

피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현시스템을 이용한 녹색형광실크 생산

김성완¹ · 윤은영¹ · 최광호¹ · 김성렬¹ · 박승원² · 강석우¹ · 구태원^{1*}
¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²대구가톨릭대학교

Production of fluorescent green silk using fibroin H-chain expression system

Seong Wan Kim¹, Eun Young Yun¹, Kwang-Ho Choi¹, Seong Ryul Kim¹, Seung Won Park²,
Seok Woo Kang¹ and Tae Won Goo^{1*}

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

²Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Republic of Korea

(Received September 16, 2013, Accepted October 21, 2013)

ABSTRACT

To express green fluorescent protein in the cocoon of silkworm, we constructed the fibroin H-chain expression system to produce enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the cocoon of transgenic silkworms. The EGFP fusion protein, each with N- and C-terminal sequences of the fibroin H-chain, was designed to be secreted into the lumen of the posterior silk glands. The expression of the EGFP/H-chain fusion gene was regulated by the fibroin H-chain promoter. The use of the 3xP3-driven DsRed2 cDNA as a marker allowed us to rapidly distinguish transgenic silkworm. A mixture of the donor and helper vector was micro-injected into 1,200 eggs of bivoltin silkworms, Baegokjam. We obtained 8 broods. The cocoon displayed strong green fluorescence, proving that the fusion protein was present in the cocoon. Also, the presence of fusion proteins in cocoons was demonstrated by SDS-PAGE and immunoblotting. Accordingly, we suggest that the EGFP fluorescence silk will enable the production of the novel biomaterial based on the transgenic silk.

Key words : Fluorescent, Transgenic silkworm, EGFP, *Bombyx mori*, Silk

서 론

의류용 실크 소재를 생산하는 대표적 산업곤충인 누에
는 체내에 실크 단백질을 생산하기 위한 견사선이라는 특
수한 기관을 가지고 있는데, 그것은 1,000개 내외의 세포
로 이루어져 있으며 뽕잎의 단백질, 아미노산, 당 등으로
부터 합성된 액상견사로 채워져 있다. 또한 견사선은 크
게 피브로인(fibroin)의 합성 장소인 후부견사선(posterior
silk gland, PSG)와 세리신(sericin)의 합성 장소인 중부견
사선(middle silk gland, MSG) 그리고 실크를 토사시키는
전부견사선(arterial silk gland, ASG)로 구성되어 있고, 실크
의 제작합성은 후부견사선에서 피브로인이 생성된 후
중부견사선에서 피브로인을 세리신으로 코팅하고, 전부견
사선을 통해 토사된다 (Altman et al. 2003, Hino et al.

2006, Inoue et al. 2005). 지금까지 보고된 실크단백질의
구성은 피브로인이 약 75%이고 세리신이 나머지 25%이
고, 그 중에서 피브로인은 heavy chain (H-chain), light-chain
(L-chain) 및 fibrohexamerin 3개의 subunit 복합체가 6 : 6 : 1
의 분자비율로 구성되어 있다 (Inoue et al. 2000). 피브로
인 단백질의 기본 구성은 H-chain 과 L-chain이 1 : 1 비
율로서 이황화결합을 이루고 있으며, 결합된 H-L chain
여섯 분자는 한 분자의P25에 의해 비공유성 결합으로 연
결되어 있다 (Inoue et al. 2000, Tanaka et al. 1999). 또한
피브로인 H-chain의 전체적인 유전정보는 Zhou (2003)에
의해 밝혀졌는데, 피브로인 H-chain의 구조는 두 개의 엑
손(67 bp 와 15,750 bp)과 하나의 인트론(971 bp)으로 구성
되어 있으며 반복되는 Gly-Ala(일부는 Ser, Tyr으로 치환
되어 있음) 반복구조로서 전체 H-chain의 2/3에 이르는 영

*Corresponding author. E-mail: eco@khu.ac.kr

역을 이 반복구조가 차지하고 있어 L-chain과 마찬가지로 매우 큰 소수성(hydrophobicity)을 띤다 (Yamada et al. 2001, Zhou et al. 2003, Zhou et al. 2000). 그리고 피브로인 H-chain의 C-말단에는 세 개의 시스테인 잔기가 존재하는데, 이 중 두 개의 시스테인 잔기는 H-chain의 intramolecular 이황화 결합을 하고, C-말단으로부터 세 번째에 위치한 시스테인 잔기는 L-chain과 결합하는데 이용된다 (Tanaka et al. 1999).

누에 형질전환 기술은 일본의 Tamura 연구팀이 나비목 곤충인 *Trichoplusia ni*에서 유래한 piggyBac 전이벡터를 제작하여 최초로 형질전환 누에 제작에 성공하였다 (Tamura et al. 2000). 그리고 현재까지 piggyBac 전이벡터를 사용한 많은 누에 형질전환 실험이 진행되었고, 그 중에서 2003년 사람 collagen 단백질이 포함된 재조합 누에고치를 생산하는 형질전환 누에가 보고 됨으로써 (Tomita et al. 2003), 누에 견사선의 fibroin과 sericin을 이용하여 재조합 단백질을 생산할 수 있는 발현 시스템이 각각 개발되었다. 그리고 지금까지 이 발현 시스템을 사용하여 basic fibroblast growth factor (bFGF), human serum albumin (HSA), feline interferon (FeIFN), insulin like growth factor-I (hIGF-I) 등이 성공적으로 발현된다고 보고 되어 있다 (Hino et al. 2006, Kurihara et al. 2007, Ogawa et al. 2007, Tomita et al. 2003, Zhao et al. 2009).

실크는 다른 섬유에서 찾아 볼 수 없는 우아하고 고상한 광택과 촉감을 갖고 있으므로 다른 섬유보다 고부가가치 소재로서 널리 알려져 있다. 그러나 값이 비싸고 내구성이 좋지 못하여 관리가 어렵고, 구김이 잘 생기는 등 실용적 특성이 부족하여 실크를 대중화, 일반화하지 못하고 있다. 따라서 실크를 다양한 산업분야에 적용하기 위한 소재로 개발하기 위해 본 실험에서는 피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현 시스템을 이용하여 녹색형광실크를 제작하였다.

재료 및 방법

1. 실험곤충 및 전이벡터

형질전환에 사용된 누에(*Bombyx mori*)는 백옥잠(123x124)을 사용하였고, 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육 기준 (온도: 24°C ~ 27°C, 상대습도: 70%~90%)에 준하여 사육하였다. 누에 형질전환에 사용된 전이벡터는 누에 형질전환에 사용된 벡터는 체코의 Jindra 박사로부터 분양 받은 pBac3xP3EGFP 벡터와 helper 벡터인 pHA3PIG를 사용하였다.

2. 누에형질전환용 전이벡터 제작

누에 실크에서 녹색 형광단백질이 발현되는 형질전환 누에를 만들기 위해 피브로인 프로모터와 EGFP 유전자

를 piggyBac 벡터에 도입하여 제작하였다. 먼저 피브로인 프로모터를 얻기 위해서 1,124 bp 프로모터 서열과 1,430 bp N-말단에 피브로인 H 유전자(nt 61,312 to 63,870 of AF226688)의 인트론(972 bp)이 포함된 단편은 누에에서 분리된 genomic DNA와 프라이머 pFibHN-F: 5'-GGCGCGCCGTGCGTGATCAGGAAAAAT-3' (27mer) 와 pFibHN-R: 5'-TGCACCGACTGCAGCACTA GTGCTGAA-3' (27mer)을 사용하여 PCR로 증폭하였고, pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison WI)에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 pGEMT-pFibH-NTD로 명명하였다. H-chain gene ORF의 180 bp 3' 말단과 피브로인 H 유전자(nt 79,021 to 80,009 of AF226688)의 300 bp 3' 영역이 포함된 단편은 누에에서 분리한 genomic DNA와 프라이머 pFibHC-F: 5'-AGCGTCAGTTACG GAGCTGGCAGGGGA-3' (27mer) 와 pFibHC-F: 5'-TATAGTATTCTTAGTTGAGAAGGCATA-3' (27mer)을 사용하여 PCR로 증폭하였고, pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 pGEMT-CTD로 명명하였다. 그리고 pGEMT-pFibH-NTD는 Asc I과 BamH I으로, pGEMT-CTD는 Sal I과 Fse I으로 각각 제한효소 처리함으로써 단편들을 준비하였다. 이들 단편들은 Apa I과 Not I으로 제한효소 처리된 pBluescriptII SK(-) vector (Stratagene, CA)에 함께 클로닝하였고, pFibHNC-null로 명명하였다. 종결코돈이 없는 EGFP 유전자 단편은 프라이머 EGFP-F: 5'-GCGGCCGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' (29mer) 와 EGFP-R: 5'-GCTGAGGCTTGTACAGC TCGTCCAT-3' (25mer)을 사용하여 pEGFP-1 (Clontech, UAS)으로부터 증폭하였고, pGEM-T Easy Vector에 클로닝하였다. 이 플라스미드는 Not I과 Bbvcl I으로 제한효소 처리하였고, 분리된 단편은 Not I과 Bbvcl I으로 제한효소 처리된 pFibHNC-null벡터에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 pFibHNC-EGFP로 명명하였다. 마지막으로 pFibHNC-EGFP를 Asc I과 Fse I으로 제한효소 처리하여 분리된 단편을 Asc I과 Fse I으로 제한효소 처리된 pG-3xP3-DsRed2에 클로닝하였고, 완성된 플라스미드는 pG-3xP3-DsRed2-pFibH-EGFP로 명명하였다.

3. 누에 초기배에 전이벡터 microinjection

형질전환에 사용된 누에알은 산란 후 4시간 이내의 것만 사용하였다. 전이벡터와 helper 벡터의 농도비는 1:1의 비율로 사용하였고, microinjection용 완충용액(5 mM KCl, 0.5 mM Phosphate buffer, pH 7.0)에 0.2 µg/µl의 농도로 희석하였다. 누에 초기배로의 microinjection은 배아의 주공과 후부 사이의 가운데 배면 부분에 주사하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 먼저 텅스텐 침으로 누에알

의 난각에 작은 구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector의 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입하였다. 이때 각 배아에 주입된 DNA 용액의 양은 10 ~ 15 nl가 사용되었고, 난각에 생긴 구멍은 cyanoacrylate 접착제를 사용하여 막았다. 미세주사 후 누에알은 보습한 패트리디쉬에 넣어서 25°C에서 부화할 때까지 보호하였다.

4. 누에형질전환체 선발

형광현미경을 사용한 형질전환체 선발은 Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경과 Leica (USA)사의 Microscope MZ FLIII Fluorescence Filter DsRed 형광필터를 사용하여 세대별, 시기별로 관찰하여 선발하였다. 또한 녹색형광실크의 선발은 Leica (USA)사의 LEICA Z6 APO 현미경과 Leica (USA)사의 Filtersystem 470 LED를 사용하였다.

5. 녹색형광고치의 실크 제작

F2 세대의 형질전환 고치를 80°C 이하의 조건에서 건조한 후 탄산나트륨 0.15%, 비이온계 계면활성제 0.3% 혼합 용액(처리수)에 20분 침지 후 진공으로 고치 안으로 용액을 침투시켰다. 완전히 침지된 고치는 진공상태에서 탈수 시킨 후, 다시 위의 처리수에 진공침투 시킨 후 약 50°C 이하의 조건에서 실을 뽑아냈다.

6. 실크 피브로인 용액 정제

실크 피브로인 용액은 80°C 이하의 온도에서 0.02M sodium carbonate 용액에 20분간 고치를 침지 시킨 후 ddH₂O에 세척하였다. 세척된 고치는 건조 후, 37°C에서 60% LiSCN 용액에 1시간 동안 용해시키고, slide-A-Lyzer dialysis cassettes (MWCO 3,500, Pierce)를 사용하여 3일 동안 염을 제거시켰다.

7. Western blot 분석

확인하고자 하는 단백질을 12% SDS-PAGE 전기영동 후 Semiphore transfer unit (Hoefler, TE-70)를 이용하여 PVDF membrane (Amersham Co., U.S.A.)에 transfer하였다. 비특이적인 반응을 막기 위해 5% skim milk로 2시간 동안 blocking한 후, TBS-T 완충액(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 5분간 2회 세척하였다. 세척 후 blocking 용액에 1차 항체를 적정량 희석해서 넣어주고 상온에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBS-T 완충액으로 상온에서 10분간 5회 세척하고 HRP (horseradish peroxidase)로 표지된 2차 항체를 희석해서 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TBS-T로 상온에서 10분간 5회 세척한 후, 3M paper로 PVDF

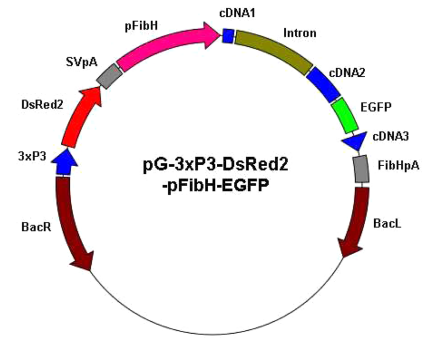


Fig. 1. Construction of the transfer vector pG-3xP3-DsRed2-pFibH-EGFP. The PCR product for ORF flanked by Not I/ Bbv c I site was inserted into pGEM-T vector. The pGEM-T-EGFP was digested with Not I/Bbv c I and then DNA fragment was subcloned into the Not I/Bbv c I site on piggyBac (pG-3xP3-DsRed2-pFibH-EGFP).

membrane에 남아 있는 물기를 제거하였다. ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences., U.S.A.)를 사용하여 PVDF membrane을 상온에서 5분간 반응시킨 후, X-ray film에 노출시킨 후 현상하여 확인하였다.

결 과

1. 형질전환용 전이벡터 제작

녹색형광실크를 생산하는 형질전환 누에를 제작하기 위해 piggyBac 벡터를 이용하여 전이벡터를 구축하였다. 형질전환체를 선발하기 위한 마커 유전자로는 DsRed2 유전자를 사용하였고, 이 유전자의 조절 프로모터로는 3xP3 promoter를 사용하였다. 피브로인 프로모터를 얻기 위해서, 1,124 bp 프로모터 서열과 1,430 bp N-말단에 피브로인 H 유전자(nt 61,312 to 63,870 of AF226688)의 인트론(972 bp)이 포함된 단편을 누에 계놈으로부터 PCR을 이용하여 증폭하였다. 또한 피브로인 H 유전자의 C-말단은 180 bp의 피브로인 H-chain gene ORF 3' 말단과 300 bp의 피브로인 H 유전자(nt 79,021 to 80,009 of AF226688) 3' 영역을 PCR을 이용하여 증폭하였다. 또한, 종결코돈이 없는 EGFP 유전자는 피브로인 H 유전자의 N-말단과 C-말단 사이에 클로닝하였고, pG-3xP3-DsRed2-pFibH-EGFP로 명명하였다 (그림 1).

2. 누에형질전환체 선발

누에형질전환체 제작을 위한 누에 초기배로의 microinjection은 배아의 주공과 후부 사이의 가운데 배면 부분에 microinjection 하였고, 총1200개의 누에알에 microinjection 하였다. 그 결과 124 마리의 유충이 부화되었고, 그 중 54 마리가 성충이 되었다. 성충이 된 나방들은 서로 교배시

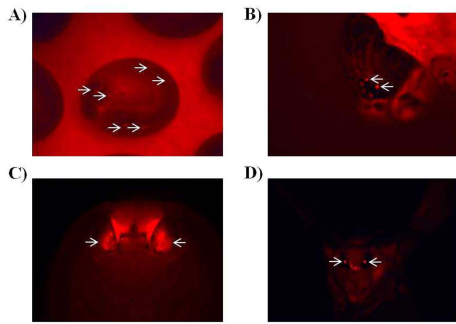


Fig. 2. Fluorescence expression of DsRed2 in transgenic silkworms. A) Eggs were expressed in the eyes and the abdominal nervous system of seven days old F1 embryo. Arrows point to eyes and nervous system in panel. B) Larva was expressed in the eyes of a F1 1th instar larvae. C) and D) fluorescent images of pupa and moth. Arrows point to eyes in panel B, C and D.

Table 1. Results of injection of the construct DNA to Keomokjam embryos

Injected Embryos	Hatched Embryos	G0 broods	G1 broods with EGFPpositive
1,200	124	54	8

*The Keomokjam strain was used as a host strain. The vector plasmids, p3xP3-DsRed2-pFibH-EGFP (200 ng/ul) and the helper plasmid (200 ng/ul) were used for injection.

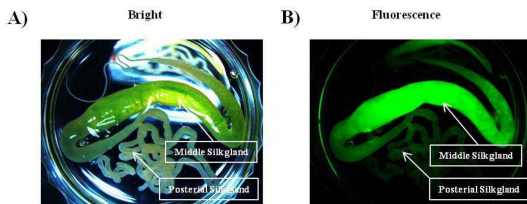


Fig. 3. EGFP fluorescence in the silk gland of the transgenic line. A) The silk glands at the 3th day of the 5th instar larvae of the F3 transgenic silkworm. a) The silk gland was observed under bright field (bright) and b) with the EGFP fluorescence system.

켜 F1세대를 얻은 후, 형질전환체의 선발을 위해 시기별로 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 누에알은 산란 후 3일째에 눈과 신경조직에서 형광이 관찰되었고, 유충과 번데기, 성충은 눈에서 형광이 각각 관찰되었다 (그림 2). 이런 과정을 통해 F1세대에서 8 아구(Bloods)의 형질전환체를 선발할 수 있었다 (표 1).

3. 녹색형광고치 선발

실크 피브로인에서 녹색형광단백질이 발현되는 것을 확인하기 위하여, 먼저 F2세대의 5령 3일 유충을 해부하여 견사선을 확인해 보았다. 그 결과 피브로인을 생산하는 기관인 후부 견사선에서 녹색형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 중부 견사선에서도 녹색형광단백질이

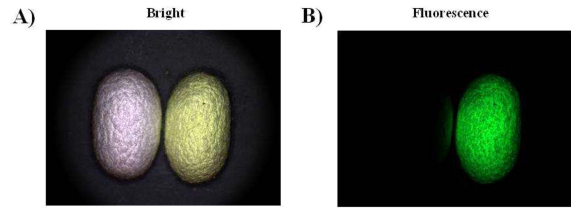


Fig. 4. EGFP fluorescence in the cocoon of the transgenic silkworm. a) A pair of cocoon was observed under bright field (left, normal silkworm; right, transgenic silkworm) and b) with EGFP fluorescence system.

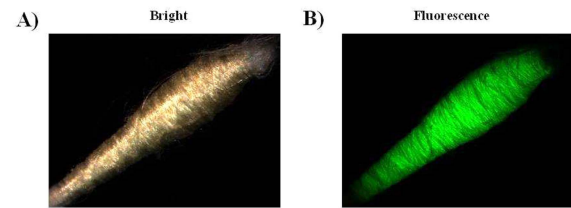


Fig. 5. The EGFP fluorescent colored silks. Left: under white light. Right: illuminated by GFP light.

발현되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3). 또한 F2 세대의 형질전환고치와 실크에서도 녹색형광이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 4, 그림 5).

4. 재조합단백질의 발현 분석

녹색형광고치에서 EGFP 재조합단백질 발현을 확인하기 위해 Western blot으로 분석하였다. 분석에는 F2세대의 녹색형광고치를 사용하였고, 사용된 항체는 Anti-EGFP Mouse monoclonal antibody (UK, Abcam)를 사용하였다. 그 결과 피브로인 H-chain과 EGFP 융합단백질의 예상 위치인 약 40 kDa 보다는 높은 위치에서 밴드를 확인할 수 있었다 (그림 6B).

고 찰

예로부터 누에는 의류용 실크를 생산할 목적으로 사육되었으며, 최근에는 건강보조식품, 유전자 기능 분석 그리고 재조합 단백질 생산을 위한 생체반응장치(Bioreactor) 등의 목적으로 사용되고 있다. 그 중에서 재조합 단백질 생산을 위한 생체반응장치로서 누에 실크를 이용한 연구가 많이 진행되고 있는데, 2003년 일본의 Tomita등이 사람 collagen단백질을 실크의 피브로인 L-chain에서 성공적으로 발현시킴으로써 실크를 이용한 연구가 폭넓게 진행되었다 (Tomita et al. 2003). 본 실험에서는 피브로인 H-chain 재조합단백질 발현 시스템을 이용하여 녹색형광실크를 생산하는 형질전환누에를 제작하였다. 초파리 형질전환에 널리 사용되는 piggyBac 전이벡터에 누에 피브로

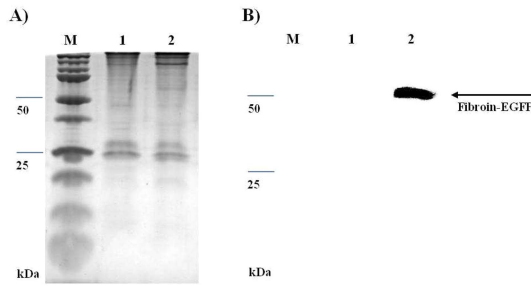


Fig. 6. Analysis of the recombinant protein expression by SDS-PAGE and Western blot. (A) The protein samples were subjected to 12% SDS-PAGE. (B) The protein samples were transferred PVDF membrane and incubated with the anti-EGFP antibody. M, molecular mass standard; 1, normal cocoon; 2, transgenic cocoon with pG-3xP3-DsRed2-pFibH-EGFP. The arrows indicate the fusion protein of EGFP protein and Fibroin protein.

인 H-chain 유래의 promoter와 EGFP 유전자를 이용하여 실크 피브로인에서 녹색형광단백질을 발현시켰고, 누에형질전환체 선발을 위해서는 초파리의 3xP3 promoter와 적색형광유전자인 DsRed2를 사용하였다. 누에형질전환체의 제작은 piggyBac 전이벡터와 helper 벡터의 혼합액을 초기배 상태의 누에알 배아의 주공과 후부 사이의 배면 부분에 microinjection함으로써 형질전환 효율을 향상시킬 수 있었다(Tamura et al. 2000). 1200 개의 누에알을 microinjection 하여 124 마리의 유충이 부화되었고, 그 중에서 54마리 만이 성충이 되었다. 또한 성충들을 서로 교배시켜 F1 세대의 알을 얻었고, 그 중에서 8 bloods 만이 형질전환체로 선발되었다. 형질전환체의 선발은 산란 후 3일째 되는 F1세대의 누에알을 형광현미경으로 관찰하여 선발하였는데, 3xP3 promoter의 특징인 누에 초기배 단계의 눈과 신경조직, 유충과 번데기 그리고 성충의 눈에서 작용한다고 알려져 있어서, 이러한 특징으로 누에형질전환체를 빠르게 선발할 수 있었다 (Thomas et al. 2002). 일반적으로 실크가 생성되는 과정은 누에의 후부 견사선에서 피브로인이 생성된 후 중부 견사선에서 세리신으로 코팅되고 전부 견사선에서 토사공을 통해 밖으로 배출된다. 따라서 피브로인에서 녹색형광단백질이 발현되는 것을 확인하기 위해 5령 3일 누에를 해부하여 후부 견사선을 현광현미경으로 확인하였다. 그 결과 그림 3의 B에서 보는 것처럼 후부 견사선에서 녹색형광이 뚜렷하게 관찰되었고 중부와 전부 견사선에서도 녹색형광이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 누에고치와 저온 정련법으로 제작한 실크에서도 녹색형광이 관찰되었으며, F2세대부터는 형질전환체의 누에고치색이 흰색에서 연녹색으로 점차 변하면서 F7세대에서는 진한 연두색을 나타내었다. 또한 형질전환 된 누에고치에서 EGFP 재조합단백질의 발현분석을 위해 Anti-EGFP antibody를 사용하여 Western blot분

석을 하였다. 비록 피브로인 H-chain과 EGFP 융합단백질의 예상 위치인 약 40 kDa 보다는 높은 위치에서 밴드를 확인할 수 있었지만, 피브로인 H-chain 재조합단백질 발현 시스템에 의해 EGFP 재조합단백질이 누에실크에서 정확하게 발현된다는 것은 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 녹색형광실크를 생산하는 누에형질전환체가 성공적으로 제작 되었음을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 실크를 새로운 산업소재 및 재조합 단백질 대량생산 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

본 연구의 목적은 누에형질전환 기술을 이용하여 녹색형광실크를 개발하는 것으로서, 본 실험에서는 피브로인 H-chain의 N-말단과 C-말단을 이용하여 피브로인 재조합 단백질 발현 시스템을 제작하였고, 종결코돈이 없는 EGFP 유전자를 위의 발현 시스템에 클로닝하여 녹색형광실크를 제작하였다. 누에형질전환체 선발을 위해서는 3xP3 promoter와 DsRed2를 이용하여 선발하였고, 1200 개의 누에알에 microinjection 하여 F1 세대에서 8 bloods의 형질전환체를 선발하였다. 선발된 누에형질전환체는 초기배 단계의 눈과 신경조직, 유충과 번데기 그리고 성충의 눈에서 DsRed2 형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 실크의 피브로인에서 EGFP 단백질이 발현되는 것을 확인하기 위해, F2세대의 누에형질전환체 중에서 5령 3일 유충을 해부하여 견사선을 형광현미경으로 관찰하였고, 중부와 후부 견사선에서 형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 F2 세대의 고치와 저온에서 정련한 실크에서도 녹색형광단백질의 발현을 확인할 수 있었고, Western blot 분석에서도 EGFP 재조합 단백질이 피브로인 H-chain과 융합된 형태로 존재하는 것이 확인되었다. 이상의 결과에서 녹색형광실크를 생산하는 누에형질전환체가 성공적으로 제작 되었음을 확인할 수 있었고 이러한 결과를 토대로 새로운 산업소재로서 실크를 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

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

인 용 문 헌

Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen JS,

- Lu H, Richmond J, Kaplan DL (2003) Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **24**, 401~416.
- Hino R, Tomita M, Yoshizato K (2006) The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **27**, 5715~5724.
- Inoue S, Kanda T, Imamura M, Quan GX, Kojima K, Tanaka H, Tomita M, Hino R, Yoshizato K, Mizuno S, Tamura T (2005) A fibroin secretion-deficient silkworm mutant, Nd-sD, provides an efficient system for producing recombinant proteins. *Insect biochemistry and molecular biology* **35**, 51~59.
- Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J Biol Chem* **275**, 40517~40528.
- Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, Yamada K (2007) Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the fibroin H-chain expression system. *Biochemical and biophysical research communications* **355**, 976~980.
- Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, Yoshizato K (2007) Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *J Biotechnol* **128**, 531~544.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature biotechnology* **18**, 81~84.
- Tanaka K, Kajiyama N, Ishikura K, Waga S, Kikuchi A, Ohtomo K, Takagi T, Mizuno S (1999) Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Bba-Protein Struct M* **1432**, 92~103.
- Thomas JL, Da Rocha M, Besse A, Mauchamp B, Chavancy G (2002) 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect biochemistry and molecular biology* **32**, 247~253.
- 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. *Nature biotechnology* **21**, 52~56.
- Yamada H, Nakao H, Takasu Y, Tsubouchi K (2001) Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Mat Sci Eng C-Bio S* **14**, 41~46.
- Zhao Y, Li X, Cao G, Xue R, Gong C (2009) Expression of hIGF-I in the silk glands of transgenic silkworms and in transformed silkworm cells. *Sci China C Life Sci* **52**, 1131~1139.
- Zhou CZ, Confalonieri F, Esnault C, Zivanovic Y, Jacquet M, Janin J, Perasso R, Li ZG, Duguet M (2003) The 62-kb upstream region of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene is clustered of repetitive elements and candidate matrix association regions. *Gene* **312**, 189~195.
- Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, Jacquet M, Janin J, Duguet M, Perasso R, Li ZG (2000) Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res* **28**, 2413~2419.