

락토페린 유전자도입 *piggyBac* 벡터에 의한 누에 형질전환

김용순* · 손봉희 · 김기영 · 정이연 · 김미자 · 강필돈
농촌진흥청 농업과학기술원 농업생물부

Germ Line Transformation of the Silkworm, *Bombyx mori* L. with a *piggyBac* Vector Harboring the Human Lactoferrin Gene

Yong-Soon Kim*, Bong-Hee Sohn, Kee-Young Kim, I-Yeon Jung, Mi-Ja Kim and Pil-Don Kang

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-853, Korea

ABSTRACT

Lactoferrin, an ion-binding 80-kDa glycoprotein, has been suggested to have many biologic activities, such as facilitating ion absorption and having antimicrobial and anti-inflammatory effects. Several of these activities are likely to only be facilitated by human lactoferrin because they depend on the binding of human lactoferrin to specific receptor. To produce recombinant human lactoferrin to animal foods using transgenic silkworm, *Bombyx mori* L., we have cloned and sequenced the cDNA encoding for a human lactoferrin (HLf) from the mRNA in mammary tumor line (GI-101). As a result, the 2.5-kb fragment of HLf gene was cloned with pGEM-T vector and then this fragment was sequenced. In the nucleotide sequence analysis, single open reading frame of the 2,136-bp encoding for a polypeptide of 712 amino acid residues was detected. On the other hand, we constructed a recombinant plasmid(pPT-HLf), containing human lactoferrin gene for germ line transformation of the silkworm using a *piggyBac* transposon-derived vector. A non-autonomous helper plasmid encodes the *piggyBac* transposase. Approximately 6.7% of individuals in the G0 silkworms expressed green fluorescent protein (GFP). PCR analyses of GFP-positive silkworms (G0 and G1) revealed that independent insertions occurred frequently. Furthermore, Western blot analysis showed that the recombinant HLf expressed in hemolymph has the same molecular weight (80 kDa) as a native protein. On the basis of these experiments, expression of HLf in next generation of transgenic silkworm is now in process.

Key words : Silkworm, Transposon, *piggyBac*, Lactoferrin

서 론

단백질 함량이 높은 누에는 오래전부터 천연 건강 보조 식품으로 널리 사용되어 왔다. 특히 누에에서 혈당강화 작용이 밝혀지면서 그 용도는 식품뿐만 아니라 의약품으로서의 가능성도 보여 주고 있다. 하지만 이러한 천연 건강식품으로서의 누에에 관한 과학적 접근은 부분적이며 아직은 의학서에 기초하여 그 효과를 증명하고 있는 실정이다.

한편 천연 상태의 락토페린은 주로 젖소와 사람의 초유에 들어있는 강력한 항바이러스 및 항균성 물질이며 철분이 결합된 당 단백질(M_r: 80 kDa)로써 철분을 화합하고 유리하는 중요한 기능을 한다(Arakawa *et al.*, 1999). 이러한 생리적 활성 때문에 형질전환 방법에 의해 tobacco

cell(Amitava & Zhan, 1994), 베쿨로바이러스(Salmon *et al.*, 1997) 그리고 쥐(Kim *et al.*, 1999) 등에서 락토페린의 발현 연구가 진행되어 왔다. 또한 재조합 베쿨로바이러스를 감염시켜 누에에서 사람 성장호르몬(human growth hormone)을 발현시킨 보고는 이 성장호르몬이 누에 유충에서 대량 발현되고 혈장으로 분비되었으며 면역학적, 생화학적 특성이 천연의 사람 성장호르몬과 정확히 같다는 것이 밝혀졌다(Sumathy *et al.*, 1996). 그리고 Ho *et al.*(1998)은 잉어(*Ctenopharyngodon idellus*)의 성장 호르몬을 누에에서 발현시킨 다음 누에를 분말화하여 잉어 사료에 첨가하여 투여한 결과, 잉어의 성장 속도가 매우 빨라짐을 보고하였다. Marumoto *et al.*(1987)은 IGF II를 누에 유충에서 발현시켜 3.6mg의 단백질을 생산할 수 있었으며 이 IGF를 정제하여 생화학적, 생물학적 동정을 수행하였다.

*Corresponding author. E-mail: kim0214@rda.go.kr

그러나 이와 같은 많은 단백질의 발현 성공에도 불구하고 누에의 염색체 속에 외래유전자를 도입하여 형질전환 누에(transgenic silkworm)를 만든 보고는 많지가 않다. Mori *et al.*(1995)은 luciferase를 벡로로바이러스에 클로닝 하여 재조합 벡터를 만든 후 누에에 감염시켜 발현시켰으며 이 유전자가 2세대까지 유전됨을 확인하였으나 누에의 chromosome속에 luciferase가 도입되었는지는 확인하지 못하였다. 한편 Yamao *et al.*(1999)은 누에의 피브로인 light-chain 유전자의 exon 7위치에 GFP 단백질을 coding하는 유전자를 클로닝 하고, 이를 암컷 누에에 감염시켜 수컷 누에와 교배시키는 gene targeting 방법으로 형질전환 누에를 만드는데 성공하였다. 이 유전자는 전사선에서 발현되었으며 cocoon layer에서 단백질이 발견되고 이 유전자는 여러 세대에서 안정적으로 유전되었다는 연구 보고가 있다. 그리고 Tamura *et al.*(2000)은 인시목 곤충에 널리 이용할 수 있는 트랜스포존을 도입한 전이벡터를 구축하여 누에 게놈 상에 외래유전자가 도입된 형질전환 누에를 작성하였다. 이 연구 결과를 바탕으로 하여 최근에는 insect cell(Nakamura *et al.*, 2001) 및 누에(Liu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005)에서도 재조합 락토페린을 발현시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구는 위와 같은 연구 결과에 주목하여 첨단 생명공학 기법을 이용한 누에의 기능성 연구의 일환을 누에로부터 사람의 초유에 많이 함유된 항 세균 및 면역증진 물질인 락토페린을 생산하는 형질전환 누에를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 누에 품종

본 연구에서는 농업과학기술원 농업생물부에서 계대 보존하고 있는 다화성 누에 품종인 HM을 사용하였다. DNA를 주사한 후의 누에알은 부화할 때까지 온도 25°C, 습도 70%의 배양기 내에서 보호하였다. 1령 유충부터 인공사료로 사용하였으며 사육방법은 일반적인 사육법에 준하여 수행하였다. G0 및 G1 세대 성충간의 교배는 동일한 형제세대 또는 수용 품종의 성충간 역교배에 의해 수행하였으며, 그 방법은 Fig. 1에 나타냈다.

2. Lactoferrin cDNA 클로닝 및 염기배열 결정

사람의 GI-101 세포주에서 mRNA를 추출한 후, PCR primers(Hum-lacto A1: AGAACC AGCCGAGTTTCTCA; Hum-lacto B1: GAATGGCTGAGGCTTTCTTG; Hum-lacto B2: AAGACG ACAGCAGGGAATTG)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 락토페린 cDNA는 pGEM-T easy

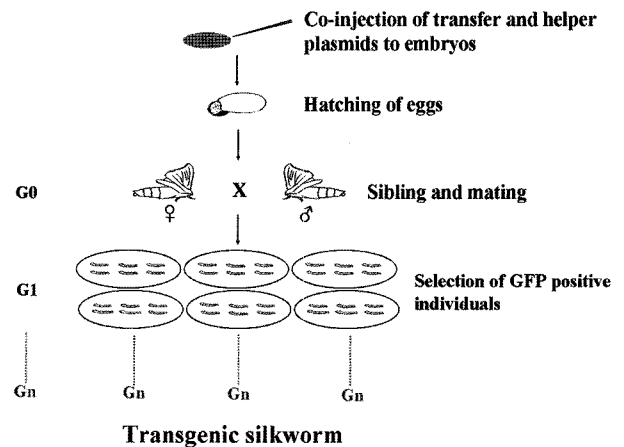


Fig. 1. Scheme of mating and screening method for transgenic silkworm.

벡터(Promega Co.)를 이용하여 subcloning 하였으며 PCR 과정에서 발생할 돌연변이의 가능성을 최소화하기 위하여 pfu enzyme을 PCR에 첨가하고 클로닝 된 cDNA의 염기서열은 Sp6와 T7 primer(Promega Co.)를 사용하여 2회 이상 결정하였다. 락토페린 cDNA 단편의 염기배열 결정은 Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(Perkin-Elmer)을 이용하여 제조사의 설명에 따라 ABI 377 sequencer에 의해 분석하였다. cDNA 클로닝, 염기배열 결정, 전이벡터 구축 등 일반적인 유전자조작 실험은 molecular cloning 방법(Sambrook *et al.*, 1989) 준하여 수행하였다. 또한 제한효소를 포함한 유전자조작 관련 시약 등은 따로 기재되지 않는 한 미국 Promega사와 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였다.

3. Lactoferrin cDNA 유전자 발현 검정

2~3일간 배양한 Sf9 세포를 lipopectin method를 이용하여 재조합 발현 벡터에 의한 형질전환 세포를 작성하였다. 즉, 벡터 DNA(pIZT-lacto)와 lipopectin 용액을 혈청과 항생제가 첨가되지 않은 배지에 분리하여 희석한 후 1:5의 비율로 함께 혼합한 형질전환 배지를 조제하였다. 이 형질전환 배지를 실온에서 15분간 반응시킨 후에 2시간 전에 미리 6-well plate에 고정시킨 세포에 분주하였다. 24시간 동안 27°C에서 세포를 배양한 후 lipopectin이 함유된 형질전환 배지를 제거하고 10% 혈청이 첨가된 배지를 일정량 분주하여 4일간 배양한 세포를 회수하여 발현 단백질 분석에 사용하였다.

4. 형질전환용 전이벡터 구축

누에 형질전환을 위한 전이벡터 구축을 위해 Tamura *et al.*(2000)이 사용한 전이벡터 pPIGA3GFP를 개조하여 클

로닝 한 락토페린 cDNA를 삽입한 전이벡터를 구축하였다. 즉 전이벡터는 선택마커인 GFP 유전자 영역과 락토페린 cDNA 영역을 각각의 프로모터에 의해 발현될 수 있도록 하였고, 목적유전자의 전이활성에 관여하는 helper 플라스미드는 Tamura *et al.*(2000)이 구축한 pHA3PIG를 사용하였다.

5. DNA 누에알 주사 및 형질전환 누에 선발

전이벡터(pPT-HL_f)와 helper 플라스미드(pHA3PIG)가 도입된 각각의 *E. coli*를 LB broth 50ml에 배양한 후, Wizard Plus Minipreps DNA Purification Systems(Promega Co.)을 사용하여 플라스미드를 분리 정제하였다. 누에알 주사를 위한 전이벡터와 helper 플라스미드의 DNA 혼합용액은 5 mM KCl/0.5 mM 인산완충 용액(pH 7.0)을 사용하여 300 µg/ml가 되도록 조제하였다.

누에알은 산란 2시간 후 수정핵이 형성되고 이후 1시간에 1회씩 핵분열 반복하여 약 12시간 후에 포배가 형성된다. 배아 발육시기가 일정한 누에알을 얻음으로써 부화 및 형질전환 효율을 높이기 위해서는 우화 당일의 성충을 4시간 이상 교미시킨 다음, 5°C 냉장고에 보존시킨다. 다음날 25°C에서 옮겨 활애시키고 산란한 누에알을 포르말린 소독 및 70% 에탄올로 세척한 후 건조하여 실험에 사용하였다. DNA 미량주사는 buffer로 희석한 DNA 혼합용액을 누에알 한 개당 3~4 nl 정도 주사하였다. 주사한 누에알은 온도 25°C, 습도 70%로 유지되는 배양기에서 보호하였다.

주사한 누에알에서 부화한 세대에서의 형질전환 누에(G0) 및 선발된 성충 간 또는 처리하지 않은 성충간의 역교배에 의한 차세대(G1) 개체는 형광현미경을 이용하여 marker 유전자인 녹색형광단백질(GFP)의 발현 유무로 선발하였다.

6. SDS-PAGE 및 Western blot 분석

12% polyacrylamide-SDS gel(Laemmli, 1970)에 의해 분리된 단백질 시료는 Coomassie Brilliant Blue 염색에 의한 단백질 확인과 함께 Western blot 분석을 수행하였다. SDS-PAGE 전기영동으로 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane(Amersham-Pharmacia Biotech)에 전사시켜 3% skim milk로 blocking하고, 1st antibody (anti-rabbit IgG, 1 : 1000 TBS buffer로 희석, Amersham Biosciences, UK) 및 2nd antibody(rabbit anti-lactoferrin, 1 : 1000 TBS buffer 희석, Sigma)와 각각 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 buffer로 세척한 후, BCIP/NBT 용액(Amerco, USA)을 이용하여 목적 단백질을 검출하였다.

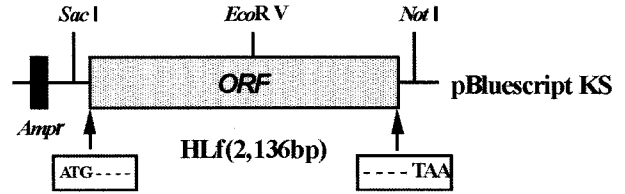


Fig. 2. Restriction enzyme map of the human lactoferrin (HL_f) gene. The HL_f gene, which is located in the 2,136 bp *SacI*-*NotI* site, was cloned on pGEM T-easy vector and then subcloning pBluescript KS vector. The nucleotide sequence of the denoted region by the dotted box was analyzed.

결과 및 고찰

1. Lactoferrin cDNA 클로닝 및 염기배열 결정

Taq Dye Deoxy Terminator Cycle sequencing Kit을 이용하여 락토페린 cDNA의 염기배열을 결정하였다. 그 결과 클로닝 된 락토페린 cDNA 유전자에서 개시코돈 ATG와 종결코돈 TAA를 포함하는 open reading frame(2,136bp) 영역을 확인하였으며(Data 표시 안함) NCBI database의 nucleotide homology 검색과도 일치하였다. 전이벡터 구축을 위해 pBluescript KS 벡터에 subcloning된 락토페린 cDNA 유전자의 restriction map은 Fig. 2와 같다.

2. Lactoferrin cDNA 유전자 발현 검정

Sf9 배양 세포를 원심분리 하여 얻은 시료를 파쇄 하여 얻은 조추출물을 단백질 시료로 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 그런 다음 lactoferrin 항체를 이용한 Western blot 분석으로 배양세포 내에서 정상적으로 발현 벡터 재조합 pIZT-lacto에 의해 외래단백질이 발현되는지 조사하였다. 그 결과 Fig. 3[B]에 나타난 것과 같이 락토페린으로 추정되는 약 80kDa의 발현 단백질을 확인하였다.

3. 형질전환용 전이벡터 구축

인시목 곤충 중에서도 특히 누에의 형질전환에 높은 전이효율과 활성을 나타내고 있는 트랜스포존 영역을 이용한 전이벡터 pPIGA3GFP를 개조하여 락토페린 cDNA를 삽입시킨 전이벡터 pPT-HL_f를 구축하였다(Fig. 4). 즉 전이벡터 pPT-HL_f는 선택마커 GFP 유전자를 기존의 Actin3 프로모터 영역의 하류에 두고, 발현하고자 하는 목적의 락토페린 cDNA 유전자를 바이러스 유래의 IE2 프로모터 영역 하류에 두는 구조를 갖추고 있는 벡터를 구축하였다. 한편, 목적유전자의 전이활성에 관여하는 helper 플라스미드는 Tamura *et al.*(2000)이 구축한 pHA3PIG를 사용하였다.

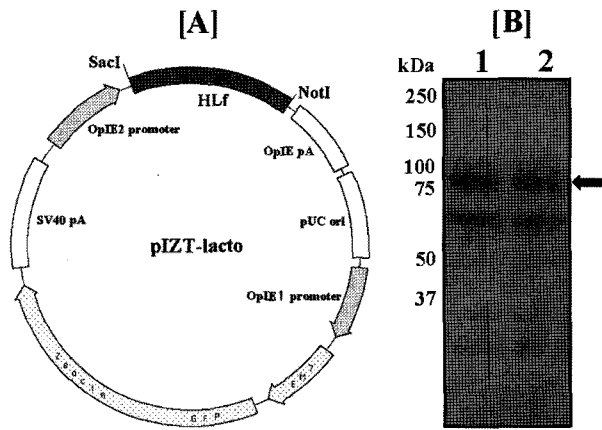


Fig. 3. Construction of recombinant plasmid containing human lactoferrin (HLf) gene for expressed in Sf9 cells (A) and Western blot analysis of stably transformed Sf9 cells expressing HLf protein (B). Lanes 1 and 2 are cellular fraction of stably transformed Sf9 cells. Numbers on the left indicate the molecular weight markers and arrowhead indicates the HLf protein.

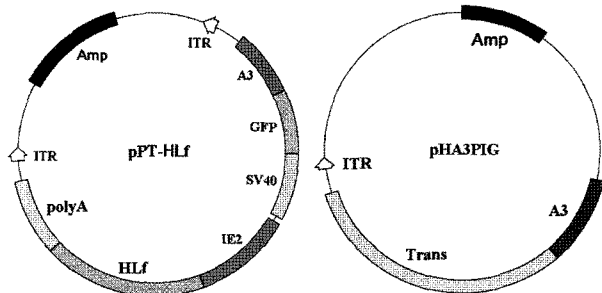


Fig. 4. Construction of transposable vector containing human lactoferrin gene and helper plasmid. A3, *B. mori* cytoplasmic actin gene promoter; GFP, green fluorescent protein; SV40, 3'untranslated sequences; IE2, OpIE2 promoter; HLf, human lactoferrin gene; polyA, OpIE2 polyadenylation sequence Trans, *piggyBac* transposase; ITR, inverted terminal repeats; Amp, ampicillin resistance.

4. 형질전환 누에 선발

DNA 미량 주사장치를 이용하여 누에알에 DNA 혼합 용액을 주사한 총 누에알 개수는 1,907이었으며 그 중에서 형광 실체현미경 관찰에 의한 GFP를 발현하는 누에 49 개체를 선발하였고 GFP 발현 개체의 출현 비율은 약 6.7% 정도를 나타냈다(Table 1).

한편 G0 세대에서 선발된 형질전환 누에의 동일한 세대간 교배 및 처리하지 않은 성충간의 역교배에 의한 차세대(G1) 개체에서 강한 녹색형광단백질의 발현을 확인할



Fig. 5. GFP expression in G1 transgenic silkworms transformed by pPT-HLf vector. Transformed larvae are fluorescent (white arrows), as compared with non-transformed controls (black arrows).

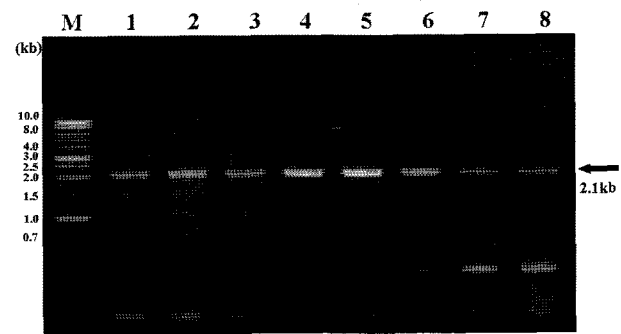


Fig. 6. Gel electrophoresis of products amplified by the HLf gene primers PCR (lanes 1 to 8). Arrowhead indicates the HLf gene bands(2.1kb). PCR products amplified from genomic DNA of GFP positive individuals (G1).

수 있었다(Fig. 5).

5. PCR 및 Western blot 분석

선택 marker로 도입한 녹색형광단백질(GFP) 유전자가 G0 세대의 누에 계놈내로 전이되었음이 PCR 반응으로 확인되었다(결과 표시하지 않음). 이 결과를 기초로 하여 G0 세대에서 선발된 형질전환 누에의 동일한 세대간 교배 및 처리하지 않은 성충간의 역교배에 의한 차세대(G1) 개체에서 강한 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 개체로부터 분리한 계놈 DNA를 이용하여 PCR(Lac-F: 3'-TACGGA TCCATGAACTTGTCTTCCTC-5', Lac-R: 3'-TAGGGAT CCCTTCCTGAGGAATTCACAGG-5')을 수행한 결과, 형질전환 누에 개체(G1)에서 락토페린 유전자와 동일한 크기의 2.1kb DNA단편을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

Table 1. Injection of pPT-HLf vector in silkworm embryos of the polyvoltin strain

Number of injected embryos	Number of hatched embryos	Number of fertile moths	Number of GFP positive larvae	Number of GFP positive larvae(%)
1,907	962	725	49	6.7

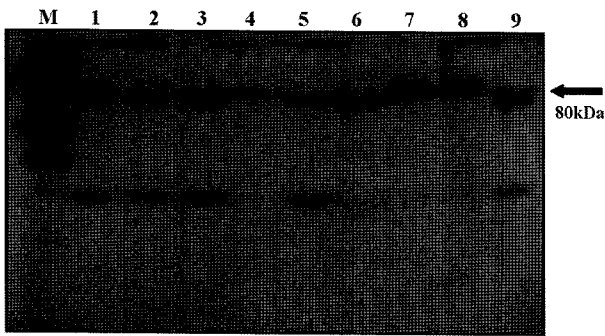


Fig. 7. Western blot hybridization by the GFP-positive individuals (G1). Arrowhead indicates the HLF protein bands (80 kDa). Lanes 1 to 4 and 7 to 9, transformed individuals; lane 6, positive control.

한편, 형질전환 G1 세대의 누에 개체에서 추출한 조출물을 시료로 하여 Western blot 분석을 수행한 결과, 표준 락토페린 항체와 반응하는 약 80-kDa의 발현단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

적 요

락토페린 cDNA 유전자를 도입시킨 누에 형질전환 실험을 수행한 결과, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 사람 GI-101 세포주의 mRNA로부터 클로닝 된 락토페린 cDNA 유전자의 개시코돈 ATG와 종결코돈 TAA를 포함하는 open reading frame(2,136 bp) 영역을 확인하였다.
2. Sf9 배양세포의 조추출물 시료에 의한 Western blot 분석 결과, 락토페린으로 추정되는 약 80kDa의 단백질 발현을 확인하였다.
3. 누에 형질전환에 높은 전이효율과 활성을 나타내는 트랜스포존을 이용한 전이벡터 pPIGA3GFP를 개조하여 락토페린 cDNA를 삽입시킨 전이벡터 pPT-HLF를 구축하였다.
4. DNA 미량 주사법에 의한 누에 형질전환 개체의 발현 비율은 약 6.7% 정도를 나타냈다.
5. 형질전환 누에(G0) 동일한 세대간 교배 및 처리하지 않은 성충간의 역교배에 의한 차세대(G1) 개체로부터 락토페린 유전자와 동일한 크기의 2.1 kb DNA단편을 확인할 수 있었으며, 형질전환 G1 세대의 조출출물 시료에 의한 Western blot 분석 결과, 표준 락토페린 항체와 반응하는 약 80 kDa의 단백질 발현을 확인할 수 있었다.

인용문헌

Amitava M. and Z. Zhan (1994) Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial

protein (s). *Plant Physiol.* **106**: 977-981.

- Arakawa, T., Chong, D. K. K., Slattery C. W. and Langridge, W. H. R. (1999) Improvement in human health through production of human milk proteins in transgenic food plants. In: Shahidi F *et al.*, eds. *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. New York: Kluwer Academic Publishers, Plenum Publishers, pp. 149-159.
- Ho, W. K., Meng, Z. Q., H. Lin, R., Poon, C. T., Leung, Y. K., Yan, K. T., Dias, N., Che, A. P., Liu, J., Zheng, W. M., Sun, Y. and Wong, A. O. (1998) Expression of grass carp growth hormone by baculovirus in silkworm larvae. *Biochim Biophys Acta.* **1381**: 331-339.
- Kim, S. J., Sohn, B. H., Jeong, S., Pak, K. W., Park, I. Y., Lee, T. H., Choi, Y. H., Lee, C. S., Han, Y. M., Yu, D. Y. and Lee, K. K. (1999) High-level expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice using genomic lactoferrin sequence. *J. Biochem.* **126**: 320-325.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage, *Nature*, **227**: 680-685
- Liu, T., Zhang, Y. Z. and Wu, X. F. (2005) High level expression of functionally active human lactoferrin in silkworm larvae. *J Biotechnol.* **118**: 246-256.
- Marumoto, Y., Sato, Y., Fujiwara, H., Sakano, K., Saeki, Y., Agata, M., Furusawa, M. and Maeda, S. (1987) Hyperproduction of polyhedrin-IGF II fusion protein in silkworm larvae infected with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol.* **68**: 2599-2606.
- Mori, H., Yamao, M., Nakazawa, H., Sugahara, Y., Shirai, N., Matsubara, F., Sumida, M. and Imamura, T. (1995) Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm, *Bombyx mori*, by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechnology.* **13**: 1005-1007.
- Nakamura, I., Watanabe, A., Tsunemitsu, H., Lee, N. Y., Kumura, H., Shimazaki, K. I. and Yagi, Y. (2001) Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Expression and Purification.* **21**: 424-431
- Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M. C., Coddeville, B. and Spik, G. (1997) Characterization of human lactoferrin produced in the baculovirus expression system. *Protein Expression and Purification.* **9**: 203-210.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual-2nd Edition* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sumathy, S., Palhan, V. B. and Gopinathan, K. P. (1996) Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Expression and Purification,* **7**: 262-268.
- Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J. L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, Prudhomme, M., J. C. and Couble, P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat Biotechnol.* **18**: 81-84.
- Wang, Y., Wu, X., Liu, G., Cao, C., Huang, H., Xu, Z. and Liu, J. (2005) Expression of porcine lactoferrin by using

recombinant baculovirus in silkworm, *Bombyx mori* L., and its purification and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol.* **69**: 385~389.

Yamao, M., Katayama, N., Nakazawa, H., Yamakawa, M.,

Hayashi, Y., Hara, S., Kamei, K. and Mori, H. (1999) Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev.* **13**: 511~516.