 대해서 전체유전자 구조 및 발현양상을 검토하였다. 전사체 발현 양상을 비교한 결과, 이 클론의 경우 가슴부위에서 특이적으로 발현됨을 확인하였다. 또한 유약호르몬 유사체(JHA) 및 CO₂ 처리에 대한 반응을 검정한 결과, 유약호르몬 유사체(JHA)는 처리 후 4일째 발현량이 현저하게 증가됨을 확인 할 수 있었고, CO₂는 처리 후 2일째부터 발현량이 증가함을 확인할 수 있다. 이 유전자의 구조를 분석한 결과, 유전자의 전체 크기는 1,376 bp이며, 255개의 아미노산을 번역할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호:PJ008706) 및 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ008158)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Denlinger DL(2002) Regulation of diapause. *Ann Rev Entomol* **47**, 93~122.
- Heinrich B(1979) *Bumblebee economics*. pp.8-245, Harvard University Press, Cambridge.
- Larriere M, Couillaud F(1993) Role of juvenile hormone biosynthesis in dominance status and reproduction of the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Behav Ecol Sociobiol* **33**, 335~338.
- Maruyama K, Sugano S(1994) Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**, 171~174.
- Roseler PF, Roseler I(1984) Effect of carbon dioxide and brain cauterization on corpora allata activity and oogenesis in bumblebee(*Bombus hypnorum* and *Bombus terrestris*). *Zoologische Jahrbucher/Zoologie und Physiologie der Tiere* **88**, 237~246.
- Yoon HJ, Mah YI, Lee MY, Park IG, Bilinski M(1999) Ecological characteristics of *Bombus ignitus* Smith in Korea. *Korean J Appl Entomol* **38**, 101~107.
- Yoon HJ, Kim SE, Kim YS(2002) Temperature and humidity favorable for colony development of the indoor-reared bumblebee, *Bombus ignitus*. *Appl Entomol Zool* **37**, 419~423.
- Yoon HJ, Kim SE, Kim YS, Lee SB(2004) Colony developmental characteristics of the bumblebee queen, *Bombus ignitus* by the first oviposition day. *Int J Indust Entomol* **8**, 139~143.
- van den Eijnde JA, de Ruijter, van der Steen J(1991) Method for rearing *Bombus terrestris* continuously and the production of bumblebee colonies for pollination purposes. *Acta Horti* **288**, 154~158.