

누에 형질전환에 적합한 실용품종 누에알의 제조

김성완¹ · 강민욱² · 강석우¹ · 윤은영¹ · 최광호¹ · 김성렬¹ · 박승원³ · 노시갑⁴ · 구태원^{1*}
¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²농업기술실용화재단, ³대구가톨릭대학교, ⁴경북대학교

Modification of the commercial silkworm eggs adequate for Bluemoon silkworm transgenesis

Sung-Wan Kim¹, Min-Uk Kang², Seok-Woo Kang¹, Eun-Young Yun¹, Kwang-Ho Choi¹,
Seong-Ryul Kim¹, Seung-Won Park³, SiKab Nho⁴, Tae-Won Goo^{1*}

¹National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

²The Foundation of Agricultural Technology Commercialization and Transfer, Suwon 441-857, Republic of Korea

³Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Republic of Korea

⁴Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

ABSTRACT

Silkworm transgenesis scientists have done some genetic modification work on multivoltine silkworms, but that type of silkworms is less commercial feasible. They are easy to manipulate, because they breed all year round. But the commercial silkworm variety must undergo hydrochloric acid treatment at a high temperature to be artificially hatched. Hydrochloric acid penetrates through the holes in the silkworm eggs, fatally damaging their reproduction. So it had been thought that altering the properties of the commercial silkworm variety would be very difficult. So we have tried to make from diapause to non-diapause eggs using diapause varieties, 'Backokjam' and 'Jam 124'. At present, our group has establishing the conditions for non-diapause eggs. Oviposited eggs after 40 ~ 60 hours were incubated for 24 hours at 15 ~ 20°C with dark condition. Non-diapause eggs were completely induced. The hatching rate, molting rate and pupation rate of non-diapause 'Jam 124' and 'Backokjam' eggs showed no differences compared to diapause eggs. When transgenic silkworm using the non-diapause eggs, the hatching rate showed that non-diapause eggs induced from diapause were 40 ~ 70%, diapause eggs treated with artificial incubation were 10 ~ 30%, and polyvoltine strains, HM eggs were 30 ~ 50%. Therefore, we suggest that modification techniques of the commercial silkworm eggs adequate for silkworm transgenesis can be used to develop transgenic silkworms more easily.

Key words : Diapause, Silkworm, Transgenesis, Voltine

서 론

누에는 수천 년동안 양잠산업에 있어서 실크를 생산하는 대표적인 견사곤충으로 인류에 지대한 공헌을 해왔다. 최근에는 일본의 Tamura et al.(2000)에 의해서 형질전환 누에 제작이 성공함으로써, 누에가 전통적인 실크를 생산하는 곤충에서 강력한 생물학적 모델 곤충 또는 인·축 적용 단백질의 약품을 생산하는 생체공장화의 대상 곤충으로써 새로운 이용 가능성이 대두되고 있다. 기초연구분야에서, 형질전환 시스템이 확립된 초파리와 마우스는 유전자 발현 및 조절과 관련된 기초적 생물학적 기능을 이

해하는데 매우 유용하다는 것은 익히 알려져 있다. 누에 또한 형질전환 기술이 확립됨으로써, 초파리나 마우스처럼 곤충의 기초적인 생리기능 연구 뿐 만 아니라 나아가 생물공학 및 생명공학 양잠산업의 대상 곤충으로써 자리 매김할 것으로 기대된다.

누에 형질전환에 대한 관심은 1970년대부터 고조되었지만, 형질전환 누에를 제작한다는 것은 매우 어려운 것으로 판단되었다. 최초의 누에 형질전환은 일본의 Nawa et al.(1971)에 의해 이루어진 실험으로 흑란계통의 전체 게놈 DNA를 추출하여 백란계통의 알에 주입하여 흑란계통의 누에를 얻는 실험이었다. 이러한 시도는 주입된 DNA

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

가 급속히 분해되거나 어떤 백터의 도움없이도 실효성이 없는 것으로 판단되었다. 이후 오랜 기간 동안 다양한 방법으로 누에 형질전환을 위한 많은 시도가 있었지만, 형질전환 누에 개발에는 실패하였다. 1995년 곤충 베쿨로바이러스(baculovirus)의 게놈이 차세대 누에로 전달된다는 사실이 보고되면서(Mori et al. 1995), 이를 응용한 베쿨로바이러스에 의한 상동 재조합(homologous recombination) 연구가 Yamao et al.(1999)에 의해서 시도된 결과, 누에 피브로인 유전자 표적 형질전환 누에가 최초로 개발되었다. 이러한 베쿨로바이러스에 의한 상동 재조합 방법은 누에에 있어서 최초의 유전자 표적 형질전환 기술이었으나 형질전환 효율이 약 0.16%로 매우 낮아 실효성에서 의문이 제기되고 있다.

최근, 형질전환 누에를 만드는 방법 중 가장 일반적인 것이 Tamura et al.(2000)이 최초로 개발한 DNA형의 전이인자(transposon)인 *piggyBac*을 백터로 이용하는 방법이다. 실제로, 누에 형질전환체는 마커유전자를 가진 백터와 헬퍼(helper)라고 불리는 전이효소 유전자를 발현시키는 2종류의 플라스미드를 동시에 발생초기의 누에알에 미세주입장치(microinjector)를 사용하여 주입함으로써 제작한다.

DNA형의 전이인자인 *piggyBac*을 이용한 누에 형질전환 기술은 이제 매우 일반화되어 안정적으로 만족할 수준의 형질전환체를 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 연속적으로 세대가 내려가더라도 도입한 외래유전자가 제거되지 않고 유지된다(Prudhomme and Couble 2002). 그러나, 지금까지 형질전환에 사용된 품종은 휴면각성을 위해 염산처리가 불필요한 비휴면계통인 다화성품종에서 제한적으로 이뤄지고 있다(Tamura et al. 2000, Tomita et al., 2003, Tateno et al. 2009, Tatematsu et al. 2010, Sato et al. 2012). 비휴면계통의 다화성품종은 국내 양잠농가에 보급하고 있는 휴면계통의 실용품종에 비하여 형질전환에 사용하기는 매우 적합하지만, 실용형질이 훨씬 열악하고 강건성은 떨어진다는 단점이 있다. 그럼에도 불구하고, 누에 형질전환에 다화성품종을 사용하는 이유는 다화성품종은 휴면에 들어가지 않는 반면에, 국내 농가보급 품종인 2화성 누에품종은 산란 후 휴면에 들어가기 때문에 휴면각성을 위해서는 반드시 고온에서 염산처리를 해야 한다(Takami 1974). 그런데 백터를 미세주입한 2화성 누에알의 휴면각성을 위해서 고온에서 염산을 처리하게 되면 알의 구멍을 메운 순간접착제(cyanocrylate glue)가 녹게 되고 노출된 구멍 사이로 염산이 침투하게 되어 결국 누에의 배자는 성숙되지 못한 채로 죽게 된다. 이러한 이유 때문에 대부분의 누에 형질전환은 다화성 품종을 대상으로 유도되고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 휴면계통인 실용품종을 형질전환하기 위해 휴면계통의 누에알을 저온 암처리하는 방법을 통해 상기 고온 염산처리에 의한 휴면계통인 실용품종의 형질전환체 제작의 문제점을 해결하였다. 이 결과는 휴면계통의 실용품종 누에알을 저온 암처리에 의해 비휴면화하여 형질전환에 적합하도록 누에알을 제조한 최초의 보고이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구의 실험재료로는 집누에나방(*Bombyx mori*) 중 실용품종(장려품종) 백옥잠(잠123 × 잠124)과 이의 원종인 중국계 잠124, 다화성 품종인 HM, 그리고 일본계 w1-pnd를 사용하였다. 실험집단으로서는 누에 한 아구당 약 100개 정도의 누에알을 채취하여 총 4개체에서 400개의 누에알을 사용하였다. 누에는 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육 기준(온도, 24°C - 27°C; 상대습도, 70% - 90%)에 준하여 사육하였고, 필요한 시기에 따라 시료를 채취하였다.

2. 부화조건

본 연구에 사용된 부화조건은 잠중총론(Takami 1974)과 Kosegawa et al.(2000) 조건을 참조하였다. 부화조건으로 온도와 조명시간을 각각 달리하여 처리하였다. 실험구는 산란 후 40 ~ 60시간 사이의 누에알을 사용하였고, 온도는 15°C, 18°C, 20°C로 하였으며, 조명은 24시간 동안 어둡게 하였다. 대조구로 사용된 누에알은 25°C를 기준으로 양성 대조구는 24시간 어둡게, 음성대조구는 일반 조명(명:16시간, 암:8시간)으로 처리하였다(Kosegawa et al. 2000).

3. 누에 생존율 조사

누에 생존율은 생육시기별 강건성을 알아보는 요소로써 분석하였다. 총 3가지요소인 부화율(누에가 알에서 깨어나는 비율), 상족율(누에가 유충에서 번데기로 변태하는 비율), 화용비율(번데기에서 나방으로 변태하는 비율)로 확인하였다(Shimizu et al. 2005).

4. 누에의 형질전환

형질전환에 사용된 누에알과 전이백터의 준비는 Kim et al.(2011) 방법에 준하여 다음과 같이 실험하였다. 전이백터와 helper 백터의 농도비는 1:1의 비율로 사용하였고, microinjection용 완충용액(5 mM KCl, 0.5 mM Phosphate buffer, pH 7.0)에 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 희석하였다. 누에 초기배로의 microinjection 위치는 누에의 초기배로 예측되는 배면(ventral) 부위에 주사하였는데, 그 과정은 다음과

같이 실시하였다. 먼저 텅스텐 침으로 누에알에 작은 구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector의 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입하였다. 이 때 각 초기배에 주입된 DNA 용액의 양은 10 ~ 15 nl가 사용되었고, 난각에 생긴 구멍은 cyanoacrylate 성분이 함유된 접착제(Guper Glue, Henkel, Germany)를 사용하여 막았다. 미세주사 후 누에알은 보습한 패트리디쉬에 넣어서 25°C에서 부화할 때까지 보호하였다.

결과 및 고찰

1. 한국의 누에 실용품종 원종과 일본의 형질전환용 누에의 실용형질 비교

한국의 실용품종누에 백옥잠의 원종 잠124와 일본의 형질전환용 대표 품종인 w1-pnd와의 기본 성상비교를 실시하였다. 누에의 강건성과 실용성을 나타내는 대표적인 특성으로써 전건중, 용체중 및 견충중을 분석하였다 (그림 1). 그 결과, 휴면계통인 잠124의 전건중, 용체중 및 견충중의 평균은 1.56 g, 1.22 g, 0.34 g이었으며, 비휴면계통인 w1-pnd의 전건중, 용체중, 견충중의 평균은 0.78 g, 0.67 g, 0.12 g였다. 전체적인 실용형질은 실용품종인 백옥잠의 원종인 잠124가 w1-pnd의 비해 전체적으로 약 2배 이상 높았다. 이 결과는 향후 형질전환누에를 통한 재조합단백질 생산시에 생산량과 연결되는 필수 형질로서 매우 중요하다고 할 수 있다.

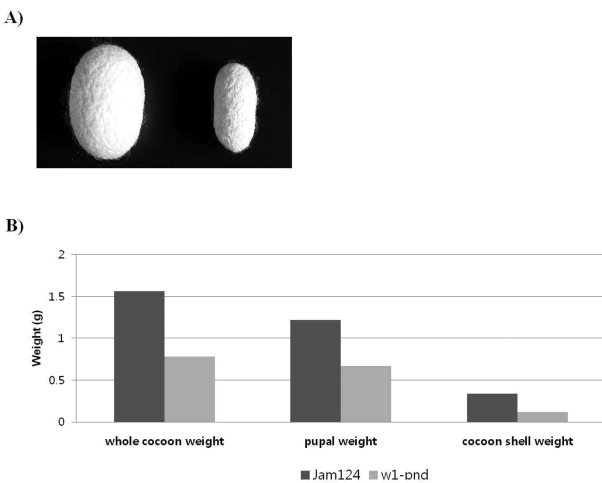


Fig. 1. Commercial feasibility comparison of the Jam124 and w1-pnd variety. (A) Cocoon size comparisons between the Jam124 and w1-pnd variety. The left and right image of panel indicate the Jam124 (bivoltin) and w1-pnd variety (polyvoltin), respectively. (B) Comparison of various commercial feasibility on the Jam124 and w1-pnd variety.

2. 월년란(휴면란)을 불월년화란(비휴면란)으로의 유도 조건

누에의 화성에 직접 관계되는 것은 부화 유도시의 온도와 조명으로, 당 세대의 온도와 조명에 의한 부화처리 조건에 따라 차세대의 누에알의 월년란과 불월년란으로 유도가 이루어진다고 보고되었다(Takami 1974). 월년란의 불월년화란으로 유도 조건을 규명하기 위해서 저온 암최청으로써 산란 후 2일(40 ~ 60시간; 난색의 착색이 어느 정도 이루어져 품종고유의 색이 띠기전으로써 발육단계로서는 인형기 정도) Stage 6 ~ 7단계 사이에 각 온도별 15°C, 18°C, 20°C, 25°C 암조건으로 부화를 실시하여 점청기(25°C 부화조건시 산란 후 8일에 해당) 전일까지 실험온도별 부화를 하였고 점청기 이후 부화시까지 모두 25°C로 옮겨서 암최청을 실시하였다. 그 결과, 각 온도별 부화에 소요되는 시간은 15°C는 약 18 ~ 20일, 18°C 15 ~ 16일, 20°C 13 ~ 14일 대조구인 25°C는 10 ~ 11일 정도가 소요되는 것으로 나타났다(그림 2).

또한, 각각의 저온 부화온도에 따른 누에의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위한 강건성 비교와 불월년란 산란 비율을 조사하였다. 강건성 비교시에는 부화율, 상족율, 용화율을 조사하였다. 실용품종인 백옥잠의 경우 모든 실험구에서 부화율은 모두 80% 이상, 상족율은 70% 이상, 용화율은 약 100%에 근접하여 대조구인 25°C와 비교시 거의 차이가 없었다. 그러나 저온온도 중에서는 15°C(부화율 95%, 상족률 88%, 용화율 99%), 18°C(부화율 94%, 상족률 68%, 용화율 95%), 20°C(부화율 98%, 상족률 75%, 용화율 96%)를 나타내었고, 그 중에서 15°C와 20°C에서 실험한 실험구가 18°C에 비해 상대적으로 높은 값을 나타내었다(그림 3A). 불월년란 산란 비율은 대조구 25°C에서는 0%로 산란된 알들 모두 월년화란화 되어 차세대 누에가 부화하지 않았으며, 저온부화 처리구들은 전부 100%로 산란된 알들 모두 불월년화란으로 되어 차세대 누에가 전부 부화하였다(그림 3A). 또한, 백옥잠의 원종인 잠124는 부화율은 전부 60 ~ 70%, 상족율은 60 ~ 80% 이상,

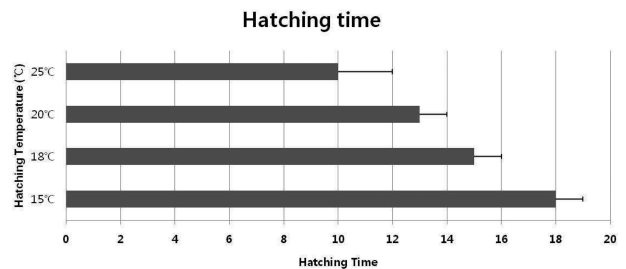


Fig. 2. Analysis of hatching time according to temperature conditions. The average hatching time and its standard were 18 ± 0.9 (15°C), 15 ± 0.8 (18°C), 13 ± 0.7 (20°C), 10 ± 0.8 (25°C).

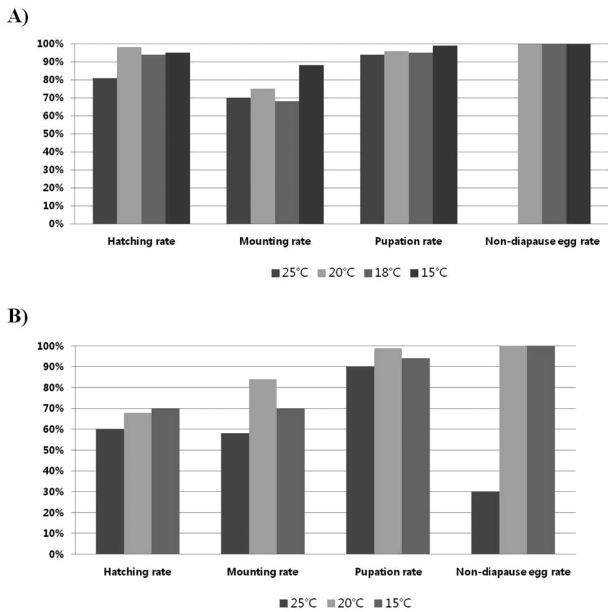


Fig. 3. Comparisons of hatching, mounting, pupation and non-diapause egg rate according to conditions of hatching temperature. Panel A and B indicate characterization of the Backokjam and Jam124 variety, respectively.

화용비율은 거의 90% 이상으로 대조구 25°C의 비교 시 오히려 부화온도 20°C가 더 높은 성적율을 나타내었다. 불월년란 산란 비율은 대조구 25°C에서는 산란된 알들의 약 30% 정도에서 불월년화란으로 되어 차세대 누에가 부화가 되었다. 이것은 원종들의 환경영향의 감수성이 교잡종보다 높아서 암처리 조건에 의해 유도된 것으로 추정된다. 나머지 저온부화 처리구들은 전부 100%로 산란된 알들 모두 불월년화란으로 되어 차세대 누에가 전부 부화하였다 (그림 3B).

따라서, 두 품종의 실험결과 월년란의 불월년란화 최적의 유도조건으로는 누에알의 부화조건을 산란 후 40~60 시간째의 누에알을 온도는 15~20°C 처리, 조명은 24시간동안 암흑상태로 접침기 전날까지 유지하다가 일반 부화조건인 25°C로 옮겨 암흑상태에서 암최청시킨 것이 가장 적합하였다.

3. 인공부화란과 불월년란 부화 모습 및 육안비교

불월년화란 유도된 다음세대에 누에알의 부화 양상과 산란 직후의 월년란과 불월년의 육안 비교를 실시하였다. 그 결과 인공부화처리한 월년란과 비교시 하루 일찍 부화하는 것을 알 수 있었다. 이것은 월년란과 불월년란과의 부화일수가 하루 정도 차이가 난다는 기존(Takami 1974) 사실과 일치하였다. 불월년화 된 누에알은 품종 고유색으로 착색이 일어나지 않았다(그림 4A). 이는 산란된

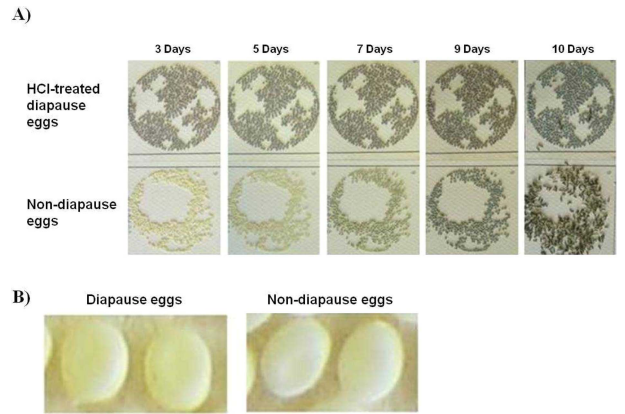


Fig. 4. Hatching status and colors of non-diapause Jam124 eggs and HCl-treated Jam124 eggs. (A) Comparison of hatching status after oviposition on HCl-treated diapause eggs (upper panel) and non-diapause eggs (lower panel). (B) Egg color comparisons between diapause eggs (left panel) and non-diapause eggs (right panel).

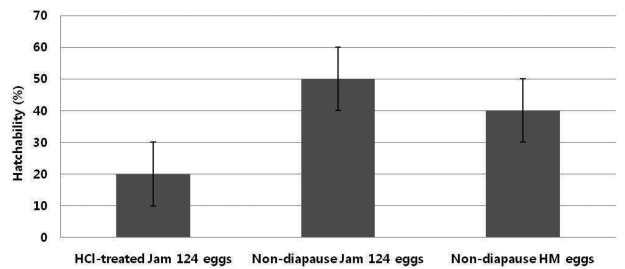


Fig. 5. Hatching rates of HCl-treated Jam 124, non-diapause Jam124 and non-diapause HM eggs after microinjection. The average hatching rates and its standard were 20 ± 4.5 (HCl-treated Jam 124), 50 ± 3.4 (non-diapause Jam124) and 40 ± 5.9 (non-diapause HM).

누에알이 월년화가 될 것인지 불월년화가 될 것인지를 구분 지을 수 있는 중요 요소로서 육안 비교만으로도 산란 후 36시간 쯤(착색이 일어나기 시작하는 시기)는 확실히 구분할 수 있으나 산란 직후 품종의 고유색이 착색되기 전에는 월년란은 연노란색이나 노란색을 띠나 불월년란은 상아색이나 거의 백색에 가까운 난색을 가지게 되는 것으로 육안으로도 구분이 되는 것으로 나타났다(그림 4B).

4. 불월년화된 누에알 내 전이벡터 미세주입 후 부화율 분석

불월년화란으로 유도된 실용품종 누에알에 누에 형질전환용 전이벡터를 미세주입한 후 부화율을 분석하였다. 그 결과 인공부화 처리된 월년란의 부화율은 최소 10%에서 최대 30%인 반면에, 불월년란으로 유도된 월년란의 부화율은 최소 40%에서 최대 70%까지 상승하였다. 다화성 품종인 HM에서 부화율은 최소 30%에서 최대 50%였다. 이

는 기존의 월년종 누에알의 인공부화처리 대비 2.5배~4배 상승하였으며, 다화성 품종인 HM 비해서도 1.5배~2배 상승한 결과이다(그림 5).

지금까지 휴면계통의 누에알을 대상으로 형질전환누에를 제작한다는 것은 매우 어려운 것으로 판단되었으나, 휴면계통의 누에알을 저온 암처리하는 방법을 통해 비휴면화 시킴으로써 형질전환체 제작의 문제점을 해결하였다. 이 결과는 휴면계통의 누에알을 저온 암처리에 의해 비휴면화하여 형질전환에 적합하도록 누에알을 제조한 최초의 보고이다.

적 요

지금까지 형질전환에 사용된 품종은 휴면각성을 위해 염산처리가 불필요한 비휴면계통인 다화성품종에서 제한적으로 이뤄지고 있으며, 휴면계통의 누에알을 대상으로 형질전환누에를 제작한다는 것은 매우 어려운 것으로 판단되었다. 따라서, 본 연구에서는 양잠농가에 장려품종으로 보급되고 있는 백옥잠(잠123 × 잠124)과 원종인 잠124의 월년란을 불월년란화 하기 위한 처리조건을 구명한 바산란 후 40~60시간째에 온도는 15~20°C, 조명은 암(0L:24D)처리로 100% 불월년화가 유도되었다. 또한 불월년란은 월년란에 비해 부화율, 상족율 및 화용비율에 있어 큰 차이가 없었다. 불월년란으로 유도된 실용품종 누에알에 누에 형질전환용 전이벡터를 미세주입한 후 부화율을 분석한 결과, 불월년란으로 유도된 월년란의 부화율은 40~70%로, 인공부화 처리한 월년란의 10~30%, 다화성누에 HM의 30~50% 부화율에 비해 높은 부화율을 나타내었다. 본 연구를 통해 개발한 불월년란 유도 기술은 현재 양잠농가에 보급하고 있는 실용품종을 형질전환하는데 매우 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

감사의 말

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ009044032013) 및 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(과제번호: 311059-4)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Kim SW, Yun EY, Kim SR, Park SW, Kang SW, Kwon OY, Goo TW (2011) Construction of transgenic silkworms expressing human stem cell factor (hSCF). *Journal of Life Science* **21**:12~17.
- Kosegawa E, Reddy GV, Shimizu K, Okajima T (2000) Induction of non-diapause egg by dark and low temperature incubation in local variety of the silkworm, *Bombyx mori*, *J Seric Sci Jpn* **69**, 369~375.
- Mori H, Yamao M, Nakazawa H, Sugahara Y, Shirai N, Matsubara F, Sumida M, Imamura T (1995) Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm, *Bombyx mori*, by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechnology (NY)* **13**, 1005~1007.
- Nawa S, Sakaguchi B, Yamada MA, Tsujita M (1971) Hereditary change in *Bombyx* after treatment with DNA. *Genetics* **67**, 221~234.
- Prudhomme and Coble (2002) Perspectives in silkworm (*Bombyx mori*) transgenesis. *CURRENT SCIENCE* **83**, 432~438.
- Sato M, Kojima K, Sakuma C, Murakami M, Aratani E, Takenouchi T, Tamada Y, Kitani H (2012) Production of scFv-conjugated affinity silk powder by transgenic silkworm technology. *PLoS One* **7**, e34632.
- Shimizu K, Hirokawa M, Tatematsu K-I, Kosegawa E (2005) Influence of environmental condition in embryonic stage on diapause and hatchability of multivoltine silkworm, *Bombyx mori*. *J Seric Sci Jpn* **74**, 73-79.
- Takami A (1974) *The silkworm Total theory*, The National Silkworm Eggs Producers' Association.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirik P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P (2000) Germline transformation of the silkworm using a piggyback transposon-derived vector. *Nat Biotechnol* **18**, 81~84.
- Tatematsu K, Kobayashi I, Uchino K, Sezutsu H, Iizuka T, Yonemura N, Tamura T (2010) Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Transgenic Res* **19**, 473~487.
- Tateno M, Toyooka M, Shikano Y, Takeda S, Kuwabara N, Sezutsu H, Tamura T. (2009) Production and characterization of the recombinant human mu-opioid receptor from transgenic silkworms. *J Biochem* **145**, 37~42.
- Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol* **21**, 52~56.
- Yamao M, Katayama N, Nakazawa H, Yamakawa M, Hayashi Y, Hara S, Kamei K, Mori H (1999) Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev* **13**, 511~516.