

## 누에 배양세포(Bm5) 및 생체에서 베쿨로바이러스 발현계를 이용한 누에신 단백질 발현 특성

윤은영 · 구태원 · 황재삼 · 김상현 · 강석우 · 김근영 · 진병래<sup>1</sup>  
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부, <sup>1</sup>동아대학교 생명자원과학부

### Expression of Antibacterial Protein, Nuecin, Using Baculovirus Expression Vector System in Bm5 Insect Cell and *Bombyx mori*

Eun Young Yun, Tae Won Goo, Jae Sam Hwang, Sang Hyun Kim, Seok Woo Kang,  
Keun Young Kim and Byung Rae Jin<sup>1</sup>

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea  
<sup>1</sup>College of Natural Resources and Life Science, Dong-A, Busan 607-714, Korea

#### ABSTRACT

For the practical use of nuecin protein, we tried to overexpress nuecin using Bm5 insect cell and *Bombyx mori*. We inserted nuecin cDNA into pBm10pol-Xa vector derived from *B. mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV), and expressed in Bm5 cells and *B. mori* respectively. SDS-PAGE and Northern blot analysis showed an expressed of the protein when baculovirus expression vector system (BEVS) was used. The amount of intracellular protein is abundant, but the amount of extracellular protein is poor. The results suggest that the biologically active nuecin protein produced by using BEVS is poor because increased level of misfolded nuecin by the strong promoter, polyhedrin and p10 of BEVS, decrease the level of free chaperons and foldases by binding with them.

**Key words :** Bm5 insect cell, *Bombyx mori*, baculovirus expression vector system (BEVS)

#### 서 론

생물공학의 발달에 의해서 인간에게 유용한 생체 고분자 물질이 실험관 내 혹은 배양세포에서 만들어지고 있다. 그러나 이들은 기대한 것과 같은 활성을 나타내지 못하는 경우가 종종 발생하므로 현재 생물공학 분야에서 가장 중요한 이슈 중의 하나는 외부에서 도입된 유전자로부터 뛰어난 생체 활성을 가지는 외부단백질(heterologous protein)의 생산이다.

목적으로 하는 유전자를 발현시켜 생체 활성 물질을 대량 생산하기 위하여 포유동물 세포와 유사한 번역 후 변형 과정(post-translational modification process)을 가지는 새로운 단백질 생산 시스템이 요구되는데, 최근에 곤충세포가 주목을 받고 있다. 왜냐하면 곤충세포는 포유동물 세포와 매우 유사한 번역 후 변형과정을 가짐으로서 *E. coli* 같은 단순한 발현 시스템에서 생산된 재조합 단백질을 달리 뛰어난 생체 활성을 가지는 재조합 단백질을 생산할 수 있으며, 또한 포유동물 세포의 단백질 생산 시스템에 비하여 생산비용을 상당히 절감할 수 있을 뿐만 아니라 월등히 많은 생체 활성 물질을 얻을 수 있다는 장점이 있기 때문이다.

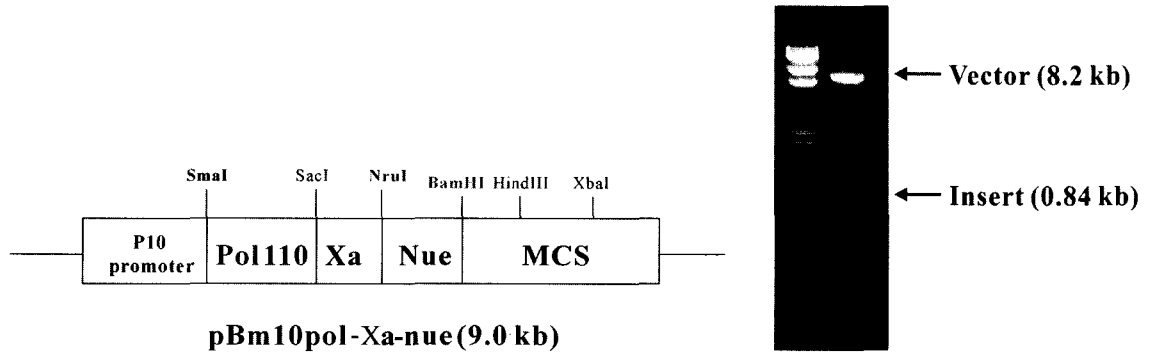
곤충세포의 최대 장점은 베쿨로바이러스 발현 벡터 시스템(baculovirus expression vector system, BEVS)이 확립되어져 있다는 것이고, 현재 glutamate transporter, protein kinase, melanotransferrin, factor Xa, interleukin6 및 ion transport peptide를 포함한 많은 종류의 분리 단백질이 베쿨로바이러스 발현계를 사용하여 곤충세포에서 생산되고 있으며(Pfeifer, 1998), 생산된 이들 재조합단백질은 진단학, 단백질 구조-기능 연구 및 백신 등의 연구를 포함하여 많은 응용연구에 이용되고 있다.

따라서 본 연구는 누에로부터 분리한 항세균성 단백질 유전자인 누에신을 누에세포 및 누에 생체에서 베쿨로바이러스 발현계를 이용하여 대량 생산함으로써 농업용 소재로서의 실용화 가능성을 모색하고자 수행하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 베쿨로바이러스(baculovirus) 전이벡터 제작

누에신 단백질을 누에 세포 및 누에 생체를 통해 발현하기 위해 pBm10pol-Xa 벡터(Kang et al., 2001)에 누에신



**Fig. 1.** Cloning of the open reading frame of the nuecin gene. M,  $\lambda$ -HindIII marker; lane 1, nuecin inserted in pBm10pol-Xa digested with *NruI/BamHI*. All samples were analyzed on 0.7% agarose gel.

전체 cDNA(GenBank accession no. AF005384)를 도입하고자 pBluescript SK-벡터에 삽입된 누에신 유전자의 open reading frame을 고려하여 sense primer(5'-CGGGATCCATGTCCAAGAG-3', 19-mer)와 antisense primer(5'-CG GGATCCCGTTAGAAGAATTTTCG-3', 24-mer)를 합성하고, preMix-top(Bioneer)을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭시킨 산물은 약 840 bp였다. 유전자 증폭시 유전자 중합효소의 특성상 생산물의 3' 말단에 아데닌(adenine)을 추가하는 특성이 있으므로 3' 말단에 티민(thymine)이 존재하는 pGEMT 벡터(Promega)에 유전자 증폭 산물을 클로닝하였다. 재조합 pGEMT-nue DNA를 *StuI/BamHI*로 절단하여 증폭된 누에신 유전자를 분리하고, 기 제작한 발현 벡터인 pBm10pol-Xa 벡터의 *StuI/BamHI* 위치에 누에신 유전자를 도입하여 약 9.0 kb의 재조합 전이벡터(pBm10pol-Xa-nue)를 제작하였다(Fig. 1).

## 2. 재조합 바이러스 제작

누에신 유전자가 도입된 재조합 바이러스를 생산하기 위해, 재조합 전이벡터 pBm10pol-Xa-nue 500 ng과 vBm10- $\beta$  viral DNA 혼합하고 lipofectin(Gibco)을 동량첨가하여 상온에서 15분 반응시켰다. 그리고 35 mm<sup>2</sup> 세포배양용 접시에 분주한  $1.0 \times 10^6$ 개의 Bm5 세포에 상기 혼합물을 접종하여 27°C에서 5시간 transfection하고, 새 배양액으로 교체한 후 27°C에서 5일간 배양하였다.

재조합 바이러스 vBm-nuecin의 선발은 plaque assay 방법 (Summers & Smith, 1987)으로 행하였다. 곤충 세포의 배양액을  $10^{-4}$ ~ $10^{-8}$ 으로 한계 희석하여  $1.5 \times 10^6$  세포를 포함하고 있는 well에 접종한 후, 최종농도 120  $\mu$ g/ml의 X-gal이 포함된 Seaplaque agarose(FMC)를 도말하고, 27°C에서 배양하면서 X-gal로 염색되지 않는 plaque의 재조합 바이러스를 선발하였다. 선발된 재조합 바이러스는 세포에 재접종하여 증식시킨 후 4°C에 보관하면서 실험에 공시하였다.

## 3. 전체 RNA 분리 및 Northern blot

재조합 바이러스 vBm-nuecin을 Bm5 세포 및 누에 생체에 접종한 후 1일 간격으로 6일간 세포를 회수하여 전체 RNA를 분리하였다. 전체 RNA 분리는 RNAagents Total RNA Isolation System(Promega)을 이용하여 분리하였으며, 분리한 전체 RNA는 milliblot system(Millipore)을 이용하여 나일론 막에 전이한 후 동위원소로 표지된 누에신 cDNA를 탐침으로 Northern blot을 수행하였다(Sambrook 등, 1989).

## 4. SDS-PAGE

Bm5 세포 및 누에 생체에 재조합 바이러스 접종후 5일간 1일 간격으로 세포를 회수하여 단백질 전기영동(Laemmli, 1970)을 수행하여 누에신 단백질의 세포내 발현을 확인하였다. 재조합 바이러스가 접종된 세포를 모아서 2,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤, 침전된 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하고, 2배 농도의 단백질 시료 용액(0.0625M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 혼합하였다. 그리고 100°C에서 5분간 가열한 후, 전기영동은 12.5% SDS-polyacrylamide 겔에서 수행하고, Coomassie brilliant blue로 염색하였다. 또한 배지내로 분비된 성숙 누에신의 분석은 재조합 바이러스가 감염된 누에로부터 3일, 4일 및 5일째 그 혈액을 수집하고 Centricon-10(Amicon)으로 농축하여 Laemmli(1970) 방법의 겔에 urea를 첨가하여 crosslinker에 변화를 주는 방법(Ito 등, 1980)으로 urea-SDS phosphate PAGE를 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 누에 배양세포(Bm5) 및 누에 생체에서 발현가능한 재조합 누에신 발현벡터 제작

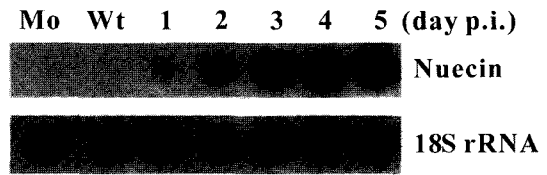
본 연구는 누에신 단백질의 대량발현을 통해 농업용 소

재로서 이용하고자 하는 연구의 일환으로 우선 누에 세포 및 누에 생체에서 누에신 단백질의 대량생산을 위해 농업과 학기술원 잠사곤충부 생체정보연구실에서 앞서 보고한 바 있는 누에 배양세포 및 누에 생체에서 외래 단백질 발현시 유용한 누에 핵다각체병 바이러스 유래 벡터인 pBm10pol-Xa 벡터(Kang *et al.*, 2001)에 누에신 유전자를 도입하였다. 우선 pBluescript SK-벡터에 삽입된 누에신 유전자의 open reading frame을 고려하여 sense primer(5'-CGGGA-TCCATGTCCAAGAG-3', 19-mer)와 antisense primer(5'-CGGGATCCCCTTAGAAGAATTCCG-3', 24-mer)를 합성하고, preMix-top(Bioneer)을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭시킨 산물을 pGEMT 벡터(Promega)에 클로닝하였다. 재조합 pGEMT-nuc DNA를 *StuI/BamHI*으로 절단하여 증폭된 누에신 유전자를 분리하고, pBm10pol-Xa 벡터(Kang *et al.*, 2001)의 *NruI/BamHI*자리에 누에신 유전자를 도입하여 약 9.0 kb의 재조합 전이벡터(pBm10pol-Xa-nuc)를 제작하였다(Fig. 1). 제작된 pBm10pol-Xa-nuc는 p10 promoter의 지배하에 다각체 단백질 발현시 필수 부분인 110개의 아미노산으로 구성된 pol 110, protease cleavage site인 Xa 및 그 하류에 누에신 유전자의 ORF로 구성되어 있다(Fig. 1). Kang 등(2001)이 보고한 것처럼 pBm10pol-Xa 벡터는 외래 단백질 발현시 외래 단백질이 다각체 단백질과 혼재형 (fusion)으로 발현되므로 기존에 정립된 다각체 분리방법에 의해 혼재형 단백질 정제후 protease를 처리함으로써 protease 인식 위치인 Xa에서 혼재된 두가지 단백질은 각각의 단백질로 절단되어 순수분리가 용이하다는 특성을 가진 벡터이다. 따라서 pBm10pol-Xa 벡터에 도입하여 발현된 누에신 단백질 또한 누에 배양세포 및 생체에서 발현 후 순수분리가 용이한 것이 특성이다.

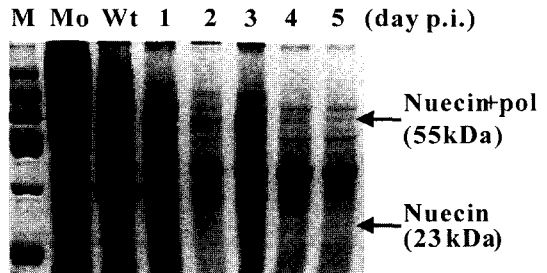
**2. 누에 배양세포 및 누에 생체를 이용한 누에신 발현**

누에세포주(Bm5)에서 누에신 전사체의 발현양상을 확인하기 위해 Bm5 세포에 재조합 누에신 바이러스 접종 후 1일째부터 5일째까지 세포를 수집한 후 누에신 유전자를 탐침(probe)으로 RNA dot blot을 수행한 결과 누에신 전사체는 바이러스 접종 후 1일째부터 발현되기 시작하여 5일째에 최대로 발현되었음을 확인할 수 있었고, 그 전사체의 발현이 오랫동안 지속되며 그 발현량도 많음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그리고 누에세포주(Bm5)에서 다각체 융합 누에신 단백질 발현양상을 확인하기 위해 바이러스 접종후 1일째부터 5일째까지 세포를 수집하여 SDS-PAGE를 수행한 결과 3일째부터 발현량이 증가하여 5일째까지 계속 지속적으로 발현되었으나, 전사량에 비하여 누에신 단백질 발현량은 많지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

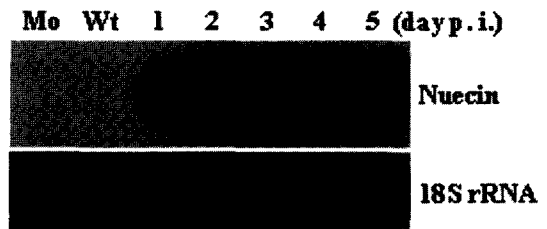
한편 누에 생체에서의 재조합 누에신 전사체 및 단백질



**Fig. 2.** Dot blot analysis of the Bm5 cells infected with recombinant baculovirus, vBm-nuc. Total RNA was extracted from vAc-nuc at 1, 2, 3, 4 and 5 day post-infection, and RNA dot blotted on a nylon membrane. 18S rRNA was used as a marker of quantitation.

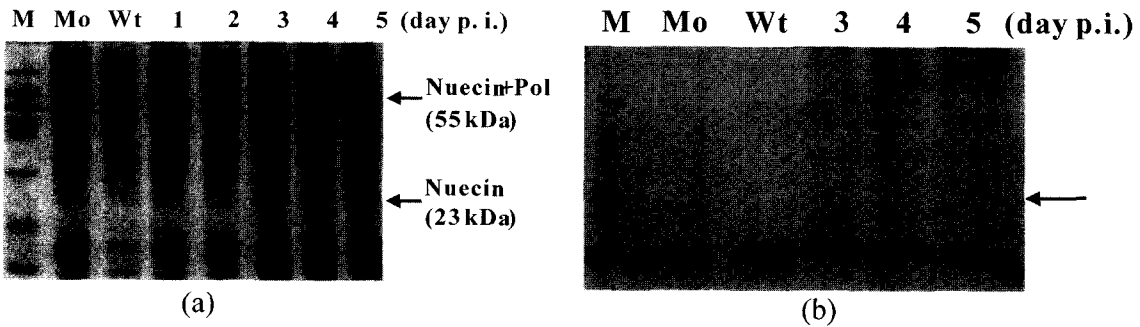


**Fig. 3.** SDS-PAGE analysis of nuecin. The mock-infected Bm5 cells (lane Mo) and Bm5 cells infected with wild type BmNPV (lane Wt) or recombinant virus, vBm-nuc were harvested at 1 (lane 1), 2 (lane 2), 3 (lane 3), 4 (lane 4) and 5 (lane 5) day post-infection. Total cellular lysates were extracted from Bm5 cells and then analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Lane M, mid range protein size marker.



**Fig. 4.** Northern blot analysis of the *B. mori* infected with recombinant baculovirus, vBm-nuc. Total RNA was extracted from at 1, 2, 3, 4 and 5 day post-infection, and dot blotted on a nylon membrane. 18S rRNA was used as a marker of quantitation.

의 발현양상을 확인한 결과 재조합 누에신 바이러스 접종후 전사체는 누에 배양세포에서 보다 조금 증가하였고 발현양상은 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그리고 누에 생체에 재조합 누에신 바이러스 접종 후 세포내에서의 단백질 발현양상을 확인한 결과 누에 생체에서 세포내 발현은 누에 배양세포에서 발현한 것처럼 3일째부터 발현량이 증가하여 5일째에는 최대로 발현되었으나 누에 배양세포에서의 발현량과 비교하여 기대만큼 그 발현량이 많지는 않았다(Fig. 5A). 그리고 누에신 단백질의 세포외 발현은 분비형 단백질인 누에신의 경우 세포내에서 합성 후 소포체 및 골지체를 거쳐 분비소낭을 타고 수송되어 세포외로 분비된 후 그 활



**Fig. 5.** Panel (A), SDS-PAGE analysis of nuecin. The mock-infected *B. mori* (lane Mo) and *B. mori* infected with wild type BmNPV (lane Wt) or recombinant virus, vBm-nuecin were harvested at 1 (lane 1), 2 (lane 2), 3 (lane 3), 4 (lane 4) and 5 (lane 5) day post-infection. Total cellular lysates were extracted from *B. mori* and then analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Lane M, mid range protein size marker. Panel (B), Urea-SDS phosphate PAGE analysis of the mature nuecin. The mock-infected Sf9 cells (lane 1) and Sf9 cells infected with wild type AcNPV (lane 2) or recombinant virus, vAc-nuecin were harvested at 3 (lane 3), 4 (lane 4) and 5 (lane 5) days post-infection. The concentrated culture media were analyzed by 15% urea-SDS phosphate PAGE. An arrow indicates the mature nuecin.

성을 나타내므로 누에 생체에 바이러스 접종 후 3일째부터 5일째까지 그 혈액을 채취하여 농축한 후 단백질 전기영동을 수행한 결과(Fig. 5B), 세포내에서의 발현량보다 현저하게 적은양의 누에신 단백질이 세포외로 분비됨을 확인할 수 있었다.

따라서 베쿨로바이러스 발현계를 이용하여 생체에서 누에신 단백질처럼 분비형 단백질 발현시 강력한 프로모터에 의해 세포내에서 합성된 신생 폴리펩타이드의 합성량은 많더라도 정확히 고차구조를 형성하고 분비되어 활성을 나타내는 단백질의 발현량은 매우 적음을 확인할 수 있었다.

이는 아마도 베쿨로 바이러스 감염시 세포내에서 새로운 외래 단백질이 강력한 프로모터 하에서 과도하게 발현될 경우 숙주세포는 단백질 고차구조 형성을 도와주는 chaperon과 foldase 및 분비를 위한 보조 인자(secretory assistance factor) 공급이 제한됨으로써 단백질의 정확한 고차구조 형성이 저해되었기 때문으로 추정할 수 있었다(Hsu *et al.*, 1994; Jarvis and Garcia, 1994). 또한 베쿨로바이러스 발현계를 이용하여 외래 단백질 발현시 때때로 강력한 다각체 프로모터(polyhedrin promoter)에 의해 폴리펩타이드의 발현은 다량으로 되더라도 부적절하게 프로세싱(processing)되거나 집합체(aggregate)로 축적되는 경우가 많이 보고되고 있다(Hsu *et al.*, 1997).

이상의 결과로서 본 연구는 베쿨로 바이러스 발현계를 이용하여 누에신 단백질 발현시 정확한 메카니즘은 알 수 없지만 핵다각체 바이러스 유래의 강력한 프로모터에 의해 세포내 단백질 발현량은 많은데 비해 정확한 고차구조를 형성하여 세포외로 분비되는 생물학적 활성을 띠는 단백질은 매우 적은 양만이 발현되었으며, 이는 강력한 프로모터에 의해 세포내에서 아무리 많은 외래 단백질이 발현된다 하더라도 세포내에서 정확한 단백질 고차구조 형성을 도와주는

foldase 및 chaperon의 양은 한정되어져 있으므로 생리활성을 나타내는 단백질의 발현이 제한되는 것으로 추정할 수 있었다.

따라서 추후 베쿨로바이러스 발현계를 이용하여 곤충 세포 및 생체에서 유용한 외래 단백질의 대량 발현을 위해 곤충을 유용 단백질을 생산하는 생체공장으로 이용하고자 할 때 분비 프로세싱의 해명 및 번역 후 변형과정을 개선하기 위한 연구가 시급히 요구된다.

## 적 요

본 연구는 누에신 단백질의 대량발현을 통해 농업용 소재로서 이용하고자 하는 연구의 일환으로 누에 핵다각체 바이러스 유래의 pBm10pol-Xa 벡터에 누에신 유전자를 도입하여 누에 배양세포(Bm5) 및 누에 생체에서 발현한 결과 누에신 전사체는 바이러스 접종 후 1일째부터 발현되기 시작하여 5일째에 최대로 발현되었음을 확인할 수 있었고, 누에신 단백질은 3일째부터 발현량이 증가하여 5일째까지 계속 지속적으로 발현되었으나 그 발현량은 전사체에서처럼 많지 않음을 확인할 수 있었으며, 누에신 단백질의 발현량은 누에 세포에 비해 누에 생체에서 기대만큼 그 발현량이 많지 않았다. 또한 누에신의 베쿨로바이러스 발현계(baculovirus expression vector system, BEVS)를 이용하여 세포내 및 번역후 변형과정을 통하여 세포외로 분비된 누에신의 발현양상을 확인한 결과 세포내에 비해 세포외로 분비시 그 발현량이 현저히 줄어들었음을 확인할 수 있었다. 따라서 베쿨로바이러스 발현계를 이용하여 외래 단백질을 생산할 경우 정확한 메카니즘은 밝혀지지 않았으나 강력한 프로모터에 의해 세포내 단백질 생산량은 많은데 비해 정확한 단백질 고차구조 형성을 도와주는 foldase 및 chaperon

의 양은 한정되어져 있으므로 정확한 고차구조를 형성하여 세포외로 분비되는 생물학적 활성을 띠는 단백질은 매우 적은 양만이 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러므로 추후 누에신 단백질 대량생산을 위해서는 분비 프로세싱의 해명 및 번역 후 변형과정의 개선을 통한 발현계의 개량이 시급히 요구된다.

### 인용문헌

- Hsu, T. A., Eiden, J. J. and Betenbaugh, M. J. 1994. Engineering the assembly pathway of the baculovirus-insect cell expression system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **721**: 208-217.
- Hsu, T. A. and Betenbaugh, M. J. 1997. Coexpression of molecular chaperone BiP improves immunoglobulin solubility and IgG secretion from *Trichoplusia ni* insect cells. *Biotechnol. Prog.* **13**: 96-104.
- Ito, K., Date, T. and Wickner, W. 1980. Synthesis, assembly into cytoplasmic membrane, and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein. *J. Biol. Chem.* **225**: 2123.
- Jarvis, D. L. and Garcia, A. 1994. Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology* **205**: 300-313.
- Kang, S. W., Yun, E. Y., Woo, S. D., Goo T. W. and Hwang, J. S. Construction of a novel recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus producing the fluorescent polyhedra. *Int. J. Indust. Entomol.* **3**(1): 75-81.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Pfeifer, T. A. 1998. Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 518-21.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* pp. 174-184, Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y.
- Summers, M. D. and Smith, G. E. 1987. *A methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures.* Texas Agricultural Experiment Station. Bulletin No. 1555.