

## 피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현시스템을 이용한 황색형광실크의 제작

김성완<sup>1</sup> · 최광호<sup>1</sup> · 김성렬<sup>1</sup> · 윤은영<sup>1</sup> · 박승원<sup>3</sup> · 강석우<sup>1</sup> · 구태원<sup>2\*</sup>  
<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>2</sup>동국대학교, <sup>3</sup>대구가톨릭대학교

### Production of the yellow fluorescent silk using the fibroin heavy chain protein expression system in transgenic silkworm

Seong Wan Kim<sup>1</sup>, Kwang-Ho Choi<sup>1</sup>, Seong Ryul Kim<sup>1</sup>, Eun Young Yun<sup>1</sup>, Seung Won Park<sup>3</sup>,  
Seok Woo Kang<sup>1</sup> and Tae Won Goo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine, Dongguk University of Gyeongju, Gyeongju 780-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Korea

(Received September 29, 2014, Accepted October 20, 2014)

#### ABSTRACT

We constructed the fibroin H-chain expression system to produce enhanced yellow fluorescent proteins (EYFP) in the silk of transgenic silkworm. Fluorescent silk could be made by fusing EYFP cDNA to the heavy chain gene and injecting it into a silkworm. The EYFP 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 EYFP/H-chain fusion gene was regulated by the fibroin H-chain promoter. The yellow fluorescence proving that the fusion protein was present in the silk. Accordingly, we suggest that the EYFP fluorescence silk will enable the production of novel biomaterial based on the transgenic silk.

**Key words :** Bombyx mori, Silk, Fibroin, EYFP, Fluorescence, Transgenic silkworm

#### 서 론

실크 단백질은 누에의 견사선에서 생성되는 것으로, 이 기관은 1,000개 내외의 세포로 이루어져 있으며, 뽕잎의 단백질, 아미노산, 당 등으로부터 합성된 액상견으로 채워져 있다. 그리고 누에 유충 한 마리당 실크 단백질을 최대 0.5 g까지 합성할 수 있는 능력을 가지고 있다. 기존에 보고된 보고서에 따르면, 후부견사선에서 생산된 재조합단백질은 의학용 직물 및 생체 적합 물질을 만들기 위한 섬유 재조합 실크의 생산에 적합하고, 중부견사선에서 생산된 재조합단백질은 약제목적 단백질의 생산에 적합하다고 보고되어 있다(Tatemastu et al. 2012). 이러한 견사선은 크게 피브로인(fibroin)의 합성 장소인 후부견사선

(posterior silk gland, PSG)와 세리신(sericin)의 합성 장소인 중부견사선(middle silk gland, MSG) 그리고 실크를 토사시키는 전부견사선(arterial silk gland, ASG)로 구성되어 있고, 실크의 합성은 후부견사선에서 피브로인이 생성된 후 중부견사선에서 피브로인을 세리신으로 코팅하고, 전부견사선을 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%이고, 그 중에서 피브로인은 heavy chain(H-chain), light-chain(L-chain) 및 fibrohexamerin 3개의 subunit 복합체가 6:6:1의 분자비율로 구성되어 있다(Inoue et al. 2000). 피브로인 단백질의 기본 구성은 H-chain 과 L-chain이 1:1 비율로서 이황화결합을 이루고 있으며, 결합된 H-L chain

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

**Table 1.** List of recombinant protein production in the cocoon of transgenic silkworm

Gene expressed	Promoter	Source
Partial collagen sequence and EGFP fused to fibroin L-chain	Fibroin L-chain promoter	Tomita et al. (2003)
Partial prolyl-hydroxylatedcollagen sequence fused to fibroin L-chain	Fibroin L-chain promoter	Adachi et al. (2006)
bFGF fused to fibroin L-chain	Fibroin L-chain promoter	Hino et al. (2006)
Human serum albumin	Sericin 1 promoter enhanced by hr3 and IE1	Ogawa et al. (2007)
Feline interferon fused to fibroin H-chain	Fibroin H-chain promoter	Kurihara et al. (2007)
Mouse monoclonal antibody	Sericin 1 promoter enhanced by hr3 and IE1	Iizuka et al. (2009)
Spider silk fibroin fused to fibroinH-chain	Fibroin H-chain promoter	Zhu et al. (2010)
Soluble GM-CSF receptors	Sericin 1 promoter enhanced by hr3 and IE1	Urano et al. (2010)

\*Tomita et al. 2011.

여섯 분자는 한 분자의 P25에 의해 비공유성 결합으로 연결되어 있다(Inoue et al. 2000, Tanaka et al. 1999). 또한 피브로인 H-chain의 전체적인 유전정보는 Zhou et al.(2003)에 의해 밝혀졌는데, 피브로인 H-chain의 구조는 두 개의 엑손(67 bp 와 15,750 bp)과 하나의 인트론(971 bp)으로 구성되어 있으며 반복되는 Gly-Ala(일부는 Ser, Tyr으로 치환되어 있음) 반복구조로서 전체 H-chain의 2/3에 이르는 영역을 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).

2000년 일본의 Tamura 연구팀은 piggyBack 전이인자 유래 전이벡터를 이용하여 안정적인 형질전환 누에 제작에 성공하였다(Tamura et al. 2000). 이후 piggyBac 전이 벡터를 사용한 많은 누에 형질전환 실험이 진행되었고, 이 발현 시스템을 적용하여 basic fibroblast growth factor (bFGF), human serum albumin(HSA), feline interferon (FeIFN), insulin like growth factor-I(hiGF-I) 등이 성공적으로 발현된다고 보고되어 있다(Hino et al. 2006, Kurihara et al. 2007, Ogawa et al. 2007, Tomita et al. 2003, Zhao et al. 2009). 또한, 누에고치에서 누에형질전환 시스템을 이용하여 다양한 종류의 재조합 단백질들이 효율적으로 생산될 수 있음을 보여주고 있는데, 누에 견사선의 피브로인 Heavy chain과 Light chain 그리고 세리신에서 주로 재조합 단백질 생산이 이루어지고 있다(표 1).

누에의 실크는 다른 섬유에서 찾아볼 수 없는 우아하고 고상한 광택과 촉감을 갖고 있으므로 다른 섬유보다 고부가가치 소재로서 널리 알려져 있다. 그러나 값이 비싸

고 내구성이 좋지 못하여 관리가 어렵고, 구김이 잘 생기는 등 실용적 특성이 부족하여 실크를 대중화, 일반화하지 못하고 있다. 따라서 실크를 다양한 분야에 적용하기 위해서 많은 연구가 진행되었고, 2009년 일본의 Tamura 등이 형광실크를 이용하여 결혼식 드레스와 일본 전통의상을 제작하여 보고하였다(Tamura et al. 2009). 따라서 본 실험에서는 실크 섬유를 다양한 산업분야에 적용하기 위한 소재로 개발하기 위해 피브로인 재조합 단백질 발현 시스템을 이용하여 황색형광실크를 제작하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험곤충 및 전이벡터

형질전환에 사용된 누에(*Bombyx mori*)는 백옥잠(123 × 124)을 사용하였고, 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육 기준(온도: 24°C ~ 27°C, 상대습도: 70% ~ 90%)에 준하여 사육하였다. 누에 형질전환에 사용된 전이벡터는 체코의 Jindra 박사로부터 pBac-3xP3-EGFP 벡터와 helper 벡터인 pHA3PIG를 분양 받아서 사용하였다.

### 2. 누에형질전환용 전이벡터 제작

전이벡터 pBac-3xP3-EGFP-FibH는 다음의 과정에 따라 제작되었다. 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'-GGCGCGCCGTGCGTGATCAGGAAAAT-3'(27 mer)와

pFibHN-R: 5'-TGCACCGACTGCAGCACTA GTGCTG AA-3'(27mer)을 사용하여 PCR로 증폭하였고, 완성된 플라스미드는 pGEMT-pFibH-NTR로 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'-AGCGTCAGTTACGGAGCTGGCAGGGGA-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-CTR로 명명하였다. 그리고 pGEMT-pFibH-NTR는 *ApaI*과 *SalI*으로, pGEMT-CTR는 *SalI*과 *SacI*으로 각각 제한효소 처리함으로써 단편들을 준비하였다. 이들 단편들은 *ApaI*과 *SacI*으로 제한효소 처리된 pBluescriptII SK(-) vector(Stratagene, CA)에 함께 클로닝하였고, pFibHNC-null로 명명하였다. 종결코돈이 없는 EYFP 유전자 단편은 바이오니아(Korea)에서 유전자를 합성 후, pGEM-T Easy Vector에 클로닝하였다. 이 플라스미드는 *NorI*과 *SbfI*으로 제한효소 처리하였고, 분리된 단편은 *NorI*과 *SbfI*으로 제한효소 처리된 pFibHNC-null벡터에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 pFibHNC-EYFP로 명명하였다. 마지막으로 pFibHNC-EYFP를 *AscI*과 *FseI*으로 제한효소 처리하여 분리된 단편을 *AscI*과 *FseI*으로 제한효소 처리된 pBac-3xP3-EGFP에 클로닝하였고, 완성된 플라스미드는 pBac-3xP3-EGFP-pFibH-EYFP로 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 누에알의 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 cyanocrylate 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 GFP 형광필터를 사용하여 세대별, 시기별로 관찰하여 선발하였다. 또한 황색형광실크의 선별은 Leica(USA)사의 LEICA Z6 APO 현미경과 Leica(USA)사의 Filtersystem 470 LED를 사용하였다.

### 5. 황색형광고치의 실크 제작

F2 세대의 형질전환 고치를 80 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 탈수시킨 후, 다시 위의 처리수에 진공침투시킨 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 침지시킨 후 ddH<sub>2</sub>O에 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.

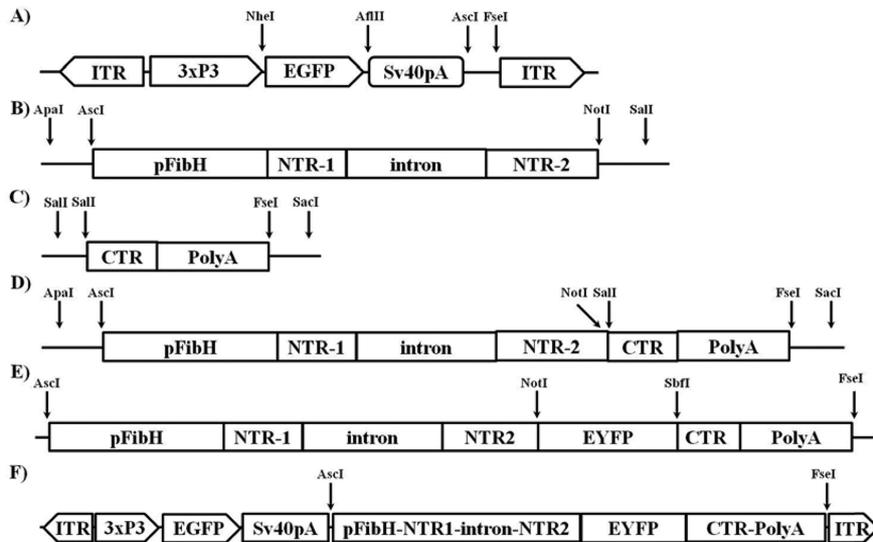
### 7. Western blot 분석

확인하고자 하는 단백질을 12% SDS-PAGE 전기영동 후 semiphore transfer unit(Hoefer, TE-70)를 이용하여 PVDF membrane(Amersham Co., USA)에 transfer하였다. 비특이적인 반응을 막기 위해 5% skim milk로 2시간 동안 blocking 한 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 membrane에 남아 있는 물기를 제거하였다. ECL Plus Western Blotting Detection Reagents 를 사용하여 PVDF membrane을 상온에서 5분간 반응시킨 후, X-ray film에 노출시킨 후 현상하여 확인하였다.

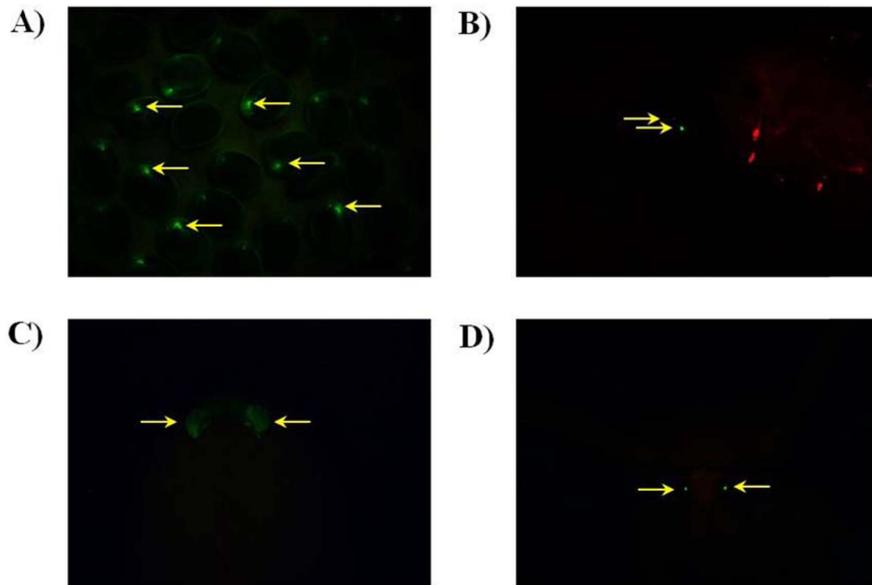
## 결 과

### 1. 형질전환용 전이벡터 제작

황색형광실크를 생산하는 형질전환 누에를 제작하기 위해 piggyBac 벡터를 이용하여 전이벡터를 구축하였다. 형질전환체를 선발하기 위한 마커 유전자로는 EGFP 유전



**Fig. 1.** The structures of transformation vectors for generating transgenic silkworms. The vector was constructed for germline transgenesis. A) pBac-3xP3-EGFP. B) pGEMT-pFibH-NTR. C) pGEMT-CTR. D) pFibHNC-null. E) pFibHNC-EYFP. F) The transformation vectors pBac-3xP3-EGFP-pFibH-EYFP. Transformation vector was piggyBac-derived vector. The restriction enzyme sites for the construction of recombinant vectors were indicated. The nucleotide sequences of pFibH-NTR and CTR were derived from Genebank Accession No. AF226688. pFibH, promoter domain (1124 bp); NTR1, N-terminal region 1 (142 bp); intron, first intron (871 bp); NTR2, N-terminal region 2 (417 bp); CTR, C-terminal region (179 bp); PolyA, poly (A) signal region (301 bp); EYFP, enhanced yellow fluorescence protein gene; ITR, inverted repeat sequences of piggyBac arms; 3xP3, 3xP3 promoter; SV40, SV40 polyadenylation signal sequence.



**Fig. 2.** Fluorescence expression of EGFP 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 1 th instar larva. C) and D) fluorescent images of pupa and moth. Arrows point to eyes in panel B, C and D.

자를 사용하였고, 이 유전자의 조절 프로모터로는 3xP3 promoter를 사용하였다(그림 1A). 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 계층으로부터 PCR을 이용하여 증폭하였다(그림 1B). 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

**Table 2.** Results of injection of the construct DNA to Baegokjam embryos

Injected embryos	Hatched embryos	G0 broods	G1 bloods with red positive
3,060	262	120	8

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

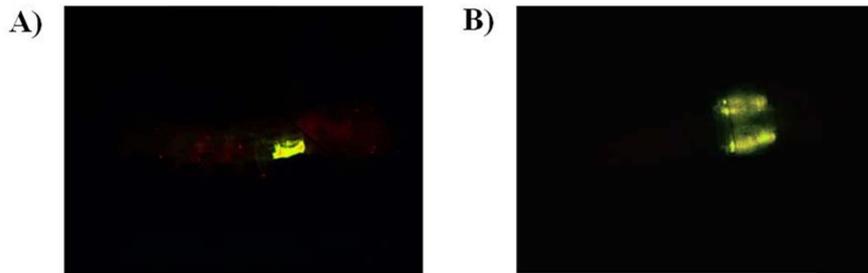
of AF226688) 3' 영역을 PCR을 이용하여 증폭하였다(그림 1C). 이렇게 제작된 유전자 단편들은 pBluescriptII SK(-) vector에 각각 클로닝하였고(그림 1D), 종결코돈이 없는 EYFP 유전자는 피브로인 H 유전자의 N-말단과 C-말단 사이에 클로닝하였다(그림 1E). 위에서 제작된 벡터는 *AseI* 과 *FseI*으로 제한효소처리 후, 누에 전이벡터인 pBac-3xP3-EGFP에 클로닝하였다. 이렇게 제작된 누에전이벡터는 pBac-3xP3-EGFP-pFibH-EYFP로 명명하였다(그림 1F).

### 2. 누에형질전환체 선발

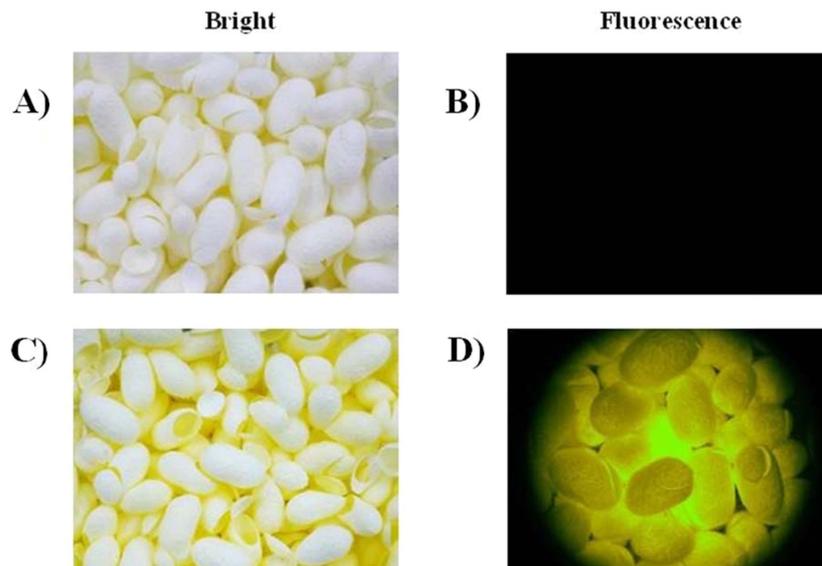
누에형질전환체 제작을 위한 누에 초기배로의 microinjection은 배아의 주공과 후부 사이의 가운데 배면 부분에 microinjection 하였고, 총3,060개의 누에알에 microinjection 하였다. 그 결과 262 마리의 유충이 부화되었고, 그 중 240마리가 성충이 되었다. 성충이 된 나방들은 서로 교배시켜 F1세대를 얻은 후, 형질전환체의 선발을 위해 시기별로 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 누에 알은 산란 후 3일째에 눈과 신경조직에서 녹색형광이 관찰되었고, 유충과 번데기, 성충은 눈에서 녹색형광이 각각 관찰되었다(그림 2). 이런 과정을 통해 F1세대에서 8 아구(Bloods)의 누에형질전환체를 선발할 수 있었다(표 2).

### 3. 황색형광고치 선발

피브로인 H-chain의 긴 반복서열은 소수성 상호작용에 의해 결정구조를 형성하는데, 이러한 구조를 형성하기 위



**Fig. 3.** EYFP fluorescence in the silk gland of the transgenic silkworm. A silk glands at the 3 days of the 5th instar larvae of the F2 transgenic silkworm. The silk gland was observed under the YFP-excitation-wavelength light.



**Fig. 4.** Yellow fluorescent cocoons. The fluorescent cocoons produced by transgenic silkworms that have used EYFP fluorescent proteins. A, B) Normal cocoons. C, D) Yellow fluorescent cocoons. A), C) Coons were observed under the white light, respectively. B) Cocoons were observed under the fluorescent light. D) Cocoons were observed under the YFP-excitation-wavelength light.

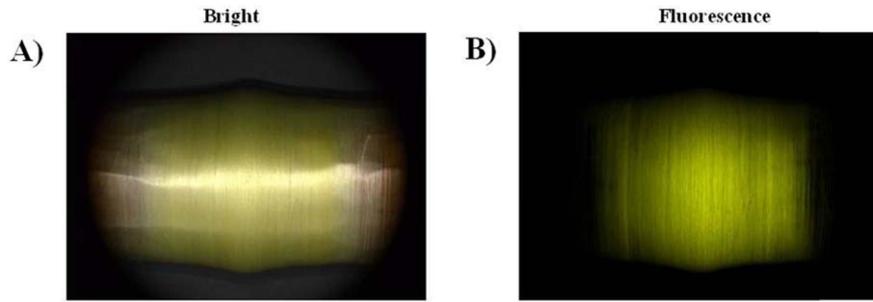


Fig. 5. The yellow fluorescent colored silks. Left: under white light. Right: illuminated by YFP-excitation-wavelength light.

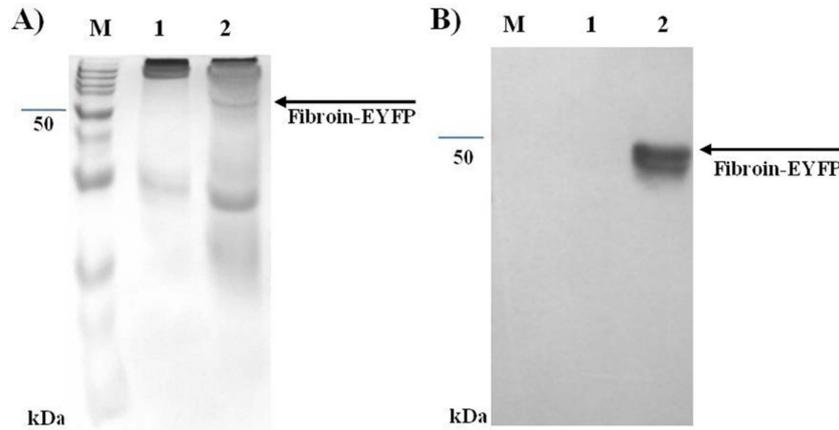


Fig. 6. Analysis of the recombinant protein expression by SDS-PAGE and Western blot. (A) The protein samples were subjected to 10% SDS-PAGE. (B) The protein samples were transferred PVDF membrane and incubated with the anti-YFP antibody. M, molecular mass standard; 1, normal cocoon; 2, transgenic cocoon with pG-3xP3-EGFP-pFibH-EYFP. The arrows indicate the fusion protein of EYFP protein and Fibroin protein.

해서는 2가지 요소가 꼭 필요하다. 첫 번째는 H-chain의 N 말단과 C 말단에 실크 속으로 피브로인 분자를 분비시키기 위한 시그널 서열이 있어야 하고, 두 번째는 H-chain C 말단의 20번째 시스테인 잔기와 L-chain N 말단의 172번째 시스테인 잔기가 이황화결합을 형성하고 있어야 한다 (Tanaka et al. 1999, Zhou et al. 2000). 따라서 본 실험에서는 이러한 시스템을 기반으로 피브로인 H-chain에서 재조합 단백질을 발현시키는 누에형질전환체를 제작하였다. 일반적으로 실크가 생성되는 과정은 누에의 후부 견사선에서 피브로인이 생성된 후 중부 견사선에서 세리신이 코팅되고 전부 견사선에서 토사공을 통해 밖으로 용출된다. 따라서 피브로인에서 황색형광단백질이 발현되는 것을 확인하기 위해 F2 세대의 5령 3일 누에의 배 부분을 형광 현미경을 이용하여 후부견사선을 확인하였다. 그 결과 피브로인과 융합된 황색형광단백질이 중부 견사선에서는 황색형광이 강하게 관찰 되었지만 후부견사선에서는 확인할 수 없었다(그림 3). 그리고 F2세대의 고치에서 황색형광을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 후부 견사선에서 생성된 황색형광단백질이 피브로인과 융합되어 누에고치에

도 같이 존재한다는 것을 의미하며, 따라서 피브로인에서 EYFP 재조합 단백질이 정상적으로 발현된다는 것을 확인할 수 있었다(그림 4).

#### 4. 재조합 단백질의 발현 분석

황색형광고치에서 EYFP 재조합 단백질 발현을 확인하기 위해 Western blot으로 분석하였다. 분석에는 F2세대의 황색형광고치를 사용하였고, 사용된 항체는 YFP monoclonal antibody(Taiwan, Abnova Coporation)를 사용하였다. 그 결과 피브로인 H-chain과 EYFP 융합단백질의 예상 위치인 약 40 kDa 보다는 높은 위치에서 밴드를 확인할 수 있었다(그림 6B).

## 고 찰

최근 piggyBack transposon 유래 전이벡터가 사용된 누에형질전환 기술의 지속적인 발전으로 유전자 기능분석, 새로운 품종의 개발, 누에 견사선의 기능분석 등의 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서 누에 실크의 품질개

선 및 재조합 단백질 생산을 위한 bioreactor로 사용하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 그 중에, 2003년 일본의 Tomita 등이 사람 collagen 단백질을 실크의 피브로인 L-chain에서 성공적으로 발현시킴으로써 실크를 이용한 연구가 폭넓게 진행되기 시작했다(Tomita et al. 2003). 본 실험에서는 피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현 시스템을 이용하여 황색형광실크를 생산하는 형질전환누에를 제작하였다. 초파리 형질전환에 널리 사용되는 piggyBac 전이벡터에 누에 피브로인 H-chain 유래의 promoter와 EYFP 유전자를 이용하여 실크 피브로인에서 황색형광단백질을 발현시켰고, 누에형질전환체 선발을 위해서는 초파리의 3xP3 promoter와 녹색형광유전자인 EGFP를 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). 3,060개의 누에알을 microinjection 하여 262 마리의 유충이 부화되었고, 그 중에서 240마리 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 황색형광단백질이 발현되는 것을 확인하기 위해 5령 3일 누에의 후부 견사선을 형광현미경으로 확인하였다. 그 결과, 그림 3의 A처럼 누에의 우측에서 보았을 때는 후부 견사선과 중부견사선이 황색형광으로 뚜렷하게 관찰되었지만, 누에 배쪽에서 관찰한 그림 3의 B에서는 중부견사선만이 황색형광으로 관찰되었다. 이러한 결과는 중부견사선이 후부견사보다 누에의 배쪽에서 쉽게 형광을 관찰 할 수 있기 때문이고, 그리고 누에를 해부하여 중부견사선과 후부견사선을 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과에서는 황색형광을 관찰할 수 있었다. 따라서 황색형광재조합 단백질이 누에 피브로인에서 정상적으로 만들어지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 누에고치와 저온 정련법으로 제작한 실크에서도 황색형광이 관찰되었다(그림 5). F2세대부터는 형질전환체의 누에고치색이 흰색에서 황녹색으로 점차 변하면서 F4세대에서는 진한 황색을 나타내었다. 형질전환된 누에고치에서 EYFP 재조합 단백질의 발현분석을 위해 Anti-YFP

antibody를 사용하여 Western blot분석을 하였다. 비록 피브로인 H-chain과 EYFP 융합단백질의 예상 위치인 약 40 kDa 보다는 높은 위치에서 밴드를 확인할 수 있었지만, 피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현 시스템에 의해 EYFP 재조합 단백질이 누에실크에서 정확하게 발현된다는 것은 확인할 수 있었다.

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

## 적 요

본 연구의 목적은 누에형질전환 기술과 피브로인 재조합 단백질 발현시스템을 이용하여 황색형광실크를 개발하는 것으로서, 본 실험에서는 피브로인 H-chain의 N-말단과 C-말단을 이용하여 피브로인 재조합 단백질 발현 시스템을 제작하였고, 종결코돈이 없는 EYFP 유전자를 위의 발현 시스템에 클로닝하여 황색형광실크를 제작하였다. 누에형질전환체 선발을 위해서는 3xP3 promoter와 EGFP 유전자를 이용하여 선발하였고, 3,060개의 누에알에 microinjection 하여 F1 세대에서 8 bloods의 누에형질전환체를 선발하였다. 선발된 누에형질전환체는 초기배 단계의 눈과 신경조직, 유충과 번데기 그리고 성충의 눈에서 EGFP 형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 실크의 피브로인에서 EYFP 단백질이 발현되는 것을 확인하기 위해, F2세대의 누에형질전환체 중에서 5령 3일 유충의 견사선을 형광현미경으로 관찰하였고, 중부 견사선에서 황색형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 F2 세대의 고치와 저온에서 정련한 실크에서도 황색형광단백질의 발현을 확인할 수 있었고, Western blot 분석에서도 EYFP 재조합 단백질이 피브로인 H-chain과 융합된 형태로 존재하는 것이 확인되었다. 이상의 결과에서 황색형광실크를 생산하는 누에형질전환체가 성공적으로 제작되었음을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ10061)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- 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. *Journal of Biotechnology* **128**, 531-544.
- Tamura T, Iizuka T, Sezutsu H, Tatematsu K, Kobayashi I, Yonemura N, Uchino K, Kojima K, Machii H, Takabayashi C, Yamada K, Kurihara H, Asakura T, Nakazawa Y, Miyawaki A, Karasawa T, Kobayashi H, Yamaguchi J, Kuwabara N, Nakamura T, Yoshii K (2009) Production of high quality silks having different fluorescent colors using transgenic silkworms. *AFF Research Journal* **32**(3), 7-10.
- 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.
- Tatemastu K, Sezutsu H, Tamura T (2012) Utilization of transgenic silkworms for recombinant protein production. *Journal of Biotechnology & Biomaterials* **S9**, 1-8.
- 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.