

누에나방 수명관련 특이발현 유전자 탐색

최광호* · 구태원 · 김성렬 · 김성완 · 강석우 · 강필돈
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

Investigation of lifespan related genes of the silkmoth, *Bombyx mori* L

Kwang-Ho Choi*, Tae-Won Goo, Seong-Ryul Kim, Sung-Wan Kim, Seok-Woo Kang and Pil-Don Kang
Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

(Received October 08, 2013, Accepted October 22, 2013)

ABSTRACT

In general, the mean silkmoth lifespan is around 8 days for female and 5 days for male. But, the duration of J037 strain's lifespan is remarkably long in both sexes. On the contrary, the Daizo(sdi) strain has a remarkably short lifetime. The differences in adult lifetime among various silkworm strains has been suggested that the adult lifetime may be genetically controlled. In this experiment, using J037 and Daizo strains we investigated genetic factors related to the adult lifetime of silkworm. We constructed the full-length cDNA library from the adult male of the J037 strain. A total of 2,688 clones were randomly selected, and we performed a differential display hybridization with cDNA probes generated from J037 and Daizo adult males. In conclusion, 193 clones were identified as differential expressed genes, and 154 unique genes were generated after the assembly of 193 clones. Of the 154 unique genes, the most abundant genes were cytochrome oxidase subunit-1 gene(9 times) and unknown(clone ID; 1-50) gene(5 times). The functional groups of these unique genes with matches in the AmiGo database were constructed according to their putative molecular functions. Among thirteen functional categories, the largest group was unclassified protein(24%). In addition, we analyzed the nucleotide and deduced amino acid sequences of the most highly occurred gene(1-50, EF434397), which consisted of 240 amino acids. However, it is confirmed yet that these genes really have an affected on the silkworms longevity. Further studies on these molecules biological roles will give us well-fined information about mechanisms of insect aging and/or senescence.

Key words : Silkworm, Lifespan, cDNA library, EST

서 론

cDNA 유전자은행 제작 및 발현 유전자 꼬리표(EST) 염기서열 해독을 통한 유전정보의 데이터베이스 분석법은 생체 또는 세포에서 발현되는 유전자군의 종합적 분석을 가능하게 하는 가장 보편적인 방법이며(Olsen et al. 1989), 생물 계통 연구에서도 cDNA 부분 염기서열 정보가 반드시 필요하다(Goldsmith et al. 2005). EST 기술은 특정 세포나 조직의 발달 단계에 따른 유전자 발현 양상을 분석하기 위한 도구로도 널리 활용되고 있는데, 배양 세포계 또는 모델생물로부터 물리적, 화학적 스트레스에 특이 발현하는 유전자를 선별하거나 유전자 발현 변

화를 관찰하기 위한 기술로도 활용되고 있다(Adams et al. 1991, Newman et al. 1994). 이렇듯 EST 데이터베이스 활용이 유전자 기능분석이나 새로운 유전자 발굴에 보편적으로 사용되는 이유는, 실험대상으로부터 얻은 아미노산 및 DNA 염기 서열을 기존의 데이터베이스와 연계함으로써 목적하는 유전자의 탐색이 용이하고 새로운 유전자의 기능도 추정할 수 있기 때문이다(Boguski et al. 1994).

지난 반세기 동안, 분자생물학과 유전공학의 발달로 많은 생물종 유전체 연구가 급속도로 발전하고 있다. 여기에는 조직이나 세포단위의 유전자 전사복제 및 단백질 생합성, 이들의 상호작용 및 염색체 구조 및 기능 등에 관한 기본적인 연구뿐만 아니라 생물체 수명 결정에 관여

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

하는 유전자 발현연구도 활발하다. 선충으로부터 확인된 수명 유전자로서는 *age-1*, *dauer*, *daf*, *spe*, *mev*, *clk* 등이 있으며(David and Johnson 1987), 이 중 *daf-16* 유전자는 수명에 영향을 미치는 여러 인자들을 종합적으로 조절하여 선충 수명의 핵심적 기능을 한다(Coleen et al. 2003). 초파리에서도 *Mus*, *NDC*, *SOD*, *CAT*, *EF*, *InR* 등이 수명과 관련된 유전자로 알려져 있는데(Anne et al. 2005, Johannes et al. 2004, Satomi et al. 2003), 초파리 *methuselah* 유전자는 초파리 수명을 최대 35% 까지 조절할 수 있다고 보고되어 있다(Lin et al. 1998). 이 외에도 수명과 노화현상을 규명하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있는데, 인간 등 생물체가 성장(노화) 하면서 점차로 짧아지는 염색체 끝무(telomere)에 관한 연구가 보고된 바 있다(Bodnar et al. 1998, Chantal et al. 1996, Nakamura et al. 1998).

일반적으로 동일한 사육 조건에서 암나방은 수나방에 비해 약 1.5배 생존시수가 길어지고(Murakami 1991), 누에 표준사육환경(25°C) 조건에서 암나방은 7~10일, 수나방은 4~5일간 생존한다고 알려져 있다. 그러나 누에 교잡종의 경우는 성충 수명이 더욱 길어진다는 보고가 있다(Murakami 1989). 이러한 수명 기작은 누에의 brain-central nervous system에서 관장한다는 결과도 알려진 바 있다(Murakami and Shimada 1988). Kang 등(1999)은 최장명누에 품종인 J037과 최단명 품종인 Daizo(sdi)로부터 체액단백질에 대한 SDS-PAGE 패턴을 비교한 실험에서, 장·단명 누에 품종 간 뚜렷이 구분되는 단백질 패턴은 없으나 특정 단백질에서는 성충시기에 품종 간 뚜렷한 양적 차이를 확인한 바 있다.

분자생물학 연구에서 생체 내 서로 다른 조직과 환경으로부터 생성되는 다양한 전사체들을 탐침으로 새로운 유전자를 선별하기 위한 방법으로서 발현유전자 차별화 선별법(differential display hybridization)이 널리 이용되고 있는데(Kim et al. 1996), 이러한 분석 방법을 수명 시수가 명확히 차이나는 누에나방에 적용한다면 누에나방 수명 현상과 관련된 유전자들을 분리할 수 있을 것으로 예상된다. 이에 본 연구에서는 국립농업과학원에서 보유하고 있는 대표적인 장명 및 단명누에 품종인 J037과 Daizo(sdi)의 수나방으로부터 발현유전자 차별화선별법을 이용하여 누에 수명과 관련한 유전자를 선별하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시 누에 및 RNA 순수분리

장·단명 누에 수나방으로부터 수명과 관련한 특이발현 유전자를 선별하기 위한 공시 누에 품종으로서 국립농업과학원 잠사양봉소재과에서 사육한 장명누에 품종 J037과 단명누에 품종 Daizo(sdi)를 사용하였다. J037과 Daizo는

국립농업과학원이 보유중인 누에 유전자원 중 성충 생존 일수 차가 가장 큰 것으로 알려져 있다(Kang et al. 1999). J037과 Daizo 품종의 우화 직후 수나방 약 100 mg을 각각 액체질소가 담긴 유발에서 마쇄한 후 RNA isolation kit(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 제조사 매뉴얼에 따라 total RNA를 순수분리하고 분광광도계로 정량한 후 실험 때까지 -80°C에 보관하였다.

2. cDNA 유전자은행 제작

장명누에 품종 J037의 수나방 total RNA는 Micro-FastTrack 2.0™ mRNA Isolation Kit(Invitrogen, Calsbad, CA)을 사용하여 poly(A)⁺ RNA를 순수 분리한 후 cDNA 유전자은행을 제작하였다. cDNA 유전자은행 제작은 ZAP-cDNA synthesis kit와 Gigapack III Gold packaging extract(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하였다. 분리한 poly(A)⁺ RNA에 *Xho* I linker primer와 역전사효소를 사용하여 2nd-strand cDNA로 합성하였다.

DNA 중합효소를 이용하여 2nd-strand cDNA의 말단을 평활말단으로 만든 다음 *EcoR* I adapter를 부착시키고 *Xho* I으로 절단한 후 1 ml 플라스틱 피펫을 이용하여 cDNA를 size별로 분획하여, 500 bp 이상 크기의 분획구만을 수거하였다. 분획한 cDNA는 Uni-ZAP XP vector에 결합시켜 삽입한 후 ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit(Stratagene, La Jolla, CA)의 매뉴얼에 따라 완전한 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로 packaging 함으로써 장명누에(J037) 수나방 cDNA 유전자은행을 제작하였다. 제작된 cDNA 유전자은행은 숙주세포(XL1-Blue MRF' strain)를 사용하여 phage 농도를 조사하였다.

3. 차별화선별 수명관련 유전자 선별

제작된 cDNA 유전자은행으로부터 *in vivo* excision에 의해 무작위로 2,688개 콜로니를 선별하여 ampicillin이 첨가된 LB 액상배지(1 ml)에서 37°C, 12시간 진탕배양한 후 MWG plasmid prep 96(MWG AG Biotech)을 사용하여 2,688개 플라스미드 DNA를 순수 분리하여 농도를 조사하였다. 분리한 플라스미드는 100°C, 5분간 변성시킨 후 두 장의 나일론 막에 동량의 플라스미드 DNA(500 ng)를 각각 점적하였다. 두 장의 나일론 막은 J037 수나방에서 분리한 poly(A)⁺ RNA와 Daizo 수나방에서 분리한 poly(A)⁺ RNA를 각각 M-MLV 역전사효소를 사용하여 1st-strand cDNA를 합성하고 농도를 조사한 후 차별화선별을 위한 탐침으로 사용하였다. 탐침 제조는 J037과 Daizo 수나방 1st-strand cDNA 1 μg씩을 각각 1.5 ml 튜브에 넣고, 여기에 1 μg oligo(dT) primer, dGTP, dCTP, dTTP (20 mM/each), 120 uM dATP, 10 μl [α-32P] dATP (3,000 Ci/mmol)와 20unitsunits M-

MLV 역전사효소를 함께 넣고 1시간 동안 역전사반응을 유도하였다. 여기에 2 units RNaseH를 첨가하고 37°C, 15분간 반응한 후 동위원소가 표지된 cDNA만을 G-50 Sepadex(GE Healthcare) 칼럼으로 정제하여 발현유전자 차별화선별을 위한 DNA-DNA hybridization 탐침으로 사용하였다.

4. 부분 염기서열 분석 및 유전자 꼬리표 작성

차별화선별을 통해 선발된 누에 수명 관련 클론의 부분 염기서열 분석은 자동염기서열 분석장치(Perkin Elmer, ABI377)를 사용하여 수행하였다. 각 염기의 표지는 Bigdye ready reaction kit(Applied Biosystems)를 이용하여 반응액을 조제하고 PCR 증폭을 수행한 후, 반응산물을 정제하여 4.5% 아크릴아마이드겔에서 전개하였다. 아크릴아마이드 예비통전은 30 W로 20분간 하였으며, 시료주입은 정제한 PCR 산물에 formamide 5 µl와 50 mM EDTA 1 µl를 넣어 96°C에서 2분간 변성시킨 후 급냉하여 각 well에 2 µl씩 분주하였다. 염기서열은 DNA Sequencing Analysis Software(Perkin Elmer)에 의해서 분석하였다. 그 후 얻어진 염기서열은 GenBank 데이터베이스를 통한 상동성 분석을 수행한 후 선발된 누에 수명관련 주요 유전자 정보는 국제유전자은행에 등록하였다.

5. 수명관련 선발유전자 기능 분류

차별화선별로 선발된 누에 수명관련 유전자의 기능별 분류는 AmiGo database(<http://www.godatabase.org>)를 통해 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 functional classification catalogue와 비교하여 수행하였다(Ashburner et al. 2000). 본 연구에서는 선발된 154개 수명 관련 선발 독립유전자를 control of cellular organization 등 13개 기능으로 분류하였다.

6. Northern hybridization

선발된 누에 수명관련 주요 선발유전자(ID; 1-50)의 구조 분석을 위해, northern hybridization 분석을 수행하였다. J037과 Daizo 수나방에서 분리한 100 ng의 각각의 total RNA는 1.8% formaldehyde와 1×FA gel buffer(200 mM MOPS, 50 mM Sodium acetate, 10 mM EDTA)가 함유된 1.2% agarose gel에서 전개, 나일론 막에 흡착한 후 UV cross-linker로서 흡착된 RNA를 고정 하였다. 선발유전자(ID; 1-50)의 약 1.4 kb를 사용하여 상기 언급한 제조 방법으로 탐침을 제작, hybridization buffer (%×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.5% SDS, 50 mg/ml denatured salmon sperm DNA)에서 65°C, 16시간 동안 northern hybridization을 수행하였다. 각각의 나일론 막은 3회 세척과정을 거친 후 X-ray film에 감광 후 선발 수명유전자별 전사체 크기 및 발현 특성을 분석하였다.

Table 1. Summary of cDNA library generated from the emerged adult male of J037 longevity inbred strain

Characterization	cDNA library (J037 adult male)
No. of tested clones	105
Titer (pfu/ml)	> 1.5 × 10 ⁶
Average insert size (bp)	1,300

결과 및 고찰

1. 장명 수나방 cDNA 유전자은행 제작

본 연구에서 사용한 장단명누에 품종 간 나방의 생존 시수는 장명인 J037 품종의 암·수나방이 각각 평균 16.1일과 15.8일, 단명인 Daizo 품종은 암·수 평균 3.9일과 4.6일 생존한다고 알려져 있다(Kang et al. 1999). 따라서 생존기간의 뚜렷한 차이를 보이는 두 누에 품종 수나방을 대상으로, 발현유전자 차별화선별법을 활용하여 발현 유전자군의 차이를 조사함으로써 누에의 수명과 관련한 유전자를 선발할 수 있을 것으로 사료된다.

J037 수나방 total RNA를 사용하여 cDNA 유전자은행을 제작하였다. 제작된 cDNA 유전자은행으로부터 *in vivo* excision을 통해 pBluescript SK⁺ 플라스미드 벡터에 클로닝된 105개 클론을 무작위 추출하여 pfu, insert ratio 및 insert size를 조사하였다. 제작된 cDNA 유전자은행 역가(titer)는 1.5 × 10⁶ pfu/ml 였다. 또한 평균 insert size 측정 은 T3 promoter primer와 T7 promoter primer를 이용한 PCR 증폭 후 조사하였는데, insert size는 약 1,300 bp 이상이었으며, 그 중 2,000 bp 이상인 클론도 다수 포함되어 있었다(Table 1). 일반적으로 유전자은행의 효율성은 제작된 cDNA 유전자은행의 plaque forming unit(pfu), 단편의 삽입률(insert ratio) 및 삽입 단편의 크기 등으로 판단할 수 있는데(Sung et al. 1998), 본 연구에서 제작된 J037 수나방 cDNA 유전자은행은 유전자 선발과 분석에 적합한 것으로 판단되었다.

2. 차별화선별법에 의한 수명관련 클론 선발

제작된 J037 수나방 cDNA 유전자은행으로부터 2,688개 클론을 무작위 선발하여 ampicillin이 첨가된 LB 액상배지에서 배양한 후 플라스미드 DNA를 순수 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA를 100°C에서 5분간 변성한 후 500 ng의 DNA를 두 장의 나일론 막에 각각 점적하였다. DNA가 점적된 나일론 막은 우화 직후의 장·단명 수나방 mRNA로부터 합성된 1st-strand cDNA를 탐침으로 하여 DNA-DNA hybridization에 의한 차별화선별을 수행하였다. 차별화선별 결과, 선발된 차별화발현 클론 수는 전체 조

사한 클론수의 7.2%인 193개로 조사되었다(Fig. 1).

3. 선발 차별화발현 클론 EST 작성

차별화선별법에 의해 선발된 193개 클론에 대해 부분 염기서열 분석을 통한 EST를 작성하였다. 총 193개 EST를 대상으로 50 bp에서 95% 이상의 상동성이 인정되는 값으로 모두 154개의 독립유전자(unigene)로 assembly할 수 있었는데, 이는 전체 분석한 클론 수의 5.7%를 차지하였다. 154개 독립유전자는 장명 J037 품종 탐침에서 과발현된 124개(80.5%)와 단명 Daizo 품종 탐침에서 과발현된 30개(19.5%)의 독립유전자로 구성되었다(Table 2). 선발된 154개 독립유전자는 2회 이상 출현 빈도를 보인

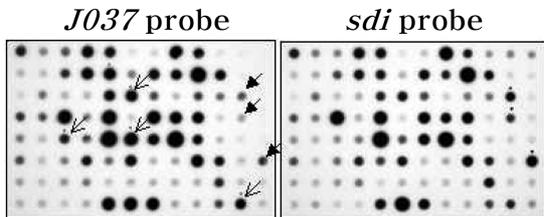


Fig. 1. Differential display dot hybridization analysis. To find a lifespan related gene, differential dot blotting hybridization was performed with the two radio-labeled 1st-strand cDNA generated from adult males(J037 and sdi). Differentially expressed clones were indicated by thick arrows(up-regulated in J037) and thin arrows(up-regulated in sdi), respectively.

Table 2. Characterization of 154 non-redundant differentially expressed genes probably associated with lifespan of silkworm

No. of total tested clones	No. of differential expressed genes	Characterization	
		Up-regulated in J037	Up-regulated in sdi
2,688	154 (5.7%) ^a	124 (80.5%) ^b	30 (19.5%) ^b

^aPercentage in the total clones tested in this experiment.

^bPercentages in the number of differentially expressed clones.

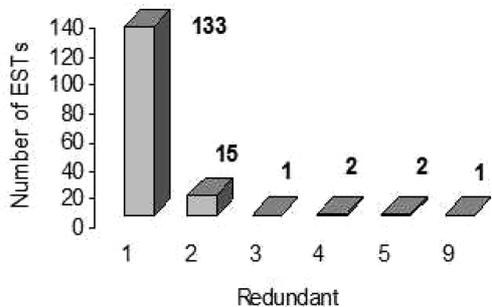


Fig. 2. Histogram showing the number of presumed lifespan-related genes at each level of their redundancy. In total 193 identified clones, 21 appeared at least two times, whereas 133 clones appeared just once.

유전자가 21개(13.6%)였으며, 나머지 133개 독립유전자(86.4%)는 한 번 출현하는 유전자였다(Fig. 2).

한편, 3회 이상의 출현빈도를 갖는 독립유전자 중 cytochrome C oxidase subunit 1(gil58529281)이 가장 높은 9회 출현빈도를 나타내어 전체 독립유전자의 5.8%를 차지하였다(Table 3). BLAST score와 E-value는 유전자 간 상동성의 중요한 판단 기준으로서, 미지의 유전자 기능을 유추하는데 필수적인 판단기준이다(Newman et al. 1994). 본 연구를 통해 선발된 수나방 수명관련 독립유전자의 상동성 분석 결과, 대부분 독립유전자가 기존 보고된 유전자의 정보와는 대체로 낮은 수준의 상동성이 인정되거나 상동성이 없는 것으로 확인되었다(Table 3). 차후, 상동성 분석에 의한 미지의 수명 관련 유전자의 기능분석 및 분자생리학적 연구를 통하여 누에 수명현상과의 연관성 규명이 필요할 것으로 사료된다.

4. 수명관련 선발유전자의 기능별 분류

선발된 154개 수나방 수명관련 독립유전자의 기능별 분

Table 3. Characterization of the most highly-occurred (> 3 times) clones

ID	Occur.	Putative identification	Accession No. (GenBank)	Score ^a	E-value ^b
1-46	9	gil58529281 cytochrome C oxidase sub.1like	EF514896.1	199	5.0E-50
1-50	5	unknown	EF434397.1	-	-
1-15	5	unknown	EF440436.1	-	-
2-52	4	gil224745161 Titin-like protein	EF440441.1	237	6.0E-62
1-49	3	unknown	EF434396.1	-	-

^aBLASTx stringency score.

^bBLASTx expected value obtained from homology analysis between the ESTs and nr/aa database.

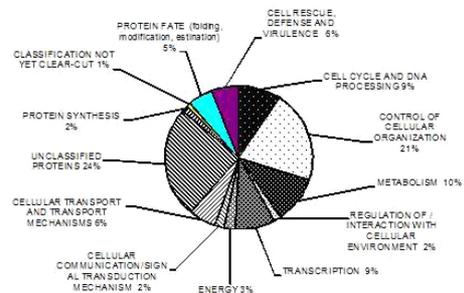


Fig. 3. Functional categorization of 154 presumed lifespan-related genes based on the ontology (AmiGo). Functional classification of 154 non-redundant unigenes according to their biological process.

석·분류는 AmiGo database (<http://www.godatabase.org>)를 활용하여 13개 세포내 기능별 카테고리 분류하였다. 본 연구에서 선발된 독립유전자의 기능 분류 결과, 전체의 24%로 가장 많은 독립유전자인 unclassified protein 기능군은 아직까지 기능이 밝혀지지 않았거나 미분류로 남아 있다고 확인된다. 다음으로는 control of cellular organization 과 metabolism 기능군에 각각 21%, 10%가 포함되어 있었으며, protein synthesis 그룹과 cellular communication 기능군은 각각 2%로서 가장 낮았다(Fig. 3).

5. 주요 선발유전자 구조분석

본 연구에서 선발된 수명관련 클론 중, 출현빈도가 높으나 아직까지 기능이 알려지지 않은 것으로 조사된 ‘1-50’ 클론의 전체 cDNA 염기서열 및 아미노산 정보를 분석하였다. 1-50 클론의 정확한 구조분석을 위해 northern hybridization 분석으로 전사체 크기를 측정하였다. 전사체 크기측정을 위해 사용된 탐침은 [³²P] dATP로 표지한 1-50 cDNA(1.4 kb)를 사용하였다. northern hybridization 결과, 누에 수명관련 유전자 1-50의 전사체(mRNA)는 장단명에서 동일한 크기로 발현됨이 확인되었으며, 그 크기는 약 1.5 kb 인 것으로 추정되었다(Fig. 4). 따라서 본 연구에서 선발된 1-50 클론은 완전장 유전자로서 해당 유전자의 모든 정보를 담고 있다고 판단할 수 있었다. 1-50 클론의 전체 염기서열 분석결과, 전체 1,523 bp의 염기로 구성되어 있었고, 723 bp로 구성된 Open Reading Frame(ORF)로서 240개의 아미노산을 coding하고 있었다(Fig. 5). 본 연구에서 분석된 ‘1-50’ 유전자 염기서열정보는 국제유전자은행 EST online database(GenBank accession No. EF434397)에 등록하였다.

곤충의 수명이나 노화에 관여하는 요인들로서 곤충의 유전적 요인, 곤충에 공급되는 먹이, 사육밀도·온도 및 산소량 등이 보고된 바 있다(Murphy et al. 1983, Giesel et al. 1982, Strehler 1980). 교미행동과 곤충의 수명에 관한 연구에서는 교미하지 않은 암컷과 수컷은 교미한 초파리에 비해 생존시수가 길었다는 보고하고 있다(Patridge

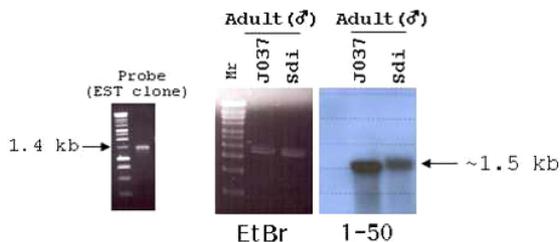


Fig. 4. Northern hybridization analysis of the presumed lifespan-related gene(1-50, EF434397) of silkworm. Total RNAs were isolated at J037 and sdi(Daizo) adult male, respectively. cDNA(ID, 1-50) was used as probe.

CGGCCCGAGGAATTTACAACCTATGAACGACACAGAAAATACCCCTATAGCCCATTA	60
ATGACTACAGAAAATACACCCAATAGCGCGCGCAACGACTACAGAAAATACACCCAATGGC	120
M T T E N T P N S A G N D Y R N T P N G	20
ATGTCTGGCAGCAGACTGTTGTAATTAATCAGATGCGTGATAATCTACGGTTACACT	180
M S G T R L F V I N Q M R D N P Y G Y T	40
TTGCAATATTACGGGCCCTGTTCAAAAATAGGGCCACATCTACAATTTCCCTCGACAAG	240
L Q Y Y G P P V Q N K G H I Y N F L D K	60
CCTCACAGACAAGGACGAATTGTTGGACAAGATAATTGATTTCCCATTTAGGCACATC	300
L H K T K D E L L D K I I D F P F R H I	80
AATTTGGGGGAAACATTAACATGCGAATGACATGACAGACAAGATGGATGCCAAT	360
N L R G N I N Y A N D M Q S N R W M P N	100
AATATACCGAGGTTGGACAACCGTCTGGGACAACTGCCAATGCTTTAAGTGACCGA	420
N I P R L D N G L G D K L P M L L S D R	120
CGTGGAACTCCATGGTGGATGACGACTGCTGTGGACGTAGAGACCGACGTGGAACTCC	480
R G N S M V D D D C C G R R D R R G N S	140
ATGATGGATGACGACTGCTGTGGACGTAGACAATAAATTAACCTAACCTAATTAACA	540
M M D D D C C G R R D N N L N Y P N Y N	160
AGTGTGCGGTACCTCATCTGTATTGCTGCGGTGCGGTCCAGCCTCATCCTTGATGGGC	600
S D A V P H L Y S S R A V Q P H P W M G	180
CAGGAGTTGAATTCACCGTCCCGACATAAATGACACTCACATTCCTGTCATGCGCAG	660
Q E L N S N R P D N N M H S H S C H A Q	200
GACGAACTCCAACCGACTGGGAACAACAAATATGACAGACGACAGTTGATGCGCCCT	720
D A N S N R L G N N N Y A D A V D A P P	220
CATGTTGGGACGTGAAGGATGCAAGACCCAGCCCTTGACAACAGGATGCGACGTTGG	780
H V W D V K D A R P S P L D N R M A A W	240
*	
<u>TAATGACTGTGATCCCTCCGACTTGTAAATTTTATGATTTTTCAAAA</u> GCAACTGTCCCT	840
GGAGCGTTTTATAAAAAGCTTGGACTATGAGAAGAAGATAATGAAGATTTCACTTTTA	900
TTTTGATCTTTTCCCTGATTTGTAACCTGCAAGG ATAAATTTTAAACCCAAAAA	960

Fig. 5. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the presumed lifespan-related gene(1-50, EF434397). The predicted amino acid sequence is shown upside the nucleotide sequence within the open reading frame. The translation start codon and stop codon, polyadenylation signal and poly-A tail are indicated by underlines, respectively.

et al. 1986, Patridge and Andrews 1985). 그러나 누에의 수명과 노화에 관한 연구로서는, 누에나방의 수명에 관해서는 품종 간 생존시수의 차이 등 생태학적 연구가 주로 이루어졌으며, 최근에 이르러서야 누에 체액단백질에 관한 연구, free radical 그리고 telomere와 telomerase에 관한 연구 결과가 보고된 바 있다(Kang et al. 1999, Tomohiro et al. 2001, Yan and Sohal 1998). 또한, 누에에서는 성충의 생존시수(2~3일)를 조절할 수 있는 sdi(short duration of imaginal lifetime) 유전자가 상염색체에서 확인되었다(Murakami 1989).

유전공학 및 분자유종학의 비약적인 성장으로 다양한 생물종에서 수명 현상을 해석하려는 분자 수준의 연구가 활발히 진행되고 있다(Bodnar et al. 1998, Coleen et al. 2003, Lin et al. 1998, Tomohiro et al. 2001, Yan and Sohal 1998). 하지만 이러한 일련의 연구에도 불구하고 생명현상에 대한 포괄적인 정보 분석이 이루어지지 못하고 있다. 특히, 실험의 효율성과 편의성으로 인해 효모, 세균, 선충 및 초파리 등을 수명현상 해석을 위한 모델 생물체로 사용하고 있는데, 이는 분류학적 근연관계에 있어서 누에에 비하여 인간과의 유전적 거리가 더욱 멀다고 할

수 있다. 따라서 누에의 수명과 관련한 분자생물학적 요인의 발굴은 인간의 생명현상 연구를 위한 효과적인 모델을 제시할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 작성된 누에나방 수명 관련 선발유전자 정보는 향후 곤충을 포함한 생물체의 수명과 노화 현상 연구를 위한 유용한 정보가 될 것으로 기대한다.

적 요

일반적으로 누에나방의 평균 생존시수는 암컷과 수컷이 각각 8일과 5일로 알려져 있다. 그러나 J037 품종의 성충 수명은 상당히 길며, 반대로 Daizo(sdi) 품종은 상당히 짧은 성충 수명 특성을 갖고 있다. 이러한 누에 품종 간 성충 수명의 차이는 유전적 차이에 따른 현상으로 추정되어 왔다. 본 연구에서는 장단명누에 품종의 발현유전자를 분석함으로써 누에 수명 관련 유전자를 탐색하여 그 특성을 분석하고자 하였다. 우선, 장명 수나방 mRNA를 사용하여 cDNA 유전자은행을 제작하고, 제작된 유전자은행으로부터 2,688개 클론을 무작위 선발한 후 장단명 수나방 cDNA를 각각의 탐침으로 차별화실험을 수행하였다. 본 연구에서 차별화 발현하는 193개의 클론을 선발하여 EST 상동성 분석을 통해 최종적으로 154개의 J037 수나방 수명 관련 독립유전자를 선발할 수 있었는데, 장명 탐침에서 과발현하는 124개와 단명 탐침에서 과발현하는 30개로 구성된다. 154개 독립유전자 중 가장 많은 발현빈도를 보인 유전자는 cytochrome oxidase subunit-1으로서 모두 9회로 확인되었고, 현재까지 기능에 관해 알려진 바 없는 1-50번 독립유전자가 5회로 두 번째로 높은 발현빈도를 보였다. 154개 선발 독립유전자를 기능별로 분류한 결과, unclassified protein군에 가장 많은 24%의 독립유전자가 포함되어 있었다. 본 연구에서 두 번째로 발현빈도가 높은 클론(ID:1-50)의 염기서열 및 아미노산 서열을 분석하였는데, 1-50번 유전자는 전체 1,523 bp 염기로 구성되어 있으며, 723개 염기쌍이 240개의 아미노산을 coding 하고 있었다. 본 연구에서 선발된 주요 수명 관련 유전자는 국제유전자은행 EST database에 등록하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다사업(PJ0084752013)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

Adams MD, Kelley JM, Goocayne JD, Dubnick M,

- Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Keriavage AR, McCombie WR, Venter JC (1991) Complementary DNA sequencing; expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**, 1651~1656.
- Anne CVB, Mockett RJ, William CO, Rajindar SS (2005) Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic *Drosophila*. *Biochem J* **391**, 277~284.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Lsseltarver L, Lasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology; tool for the unification of biology. *Nat Genet* **25**, 25~29.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349~352.
- Boguski MS, Tolstoshev CM, Bassett DE Jr (1994) Gene discovery in dbEST. *Science* **265**, 1993~1994.
- Chantal W, Anne MV, Nathalie L, Laurence C, Heinz T, Fritz M (1996) Telomeric repeats (TTAGGC)_n are sufficient for chromosome capping function in *Caenorhabditis elegans*. *PANS* **93**, 8983~8988.
- Coleen TM, Steven AM, Cornelia IB, Fraser A, Kamath RS, Li JAH, Kenyon C (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 277~283.
- David BF, Johnson TF (1987) A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* **118**, 75~86.
- Giesel JT, Murphy PA, Manlove MN (1982) The influence of temperature on genetic interrelationships of life history traits in a population of *Drosophila melanogaster*: What tangled data sets we weave. *Nature* **119(4)**, 464~479.
- Goldsmith MR, Shimada T, Abe H (2005) The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu Rev Entomol* **50**, 71~100.
- Johannes HB, Stephan G, Graham GB, Stephen LH (2004) An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **101**, 12980~12985.
- Kang PD, Yun HJ, Ryu KS, Shon BH, Shon HD (1999) Electrophoretic patterns of varieties with long and short life span in the silkworm *Bombyx mori* L. *Korean J Seric Sci* **41(1)**, 1~8.
- Kim SH, Je YH, Yun EY, Kang SW, Kim KY, Kang SK (1996) Isolation and characterization of inducible genes from *Bombyx mori* injected with *E. coli* by differential screening. *Korean J Seric Sci* **38(1)**, 19~24.
- Lin YJ, Seroude L, Benzer S (1998) Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* **282**, 943~945.
- Murakami A (1991) Genetic studies on growth and aging in the silkworm (*Bombyx mori*):b. Growth rate in the pupal stage. *Ann Rept Natl Inst Genetics* **41**, pp.54.
- Murakami A (1989) Genetic studies on silkworm adult lifespan:c. Sex differences and their biological significance. *Ann Rept*

- Natl Inst Genetics **39**, pp.70.
- Murakami A, Shimada J (1988) Genetic studies on the lifespan of adult silkworms effect of removal of brain. Ann Rept Natl Inst Genetics **38**, pp.67~68.
- Murphy PA, Giese TJ, Manlove MN (1983) Temperature effects on life history variation in *Drosophila simulans*. Evolution **37**(6), 1181~1192.
- Nakamura TM, Julia PC, Thomas RC (1998) Two modes of survival of fission yeast without telomerase. Science **282**, 493~496.
- Newman T, Bruijijin FJ, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohlrogge J, Raikhel N, Somerville S, Thomashow M (1994) Gene galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous arabidopsis cDNA clones. Plant Physiol **106**, 1241~1255.
- Olsen M, Hood L, Cantor C, Botstein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. Science **245**, 1434~1435.
- Partridge L, Fowler K, Trevitt S, Sharp W (1986) An examination of the effects of males on the survival and egg-production rates of female *Drosophila melanogaster*. J Insect Physiol **32**, 925~929.
- Partridge L, Andrews R (1985) The effect of reproductive activity on the longevity of male *Drosophila melanogaster* is not caused by an acceleration of ageing. J Insect Physiol **31**, 393~395.
- Satomi M, Pierre JS, Linda P, Brand MD (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by drosophila mitochondria. Free Radical Biology & Medicine **35**, 938~948.
- Strehler BL (1980) A critique of theory of biological aging. In : Aging its chemistry(ed. by Beckman, A.O.). The American Association for clinical Inc, pp.25~26.
- Sung SK, Jeong DH, Nam JM, Kim SH, Kim SR, An GH (1998) Expressed sequence tags of fruits, peels and carpels and analysis of mRNA expression levels of the tagged cDNAs of fruits from the fuji apple. Mol Cells **8**, 565~577.
- Tomohiro A, Takahashi H, Fujiwara H (2001) Sequence-specific recognition and cleavage of telomeric repeat (TTAGG)_n by endonuclease of non-long terminal repeat retrotransposon TRAS1. Mol Cell Biol **21**, 100~108.
- Yan LJ, Sohal RS (1998) Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. PNAS **95**, 12896~12901.