

Cloning of the *Bombyx mori* short neuropeptide F receptor (BsNPF-R) cDNA

Hyojung Shin^{1†}, Kisang Kwon^{2†}, Sun Mee Hong³, Hong Geun Kim⁴, Kwan-Ho Park⁵, Ji-Young Choi⁵, Seung-Whan Kim⁶, Kweon Yu⁷ and O-Yu Kwon^{1*}

¹Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health & Welfare, Kyungwoon University, Gumi 39160, Korea

³Department of Research & Development, Gyeongbuk Institute for Marine Bioindustry, Ulljin 36315, Korea

⁴Department of Life Sciences, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

⁵Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun 55365, Korea

⁶Department of Emergency Medicine, Chungnam National University Hospital, Daejeon 35015, Korea

⁷Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 34141, Korea

Received February 12, 2016 / Revised February 22, 2016 / Accepted February 24, 2016

It has already been reported that short neuropeptide F (sNPF) stimulates feeding behaviors in a wide variety of insect species. In the present study, we cloned cDNA, encoding a sNPF receptor homologue from a silkworm, *Bombyx mori*, named BsNPF-R. The amino acid sequence of BsNPF-R was compared with those of sNPF-R thus far reported, which is shared with humans (36%), mice (34%), zebrafish (35%), and fruit flies (51%), respectively. A BsNPF-R protein's mass was theoretically estimated to be 42,731 Da and it is a putative plasma membrane-penetrating protein. The mRNA expression of BsNPF-R was tested; the results showed that a strong expression was detected at the midgut, post-silk gland, Malpighian, and testis; however, a weak expression was at the fat body, hemocyte, and ovary. In addition, the synthesized sNPF of a silkworm regulated the BsNPF-R mRNA expression through the cell-based functional analysis.

Key words : *Bombyx mori*, *B. mori* short neuropeptide F receptor (BsNPF-R), cDNA

서 론

국내 곤충산업은 2010년 '곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률'을 발표 및 '제1차 곤충산업 육성 5개년 계획(2011-2015)' 수립을 통해서 곤충자원 조사 및 유용곤충 발굴, 곤충자원의 R&D 강화, 곤충농가 육성지원, 전문인력 양성 및 교육 강화를 내용으로 정책적 곤충산업 저변 확대를 모색하고 있다. 곤충 사육농가가 정부의 지원을 통해 지속적으로 늘어나고 있지만 체계적 곤충자원 R&D를 통한 농가 생산성 증대가 요구되고 있다. 곤충자원의 활용은 농식품, 의약품, 화장품, 기능성 바이오소재 및 산업신소재 등과 생체모방 공학 등의 융복합 영역으로 대폭 확대될 전망이다. 또한, 친환경 농산물에 대한 관심 증가에 따라, 고품질 유기농 농산물 생산을 지향하는 농가가 증가할 것으로 예상되며 친환경 유해곤충 방제 원천기술 개발과 천적곤충 수요가 증가하고 있다. 국내의 곤충 산업 규모는

지속적으로 증가하고 있으나, 영세성을 벗어나지 못한 소규모 1차 산업이 대부분이며 고부가가치의 2차 산업으로 전환 필요하며, 곤충산업을 미래농업의 신성장동력으로 활용하기 위해 유용 곤충자원의 생산성 증대 및 효율적 양산을 위한 기초 R&D 연구가 요구되고 있다. 또한, 유해곤충은 농가 생산력 저하 및 인체 전염병 창궐 등의 사회 경제적 문제를 야기하고 있어 다양한 방제 및 관리가 요구되고 있지만, 친환경 방제 시스템 및 생태계 친화적 접근 방법에 대한 연구가 미비하다. 농업과 환경, 식품안정성, 소비자 건강을 동시에 고려하는 신개념 곤충자원 활용 산업을 창출할 수 있을 것이다.

Insulin은 동물의 성장-대사-노화에 중추적인 역할을 한다. 초파리(*Drosophila melanogaster*)에서는 insulin과 동일한 역할을 하는 insulin-like peptides (Dilp)가 뇌의 특수한 신경세포에서 생산되는 것 알려져 있다[8]. Dilp의 발현을 조절하는 인자가 short neuropeptide F (sNPF)와 sNPF receptor (sNPF-R)이다[14]. sNPF는 포유동물의 mammalian neuropeptide Y (NPY)에 해당한다. 지금까지 보고된 sNPF와 sNPF-R의 생물학적 기능은 다음과 같다. sNPF는 Arthropoda phylum에 진화적으로 널리 퍼져있다, 그러나 아직까지 non-arthropod 종에서의 존재는 알려지지 않고 있다. sNPF-R의 cloning은 *Drosophila*에서 처음으로 성공하였다[12]. *Drosophila* sNPF와 sNPF-R의 발현조절에 의해서 개체의 크기가 조절하였다. 즉, sNPF는 ERK-mediated insulin 발현을 조절하여 성장과 수명

†Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-42-580-8206, Fax : +82-42-586-4800

E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 조절한다[9-11]. sNPF mutant는 FOXO-sNPF 기전의 발현을 통하여 습식행동을 조절한다[6]. sNPF가 과발현된 초파리는 습식행동의 변화 없이 수면을 촉진함으로써 sNPF가 sleep-promoting 인자임이 보고되었다[16]. Starvation은 누에(*Bombyx mori*) brain과 CNS의 sNPF의 발현을 조절함으로써 적극적으로 습식행동을 조절하였다[13]. 이집트 메뚜기(*Schistocerca gregaria*)에서는 다른 곤충에서와는 반대로 sNPF의 과발현이 습식을 저해하는 결과를 얻었으며, 영양의존적으로 sNPF 전사를 조절하는 것이 보고되었다[4]. sNPF가 stage-specific하게 juvenile hormone의 생합성을 억제하여 곤충 metamorphosis에 중요한 인자인 것이 알려졌다[7]. 불개미(*Solenopsis invicta*)의 sNPF는 아미노산 잔기의 변화를 통해서 기능연구가 수행되었다[1]. 굴(*Crassostrea gigas*) sNPF-R의 기능으로 대사과정 중에 에너지저장에 중요한 역할 하는 것이 보고되었다[3]. 농어(*Dicentrarchus labrax*)에서 진화적으로 잘 보존된 3종류의 sNPF가 뇌에서 발현, 말라리아 모기(*Anopheles gambiae*) sNPF-R는 forskolin-stimulated cAMP생산을 저해하였다[5, 15]. 이처럼 각각 다른 동물에서 다양한 기능을 하기에 sNPF-R의 세포내 혹은 개체 내에서 어떤 생리적 기능을 담당한다고 결론을 내릴 수는 없다. 본 연구에서는 누에의 sNPF-R cDNA

를 cloning하여 개체내 발현, 발생단계별 발현양상, sNPF에 의한 발현변화를 관찰하였다. 이 결과는 sNPF-R기능연구에 중요한 밑거름이 될 것이다.

재료 및 방법

RNA 분리

Total RNA분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 3 MM paper를 이용하여 수분을 제거한 누에(*B. mori*, Jam123 × Jam124)의 조직 혹은 배양세포를 1.5 ml tube에 넣고 500 µl의 RNA isolation buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 100 µl의 chloroform을 넣어 충분히 섞어주었다. 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심 분리하여 약 250 µl의 상등액을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 실온에서 10분 정도 침전반응 유도한 후 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하고, 75% ethanol을 500 µl로 세척하여 total RNA을 얻어 RNase-free water로 녹인 후 nonodrop (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 정량하였다.



Fig. 1. Alignment of BsNPF-R sequences. The amino acid sequence of the *B. mori* sNPF receptor is compared to those of other species. From top to bottom, aligned sNPF receptor sequences are: and silkworm (*Bombyx mori* NP_001127729.1), human (*Homo sapiens* NP_000901.1), mouse (*Mus musculus* NP_032757.2), zebrafish (*Danio reio* XP_001332759.1) and fruit fly (*Drosophila melanogaster* NP_001262086.1). At the bottom of the amino acid sequences, identical amino acid residues are shaded black (*), partial similar sequences are shaded gray (:), and light gray (·). Dashed- lines indicate no identical amino acid sequences.

BsNPF-R 동정 및 분석

BsNPF-R cDNA 동정은 기본적으로 BLAST program을 바탕으로 Conserved Domain Databases (NCBI, National Center for Biotechnology Information)와 Motif Databases (GenomeNet, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan)를 이용하였다. BsNPF-R의 PCR산물은 TOPO TA Cloning® plasmid (Invitrogen)에 sub-cloning하여 염기서열을 최종 확인하였다(GenBank accession # NGR-A11: KT224452). BsNPF-R의 분석은 ExPASy (<http://www.expasy.org>)와 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 이용하였다.

RT-PCR

BsNPF-R 유전자에 해당하는 primer를 이용하여 reverse transcription-PCR을 수행하였다. 본 실험에 사용된 primer는 다음과 같다. BsNPF-R-FOR (5'-ACGCCTGGTTGAATGAA AAC-3'), BsNPF-R-REV (5'-CGCTGAAATGTGACTCCTCA-3'). Total RNA 3 µg과 oligo-dT를 섞어 80°C에서 3분 동안

열 변성 시킨 후, 10 x buffer, dNTP, MML-V, RNase inhibitor 등이 포함된 용액과 혼합하여 42°C에서 90분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 증폭시키기 위해서 해당 primer를 이용하여 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초로 28회 반응하여 전기영동으로 확인하였다.

결과 및 고찰

포유동물의 경우는 4가지 subtype의 neuropeptide Y (NPY) receptor (Y1, Y2, Y4 & Y5)가 각각 다른 장기에서 독립적으로 발현되는 것이 알려져 있다[2]. 본 실험에서 cloning된 누에의 sNPF receptor (BsNPF-R) cDNA는 381개의 아미노산으로 구성되어있으며 분자량은 42,731 Da으로 계산된 plasma membrane관통형의 단백질이다(GenBank KT224452). Fig. 1에서 보는 것과 같이 BsNPF-R는 아미노산수준에서 human과 36%, mouse와 34%, zebrafish와 35%, fruit fly와 51%의 상동성을 각각 보인다. BsNPF-R가 다른 종의 sNPF-R보다는 곤충인 초

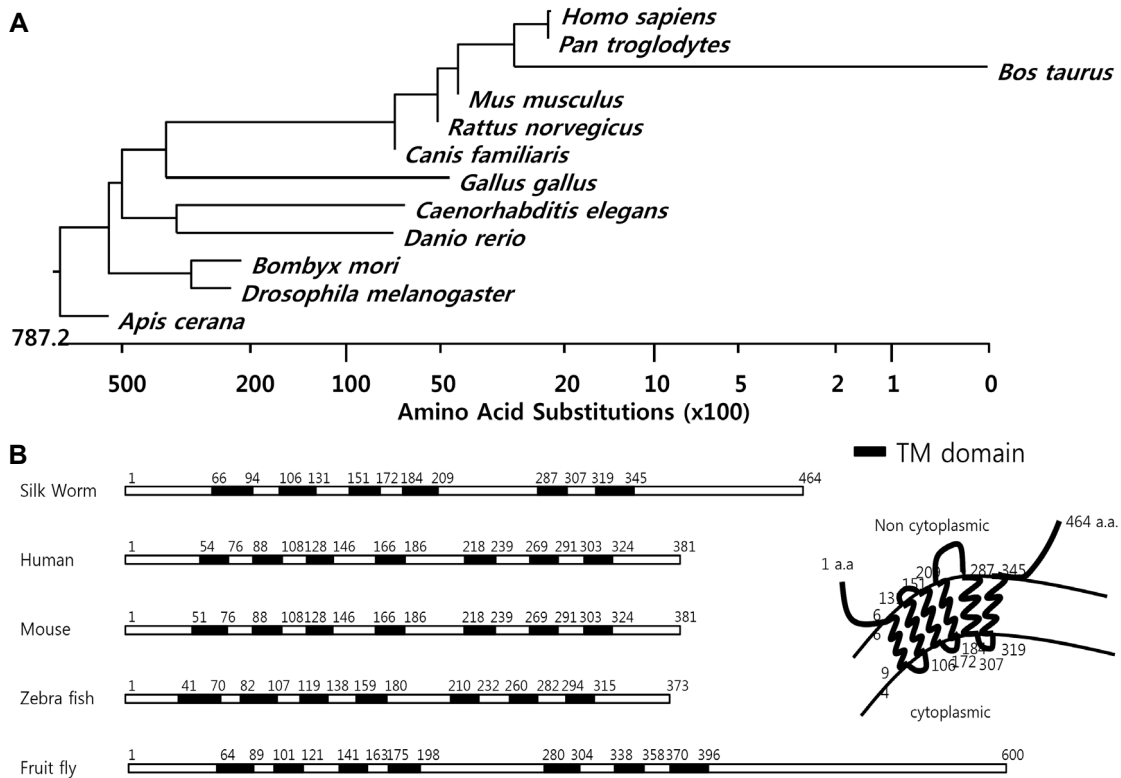


Fig. 2. Phylogenetic tree of BsNPF-R and its schematic structure on the cytoplasm from the different species. (A) Amino acid sequences were analyzed by NCBI program; the phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. The length of the section indicates the relative distances between the sequences. (B) Black boxes are transmembrane (TM)-domains on the cytoplasmic membrane estimated by both programs of TMHMM Server v. 2.0. and ExPASy program (<http://www.expasy.org>). The GenBank accession numbers are as follows, *Homo sapiens* (NP_000901.1), *Pan troglodytes* (NP_001012655.1), *Bos taurus* (NP_776826.1), *Mus musculus* (NP_032757.2), *Rattus norvegicus* (NP_076458.1), *Canis familiaris* (XP_005629430.1), *Gallus gallus* (NP_001026299.1), *Caenorhabditis elegans* (NP_509725.21), *Danio rerio* (XP_001332759.1), *Bombyx mori* (NP_001127708.1), *Drosophila melanogaster*, (NP_001262086.1), *Apis cerana* (XP_320180.1).

파리의 sNPF-R와 가장 높은 상동성을 보이며, BsNPF-R 단백질의 양 말단보다는 막 관통영역에서 더욱 높은 상동성을 보인다. 이는 sNPF-R의 막 관통영역이 생명체의 공통된 기능을 수행하기 위하여 잘 보존되어있는 것으로 추정할 수 있다.

지금까지 보고되어있는 대표적인 sNPF-R와 BsNPF-R의 진화관계를 알아보았다. 초파리와는 동일한 시점에서 나뉘어졌지만, 꿀벌과는 더욱 이른 시간에 척추동물과는 거의 동일한 시점에서 진화적으로 나뉘어졌다(Fig. 2A). 그리고 대표적인 sNPF-R와 BsNPF-R의 plasma membrane영역을 모식적으로 비교한 결과 누에는 총 6번 막을 관통하는 것에 비하여 human, mouse, zebrafish, fruit fly는 7번 막을 관통하였다(Fig. 2B). 이 같은 차이는, 사막에 서식하는 이집트 메뚜기(*Schistocerca gregaria*)의 sNPF 기능이 다른 곤충과는 반대로 습식저해기전에 깊이 관여하는 것과 같이, 곤충이 생활하는 주위환경 및 습식의 종류에 따라서 아주 다양성 기능을 가지게 되는

것을 생각된다. 누에는 오직 뽕잎이라는 제한된 습식에 의한 기초대사기전의 특이성이 있는 것으로 추정된다. 이처럼 다양한 곤충들의 특이적인 sNPF와 sNPF-R 기능은 성공적인 각각의 곤충습식을 가능하게 하는 중요한 조절인자로 추정된다.

BsNPF-R 유전자가 5령 누에의 각종장기(지방체, 혈림프, 중장, 후견사선, 말피기관, 난소, 정소)에서 발현하는 정도를 조사하였다. Fig. 3A에서 보는 것과 같이 지방체, 혈림프, 난소에서는 발현이 아주 미미한 것에 비하여 중장, 후견사선, 말피기관, 정소에서 상대적으로 강한 발현양상을 보였다. 특히, 중장에서는 지방체를 기준 약 35배 이상, 말피기관과 정소에서 약 25배의 높은 발현양상을 보였다. 이와 같이 중장에서 가장 강한 발현을 보이는 것은 BsNPF-R가 누에의 식습행동에 아주 중요한 역할을 담당하는 것으로 설명할 수 있다. 발생단계별 BsNPF-R 유전자발현은 알에서 애벌레에서는 큰 변동이 없다가 성체가 되는 바로 전단계인 번데기에서부터 발현량이 현저

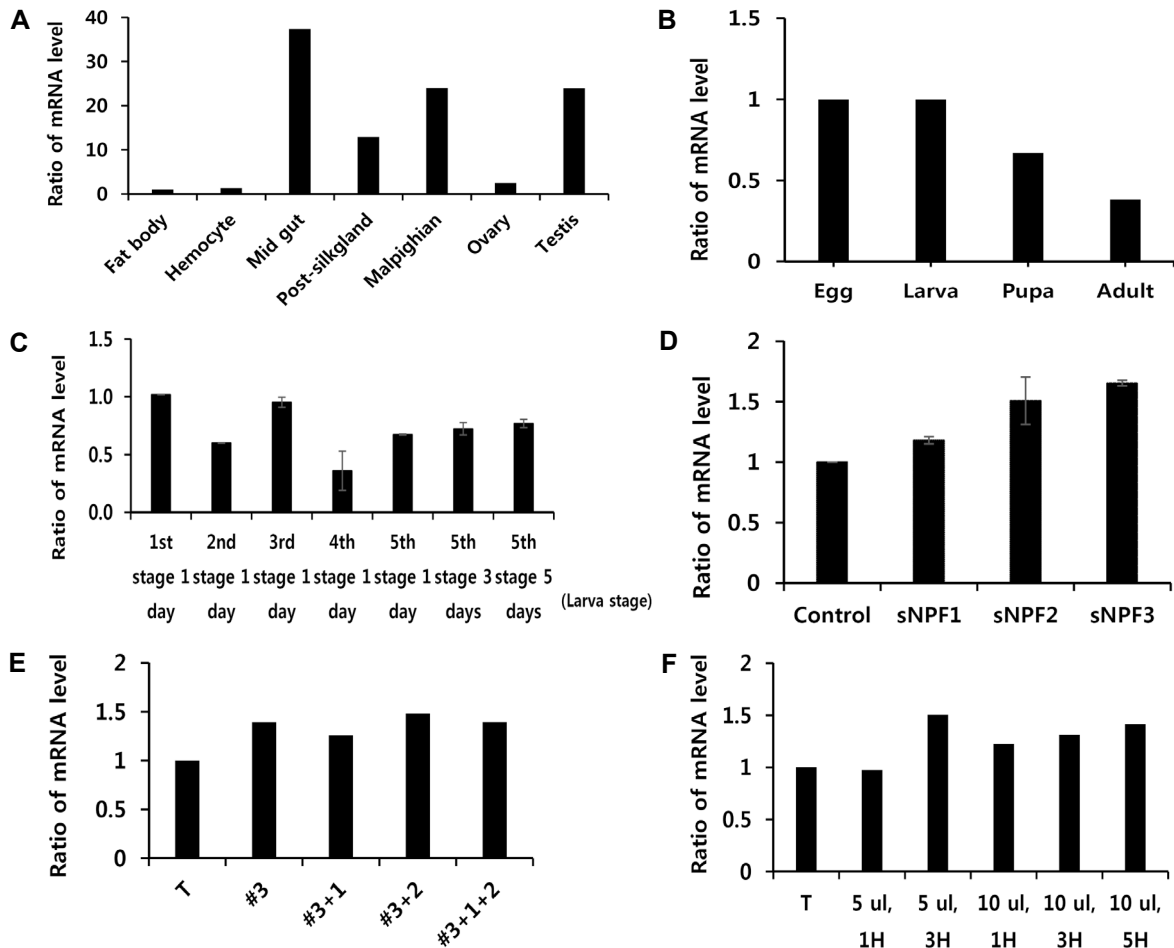


Fig. 3. The expression level of BsNPF-R mRNA. Expression BsNPF-R mRNA was analyzed from the various tissues of silkworm by RT-PCR. (B, C) Samples were obtained at different developmental stages from egg to adult and from 1st to 5th instars. (D) Bm5 cell was treated with different BsNPF peptides (#1: SPSRRLRFG, #2: TPVRLRFG, #3: APSMRLRFG), (E) with different combination of sNPF peptides, (F) with different combination of doses and times of sNPF3. All bar graphs in the Fig. 3 represent the average of three RT-PCR values. BsNPF peptides were synthesized in Anygene Co., Gwangju, Korea.

하게 감소하는 양상을 보인 결과 성체에서 가장 약한 발현양상을 보인다(Fig. 3B). 이 결과는 누에의 뿔잎 식습에는 negative BsNPF-R 유전자발현이 중요하게 작용하는 것으로 추정할 수 있다. 애벌레시기의 BsNPF-R 유전자발현을 조사한 결과 전체적으로 높은 발현을 보이지만 애벌레초기(1령 1일)때에 가장 강한 발현을 보이고 4령 1일차에 가장 약한 발현을 보였다. 그러나 애벌레 마지막 시기인 5령 5일째까지 1령 1일의 약 80%정도의 비교적 높은 발현을 유지하였다(Fig. 3C). BsNPF-R 유전자가 누에 sNPF 3종류에 의해서 어떻게 발현변화를 나타내는지를 실험하였다(100 nM/ μ l, 30분). 발현의 강도는 sNPF1 < sNPF2 < sNPF3 순으로 나타났다. 결국 sNPF3 처리에 의해서 BsNPF-R 유전자발현이 대조군에 비교하여 약 1.7배, sNPF2에 의해서 약 1.5배, sNPF1에 의해서 약 1.2배정도 상승하였다(Fig. 3D). sNPF3에 각각의 sNPF1, sNPF2를 함께 처리할 때에 BsNPF-R 유전자발현변화를 시험한 결과 sNPF3 단독으로 처리한 것 보다 상승 발현을 유도하지는 않았다(Fig. 3E). sNPF3 단독처리의 조건변화(dose/time)에 의한 BsNPF-R 유전자발현을 시험하였다. 5 μ l를 처리하였을 때에 처리시간이 1시간에서 3시간으로 길어지면 발현이 높아지는 양상이 10 μ l를 처리할 때도 동일하게 나타났다. 결국 sNPF3 처리에 의한 최고의 BsNPF-R 유전자발현 조건은 0.5 μ M을 3시간 동안 처리하였을 때이다(Fig. 3F). 이처럼 합성 sNPF에 의해서 BsNPF-R 유전자발현이 조절되는 것으로 보아 본 연구에서 cloning된 BsNPF-R 유전자는 pseudogene이 아닌 것이 증명되었다. 앞으로 연구는 합성 sNPF를 사용한 정밀한 receptor - ligand kinetics 실험이 배양세포에서 이루어질 것이다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(2013 R1A1A2064049)을 받아 수행된 기초연구사업임.

References

- Bajracharya, P., Lu, H. L. and Pietrantonio, P. V. 2014. The red imported fire ant (*Solenopsis invicta* Buren) kept Y not F: predicted sNPY endogenous ligands deorphanize the short NPF (sNPF) receptor. *PLoS One* **9**, e109590.
- Beck-Sickinger, A. G. and Jung, G. 1995. Structure-activity relationships of neuropeptide Y analogues with respect to Y1 and Y2 receptors. *Biopolymers* **37**, 123-142.
- Bigot, L., Beets, I., Dubos, M. P., Boudry, P., Schoofs, L. and Favrel, P. 2014. Functional characterization of a short neuropeptide F-related receptor in a lophotrochozoan, the mollusk *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Biol.* **217**, 2974-2982.
- Dillen, S., Verdonck, R., Zels, S., Van Wielendaele, P. and Vanden Broeck, J. 2014. Identification of the short neuropeptide F precursor in the desert locust: evidence for an inhibitory role of sNPF in the control of feeding. *Peptides* **53**, 134-139.
- Garczynski, S. F., Crim, J. W. and Brown, M. R. 2007. Characterization and expression of the short neuropeptide F receptor in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Peptides* **28**, 109-118.
- Hong, S. H., Lee, K. S., Kwak, S. J., Kim, A. K., Bai, H., Jung, M. S., Kwon, O. Y., Song, W. J., Tatar, M. and Yu, K. 2012. Minibrain/Dyrk1a regulates food intake through the Sir2-FOXO-sNPF/NPY pathway in *Drosophila* and mammals. *PLoS Genet.* **8**, e1002857.
- Kaneko, Y. and Hiruma, K. 2014. Short neuropeptide F (sNPF) is a stage-specific suppressor for juvenile hormone biosynthesis by corpora allata, and a critical factor for the initiation of insect metamorphosis. *Dev. Biol.* **393**, 312-319.
- Kannan, K. and Fridell, Y. W. 2013. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Front. Physiol.* **288**, 1-8.
- Lee, K. S., You, K. H., Choo, J. K., Han, Y. M. and Yu, K. 2004. *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *J. Biol. Chem.* **279**, 50781-50789.
- Lee, K. S., Kwon, O. Y., Lee, J. H., Kwon, K., Min, K. J., Jung, S. A., Kim, A. K., You, K. H., Tatar, M. and Yu, K. 2008. *Drosophila* short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. *Nat. Cell Biol.* **10**, 468-475.
- Lee, K. S., Hong, S. H., Kim, A. K., Ju, S. K., Kwon, O. Y. and Yu, K. 2009. Processed short neuropeptide F peptides regulate growth through the ERK-insulin pathway in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* **583**, 2573-2577.
- Mertens, I., Meeusen, T., Huybrechts, R., De Loof, A. and Schoofs, L. 2002. Characterization of the short neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1140-1148.
- Nagata, S., Matsumoto, S., Nakane, T., Ohara, A., Morooka, N., Konuma, T., Nagai, C. and Nagasawa, H. 2012. Effects of starvation on brain short neuropeptide F-1, -2, and -3 levels and short neuropeptide F receptor expression levels of the silkworm, *Bombyx mori*. *Front. Endocrinol.* **3**, 1-8.
- Nassel, D. R., Kubrak, O. I., Liu, Y., Luo, J. and Lushchak, O. V. 2013. Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Front. Physiol.* **252**, 1-12.
- Setzu, M., Biolchini, M., Lilliu, A., Manca, M., Muroli, P., Poddighe, S., Bass, C., Angioy, A. M. and Nichols, R. 2012. Neuropeptide F peptides act through unique signaling pathways to affect cardiac activity. *Peptides* **33**, 230-239.
- Shang, Y., Donelson, N. C., Vecsey, C. G., Guo, F., Rosbash, M. and Griffith, L. C. 2013. Short neuropeptide F is a sleep-promoting inhibitory modulator. *Neuron* **80**, 171-183.

초록 : 누에 short neuropeptide F receptor (BsNPF-R)의 cDNA cloning

신효정^{1†} · 권기상^{2†} · 홍선미³ · 김홍근⁴ · 박관호⁵ · 최지영⁵ · 김승현⁶ · 유권⁷ · 권오유^{1*}

(¹충남대학교 의학전문대학원, ²경운대학교 임상병리학과, ³경북해양바이오산업연구원, ⁴가천대학교 생명과학과, ⁵국립농업과학원 곤충산업과, ⁶충남대학병원 응급의학과, ⁷한국생명공학연구원)

누에(*Bombyx mori*)에서 short neuropeptide F (sNPF) receptor를 encoding하고 있는 cDNA를 cloning하여서 BsNPF-R라고 이름을 붙였다. BsNPF-R는 이미 보고된 sNPF-R들과 아미노산 수준에서 사람(36%), 쥐(34%), 제브라피쉬(35%), 초파리(51%)와 상동성을 보였다. BsNPF-R는 계산적으로 분자량이 42,731 Da이고 원형질막을 관통하는 단백질이다. BsNPF-R 유전자발현은 중장, 후견사선, 말피기관, 정소에서 강한 반면 지방체, 혈세포, 난소에서 약하게 발현하였다. 그리고 합성된 sNPF에 의해서도 BsNPF-R의 유전자발현이 조절되었다.