

누에와 흰불나방 핵多角體病바이러스의 生化學的 特性

Biochemical Characteristics of the Nuclear Polyhedrosis Viruses of the Fall Webworm, *Hyphantria cunea*, and the Silkworm, *Bombyx mori*

金 賢 郁¹ · 朴 範 錫² · 陳 炳 來¹ · 任 大 準² · 姜 錫 權¹

Hyun Uk Kim¹, Beom Seok Park², Byung Rae Jin¹, Dae Joon Im², and Seok Kwon Kang¹

ABSTRACT The nuclear polyhedrosis viruses of *Bombyx mori* (BmNPV) and *Hyphantria cunea* (HcNPV) were characterized by electron microscopic observation, SDS-PAGE of polyhedral and virion proteins, and restriction endonuclease analysis of viral DNAs. Polyhedra of BmNPV were octadecahedral in shape with the diameter of 3 μm , whereas those of HcNPV showed irregular appearances having the diameter of 1.5~2 μm . Under alkaline protease inactivated condition, polyhedral proteins of two NPVs were resolved into a major polypeptide, 30~31 KD, and several minor polypeptides by SDS-PAGE. Examination of virion proteins by silver staining after SDS-PAGE showed that BmNPV was composed of 47 polypeptides with M.W. range of 9.6~112 KD and HcNPV was composed of 48 polypeptides with M.W. range of 9.4~111 KD. The approximate genome size of two NPVs were determined by restriction endonuclease analysis: BmNPV and HcNPV were 116.4 Kb and 114.6 Kb, respectively.

KEY WORDS silkworm, fall webworm, nuclear polyhedrosis virus, viral protein, nucleic acid

抄 錄 누에(*Bombyx mori*)와 흰불나방(*Hyphantria cunea*)으로 부터 分離된 핵多角體病바이러스(nuclear polyhedrosis virus: NPV)를 同定하기 위하여 電子顯微鏡 觀察한 結果, BmNPV 多角體의 크기는 3 μm 정도의 18面體로 外形이 均일하였으나, HcNPV는 1.5~2 μm 정도이며 不定形이었다. Alkaline protease를 不活化시킨 후 SDS-PAGE한 多角體 蛋白質의 分子量은 BmNPV가 30 KD, HcNPV는 31 KD인 major band와 이들의 重合體(polymer)로 생각되는 57 KD, 112 KD의 minor band들이 觀察되었다. 또한 virion 蛋白質을 SDS-PAGE한 후 銀染色한 結果, BmNPV는 分子量 9.6~112 KD인 47개의 band, HcNPV 경우는 分子量 9.4~111 KD인 48개의 band가 觀察되었다. BmNPV와 HcNPV DNA의 制限酵素 處理에 의한 電氣泳動 패턴을 觀察했으며, 각각의 genome 크기는 BmNPV가 約 116.4 Kb, HcNPV의 約 114.6 Kb였다.

檢 索 語 누에, 흰불나방, 핵多角體病바이러스, 바이러스蛋白質, 核酸

現在 많은 昆蟲에서 300~500 baculovirus들이 報告되어 있으며, 이 baculovirus에 속하는 핵多角體病바이러스는 宿主昆蟲에서는 強한 病原性을 보이거나 人畜에는 전혀 害가 없어, 微生物殺虫劑로 開發되어 이미 使用되고 있으며(Smith 1975, Miller 등 1983), 最近에는 特定遺傳子의 發現을 위한 바이러스 vector로 開發하는데 研究가 集中되고 있다(Smith 등 1983,

Pennock 등 1984, Maeda 등 1985).

그러나 이들 중에는 同一 바이러스에 의한 다른 種의 昆蟲에 交叉感染 또는 單一昆蟲에 여러 바이러스 變異種이 同時에 發生하는 경우가 있으며, 또 同一昆蟲에 發生하는 바이러스도 地域의인 差異를 보이고 있는 실정이다(Injac 등 1972, Vail 등 1973, Cherry & Summers 1985).

따라서 이들 바이러스의 産業的인 利用의 先行條件으로서 바이러스의 物理·生化學的인 特性 究明 및 同定은 必須的이기에, 본 實驗에서는 飼育體系가 確立된 누에와 흰불나방으로 부터 핵多角體病바이러스를 分離·精製하여 電子顯微

1 서울대학교 農科大學(College of Agriculture, Seoul National University)
2 農業技術研究所 昆蟲科(Department of Entomology, Agricultural Sciences Institute, RDA, Suwon. Korea)

鏡으로 觀察했으며, 또 多角體와 virion 蛋白質의 電氣泳動像 및 각 바이러스의 DNA를 抽出하여 制限酵素 處理 後 電氣泳動하여 그 패턴을 分析하였다.

材料 및 方法

供試 바이러스

供試 바이러스는 누에 核多角體病바이러스(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus: Bm NPV)와 흰불나방 核多角體病바이러스(*Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus: Hc NPV)를 각 宿主昆虫에 經口接種하여 增殖시킨 후 部分精製하여 -20°C 에 凍結保管하면서 實驗에 使用하였다.

多角體 및 비리온 精製

多角體 精製는 罹病死虫에 증류수를 가하여 磨碎 後, 二重거즈로 여과하여 3,000 rpm에서 5分間 遠心分離를 3~4回 反復하여 乳白色의 多角體 沈澱物을 얻었다. 이 沈澱物을 $10^{8\sim} \text{PIB/ml}$ 濃도가 되도록 0.01% SDS 溶液에 浮遊시키고 sonication 하여 40~65% sucrose density gradient를 作成, 24,000 rpm(Hitachi, SRP-28 SA)에서 30分間 遠心分離하여 多角體 band를 얻었다. 이 band를 採取하고 증류수로 희석한 후 3,000 rpm에서 遠心分離하여 多角體를 沈澱시켜 sucrose를 除去한 後 -20°C 에 保管하면서 實驗에 使用했다.

Virion 精製는 精製된 多角體를 알칼리 溶液(0.1M Na_2CO_3 , 0.01M EDTA, 0.17M NaCl, pH10.9)에 浮遊시켜 37°C , 30分間 處理한 후, 15,000 rpm에서 5分間 遠心分離하여 溶解되지 않는 沈澱物을 除去하고 上清液을 30~60% sucrose density gradient에 띄워서, 25,000 rpm(Hitachi, SRP-28SA)에 90分間 遠心分離하여 virion band를 얻었다. 이 band를 採取하여 증류수로 희석후 다시 25,000 rpm(Hitachi, T50-2)에 1時間 遠心分離하여 sucrose를 除去하고 virion 沈澱을 얻었다.

電子顯微鏡 觀察

精製된 多角體를 冷凍乾燥시킨 후, 金(gold)으로 coating하여 走査電子顯微鏡(Hitachi, S-570)으로 外形을 觀察하였다.

多角體의 內部構造觀察은 精製된 多角體를 phosphate buffer(pH7.2)로 調製한 6.25% glutaraldehyde 溶液에 浮遊시킨 後, 3,000 rpm에서 遠心分離하여 沈澱시킨 그대로 4°C 에서 4時間동안 1次固定하고, 그 沈澱物을 1 mm^3 크기로 잘라 1% osmium tetroxide에 2次固定하고 acetone series(30~100%)를 통하여 脫水한 後, Epon 812에 埋沒하였다. 그 試料를 ultramicrotome(Sorvall MP-5000)으로 切片을 作成하고, 2% uranyl acetate와 0.3% lead citrate로 二重染色하여 透過電子顯微鏡(JEOL, TEM-100(X))으로 觀察하였다.

多角體 및 비리온蛋白質의 電氣泳動

精製된 多角體의 alkaline protease를 不活化시키기 위하여 70°C 에서 2時間 加熱한 後(Wood 1980), 15,000 rpm에서 5分間 遠心分離하여 沈澱을 얻었다.

이 多角體 沈澱物을 알칼리 溶液(0.1M Na_2CO_3 , 0.17M NaCl, 0.01M EDTA, pH10.9)에 浮遊시켜 37°C 에서 15分間 溶解시킨 후(Summers & Smith 1978), 15,000 rpm에서 5分間 遠心分離하여 溶解되지 않은 多角體를 除去하고 다시 그 上清液을 25,000 rpm(Hitachi T50-2)에서 1時間 遠心分離하여 virion을 沈澱시켜 除去하고 多角體蛋白質溶液을 얻었다.

蛋白質 電氣泳動은 Laemmli(1970) 方法에 준하였는데, 多角體 蛋白質溶液에 2배 Laemmli 溶液(0.0625M Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.01% BPB)을 同量 混合하고 100°C 에서 15分間 加熱한 후, 12.5% polyacrylamide gel을 作成하여 電氣泳動하였고, Coomassie brilliant blue로 染色하였다.

Virion 蛋白質의 電氣泳動은 위에서 精製된 virion 沈澱을 上記와 같은 方法으로 電氣泳動한 後, gel의 染色은 銀染色(silver stain) 方法(Oakly 등 1980)으로 methanol과 acetic acid,

10% glutaraldehyde로 固定시키고, AgNO₃ 용액으로 染色하여 0.05% citric acid ml 당 37% formaldehyde 5 μ l를 添加한 용액으로 發色시켜 觀察하였다.

바이러스 核酸(DNA)의 制限酵素分析

多角體를 알칼리용액(pH10.9)에 10⁹PIB/ml 되도록 浮遊시켜 37°C에서 1時間 加熱하고, microcentrifuge 12,000 rpm에서 5分間 遠心分離하여 沈澱物을 除去한 後, 계속하여 SDS 1%, proteinase K 0.5 mg/ml 되도록 각각 添加하고 37°C에서 1時間 加熱하였다. 여기에 0.01M TE buffer(0.01M Tris-0.001M EDTA, pH7.5)로 飽화된 phenol을 2번 反復 處理하고, 다시 phenol 및 chloroform/isoamylalcohol(24/1) 處理를 각각 2번 反復하였다.

抽出된 DNA를 2% sodium bicarbonate, 1mM EDTA에 處理한 dialysis tube에 넣어 충분한 量의 0.1 \times SSC(1 \times SSC = 0.015M sodium citrate + 0.15M NaCl, pH7.5) 용액에서 40時間 이상 透析하였다. 最終 DNA 용액을 滅菌된 tube에 옮긴 후, 2배량의 冷 ethanol을 添加 混合하여 -20°C에서 2時間 이상 방치하고 12,000 rpm에서 5分間 遠心分離하여 DNA가 沈澱되었음을 確認한 후 ethanol을 乾燥시킨 다음 TE buffer에 浮遊시켜 UV spectrophotometer로 純度와 濃度를 確認하였다.

制限酵素處理는 100 μ g/ml 濃度の DNA 용액 18 μ l와 10 \times digestion buffer 2 μ l에 制限酵素(Bam HI, Hind III, EcoRI, Pst I, Sal I) 15~20 unit를 添加하고 37°C에서 2時間 이상 加熱한 후, mini-gel을 이용해서 digestion을 確認하고, stop buffer(0.1M EDTA, 50% glycerol, 0.5% BPB) 4 μ l를 添加하여 反應을 정지시켰다. 處理된 DNA는 60°C에서 15分間 加熱한 後 氷冷시켜 0.7% agarose gel에서 電氣泳動하였다.

結果 및 考察

電子顯微鏡 觀察

走査電子顯微鏡으로 觀察한 BmNPV의 多角

體는 四角形 6개와 六角形 12개로 이루어진 18面體로 外形이 均일하였으며 크기는 3 μ m 정도였다. HcNPV는 1.5~2 μ m 정도 크기로 外形이 매우 不規則하였다.

이미 報告된 NPV의 多角體 外形은 대부분 表面이 매우 不規則인 不定形이며, 크기는 1.5~2 μ m 정도로 報告(Adams 등 1982)되었음을 볼 때 HcNPV는 대체로 비슷한 結果를 보이거나 BmNPV는 그 外形과 크기에서 특이하다.

그림 1의 화살표(Δ)들이 보여주는 작은 구멍들은 Adams 등 (1982)의 報告에서와 같이 多角體가 感染細胞內에서 未完成된 狀態일때 分離되었거나, 分離過程 中에 表面에 가까이 위치했던 封入體의 離脫로 생긴 것으로 推測된다.

透過電子顯微鏡으로 多角體 內部를 觀察한 結果 HcNPV는 大略 44~55 nm \times 350~400 nm 크기의 nucleocapsid가 여러개씩(2~12개) 다발을 이루어 하나의 封入體를 形成하는 MNPV(multiply enveloped)였다.

또한 그림 2의 화살표가 지적하는 것은 그림 1의 작은 구멍과 一致되는 것으로 封入體가 미처 埋入되지 않았거나 離脫된 듯한 痕跡이 뚜렷하였다.

多角體 및 비리온蛋白質의 電氣泳動像

多角體 浮遊液을 70°C에서 2時間 加熱하여 宿主昆蟲 由來의 alkaline protease(Wood 1980)을 不活化시킨 다음 알칼리용액(pH10.9)에 溶解시킨 多角體 蛋白質을 SDS-PAGE한 結果, BmNPV는 分子量 30 KD, HcNPV는 31 KD인 單一 major band와 이들의 重合體(polymer)로 생각되는 57 KD, 112 KD의 minor band들이 觀察되었다.

이러한 結果는 Summers 등(1978)이 6種의 NPV를 SDS-PAGE 分析하여 多角體蛋白質은 分子量이 27~31 KD인 單一 subunit이며, 分子量이 이것 보다 큰 것들은 單一 subunit의 重合體라는 報告와 유사하다.

純粹精製된 virion 蛋白質을 SDS-PAGE한 後 銀染色(silver stain)한 結果 BmNPV virion 蛋白質은 分子量 9.6~112 KD인 47개의 band, HcNPV의 경우는 分子量 9.4~111 KD인 48개

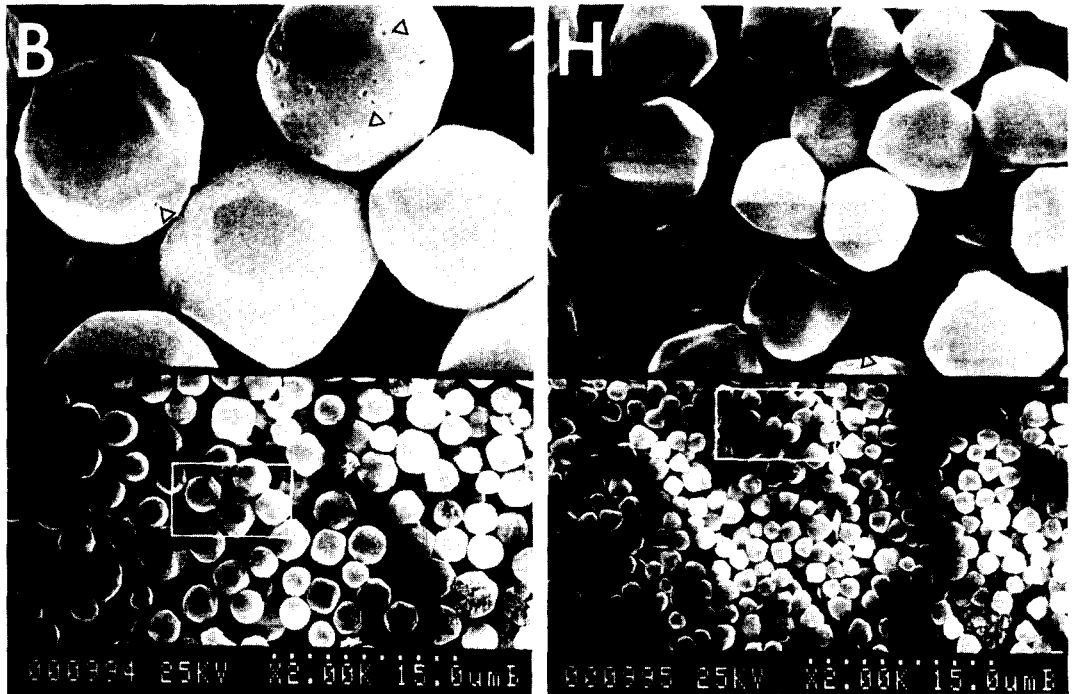


Fig. 1. Scanning electron micrographs of BmNPV(B), HcNPV(H) polyhedra. Arrows indicate pitted surfaces.



Fig. 2. Transmission electron micrographs of HcNPV polyhedra. Arrows indicate pitted surfaces.

의 band가 관찰되었다.

Virion 단백질의 SDS-PAGE 분석은 NPV의 분류·동정의 수단으로 사용되어, Summers와 Smith(1978)는 6종의 NPV 구조 단백질을 전기泳動 분석·比較하여 분자량 15~160 KD의 15~25개 band를 관찰하였고, Harrap 등(1977)은 같은 Spodoptera 屬인 宿主昆蟲으로 부터 分離

한 3종의 NPV 경우 분자량 10~107 KD의 11~13개 band를 관찰하였고, 바이러스에 따라 그량과 질에서 差異를 보여 이들을 分類할 수 있었다고 報告하였다.

本實驗에서는 분자량이 9.4~114 KD 범위로 Harrap 등(1977)의 報告와 유사하나, band數에서 이들 보다 많은 것은 銀染色을 통하여 일반적인 Coomassie brilliant blue 染色으로는 볼 수 없었던 多數의 minor band들을 確認할 수 있었기 때문이라 생각된다.

바이러스 核酸(DNA)의 制限酵素 分析

制限酵素 Bam HI, EcoRI, Hind III, Pst I 및 Sal I을 사용하여 virus DNA를 分析한 結果, Hind III로 處理된 BmNPV DNA는 17개의 fragment와 2개의 submolar fragment가, HcNPV DNA는 26개의 fragment와 4개의 submolar fragment가 있었으며, Pst I으로 處理된 BmNPV DNA는 18개의 fragment와 2개의 submolar fragment가, HcNPV DNA는 20개의

Table 1. Molecular weights of virion polypeptides of *Bombyx mori* and *Hyphantria cunea*

M.W.* of virion polypeptides (KD)								
No.	BmNPV	HcNPV	No.	BmNPV	HcNPV	No.	BmNPV	HcNPV
1	112	111	17	36	44	33	21	19
2	78.5	106	18	34.5	42	34	20	18
3	77	88.5	19	34	41	35	19.5	16.5
4	71	83	20	33	37.5	36	18.5	16
5	69	77	21	32.5	37	37	77	15
6	65	74	22	31	34.5	38	16	14
7	61	71	23	30	33	39	15	13.5
8	54	69	24	29	31	40	14	13
9	48	63	25	27.5	30	41	13	12.8
10	44	60	26	26.5	28	42	12.3	12.3
11	42	59	27	26	27	43	11.7	11.6
12	41.5	57	28	25	26	44	11.1	11.3
13	40	52	29	24	25	45	10.9	10.9
14	39	48	30	23	24	46	10	10.4
15	38	47.5	31	22.5	22	47	9.6	9.8
16	37	45	32	21.5	20	48		9.4

*Molecular weights were calculated By Weber and Osborn method(1969).

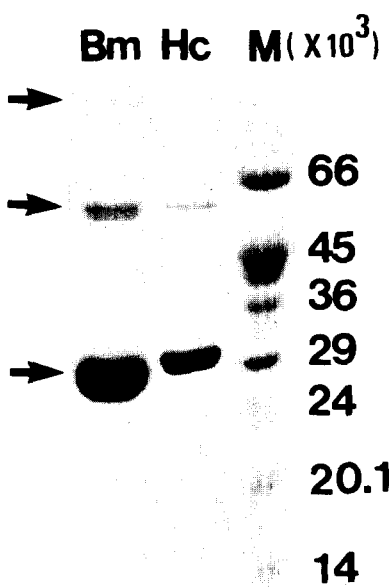


Fig. 3. SDS-PAGE of polyhedral proteins under alkaline protease inactivation condition(Bm: BmNPV, Hc: HcNPV, M: Molecular weight standards).

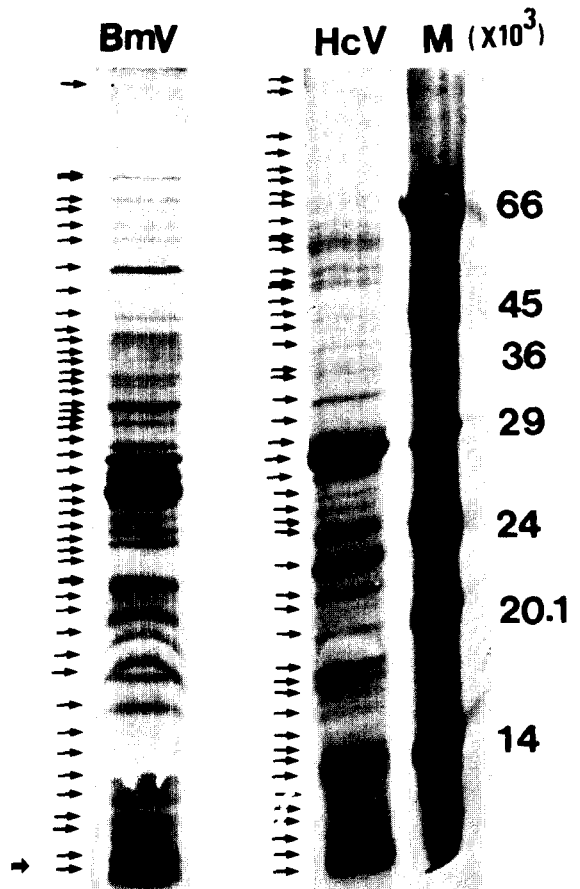


Fig. 4. SDS-PAGE of virion polypeptides stained with silver nitrate(BmV: BmNPV virion, HcV: HcNPV virion, M: Molecular weight standards).

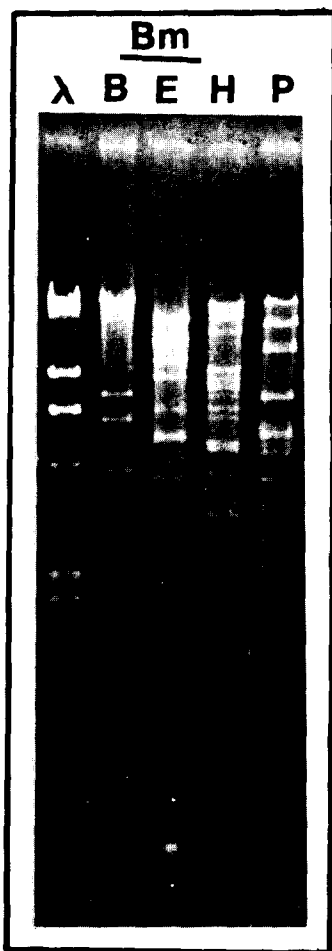


Fig. 5. Cleavages of BmNPV DNA digested with various restriction endonucleases (B: BamHI, E: EcoRI, H: HindIII, P: PstI). Lambda DNA(λ) restricted with HindIII served as standard.

fragment와 2개의 submolar fragment가 있었다.

制限酵素處理에 의한 NPV들에 대한 DNA

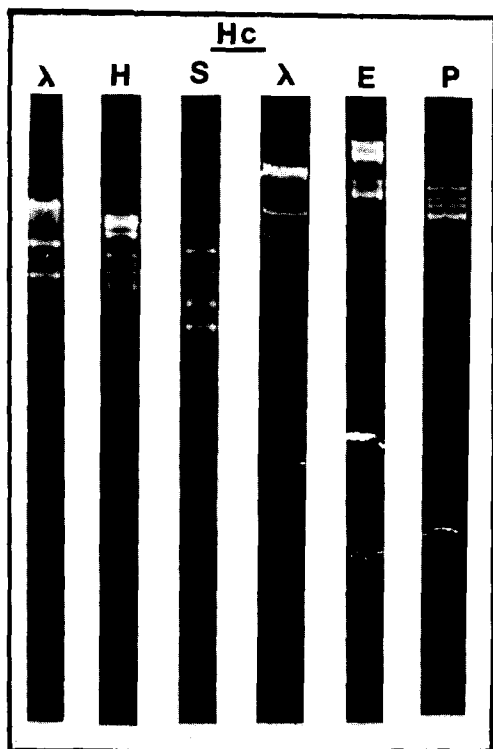


Fig. 6. Cleavages of HcNPV DNA digested with various restriction endonucleases (H: HindIII, S: SalI, E: EcoRI, P: PstI). Lambda DNA(λ) restricted with HindIII served as standard.

分析은 Rohrman 等(1978), Smith 等(1978)들에 의해 遂行되어 分類뿐만 아니라 生態的, 進化的 聯關性 研究와 바이러스 genome의 大略的인 크기를 決定하는데 利用되고 있다.

이미 地域적으로 다른 곳에서 同一한 宿主昆虫에 發生하는 NPV들이 制限酵素로 分析되어, 이들은 매우 類似성이 많아, 한두개 DNA fra-

Table 2. Fragment analysis of BmNPV and HcNPV DNA with restriction endonucleases

NPV	REN	No. of fragments	*Size range(Kb)	Genome size(Kb)	No. of submolar fragments
BmNPV	Hind III	16	1.7~22.0	122.7	1
	Pst I	16	1.0~23.1	114.0	2
HcNPV	Hind III	20	1.2~15.5	109.4	6
	Pst I	18	1.5~23.1	117.2	2
	Sal I	28	1.2~11.7	117.1	3

* The size of fragments was determined from scans of agarose gels following the procedure of Southern (1979).

gment에서 deletion, insertion 또는 sequence change 등에 의한 差異만을 볼 수 있으며, 單一 NPV 感染으로 부터 由來된 extracellular virus와 多角體內的 바이러스는 遺傳의으로 差異를 보이지 않았으나, 同一宿主인 SNPV와 MNPV는 多少間 差異를 보이고 있다. 또한 모든 報告에서 野外分離(wild isolated)된 NPV들은 모두 여러개 變異(variant)들의 混合體임이 報告되어 있으며, 원래 것과 다른 宿主에서 增殖된 後에도 바이러스 核酸에 變化가 없음이 制限酵素 分析 結果로 報告되었다(Lee 등 1978).

本 實驗의 경우 宿主昆蟲이 다른 Bm과 Hc-NPV DNA의 制限酵素 分析 結果를 比較할 때 두 NPV 간에는 遺傳的 類似性이 거의 없다는 結論을 얻을 수 있으며, 몇개의 制限酵素 패턴에서 보이는 submolar fragment들은 變異(variant)들이 混合되어 있다는 證據로 볼 수 있다. 또한 Knell 등(1981), Vlasko 등(1981) 및 Stiles 등(1983)의 報告를 參酌할 때, 이 分野研究의 進展을 위하여 앞으로 培養細胞系를 利用하여 遺傳的으로 完全히 同一한 바이러스를 純化(purification)해야 하는 課題가 남아있다.

謝 辭

이 研究는 韓國科學財團의 基礎研究支援費에 의하여 遂行되었음.

引 用 文 獻

- Adams, J.K. & T.A. Wilcox. 1982. Scanning electron microscopical comparisons of insect virus occlusion bodies prepared by several techniques. *J. Invertebr. Pathol.* 40 : 12~20.
- Brown, S.E., J.E. Maruniak & D.L. Knudson. 1985. Baculovirus (MNPV) genomic variants: Characterization of *Spodoptera exempta* MNPV DNAs and comparison with other *Autographa californica* MNPV DNAs. *J. Gen. Virol.* 66 : 2431~2441.
- Cherry, C.L. & M.D. Summers. 1985. Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* 46 : 289~295.
- Injac, M., C. Vago & M. Tadic. 1971. Affinate de la polyhedrose nucléaire de *Hyphantria cunea* DRURY vis-a-vis de *Spilosoma menthastris* ESP. *Lepidoptera: Arctiidae. Entomophaga.* 16 : 233~272.
- Jurkovicova, M., J.H. Van Touw, J.S. Sussenbach & J. ter Schegget. 1979. Characterization of the nuclear polyhedrosis virus DNA of *Adoxophyes orana* and of *Barathra brassicae*. *Virology.* 93 : 8~19.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227 : 680~685.
- Lee, H.H. & L.K. Miller. 1978. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 27 : 754~767.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Sato & M. Furusawa. 1985. Production of human-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature.* 315 : 592~594.
- Merril, C.R., Goldman, D. & Van Keuren, M.L. 1983. *Meth. Enzymol.* 96 : 230.
- Miller, L.K., A.J. Lingg & L.A. Bulla. 1983. Bacterial, viral, and fungal insecticides. *Science.* 219 : 715~721.
- Pennock, G.D., C. Shoemaker & L.K. Miller. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* B-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 399~406.
- Pritchett, D.W., S.Y. Toung & W.C. Yearian. 1982. Dissolution of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra by the digestive fluid of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 39 : 354~361.
- Rohrmann, G.F., R.H. McParland, M.E. Martignoni & G.S. Beaudreau. 1978. Genetic relatedness of two nucleopolyhedrosis viruses pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *Virology.* 84 : 213~217.
- Smith, R.F. 1975. Why are baculoviruses necessary for plant production? pp. 6~8. In Summers, M., Engler, R., Falcon, L.A. & Vail, P.V. (eds.) *Baculoviruses for Insect Pest Control: Safety Considerations.* American Society for Microbiology, Bethesda Maryland.
- Smith, G.E. & M.D. Summers. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology.* 89 : 517~527.
- Smith, G.E., M.D. Summers & M.J. Fraser. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 2156~2165.
- Summers, M.D. & G.E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. *Virology.* 84 : 390~402.
- Vail, P.V., D.L. Jay & D.K. Hunter. 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper, *Autographa californica*, after passage through alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.*

- ol. 21 : 16~20.
- Valk, J.M., K.V. Frankenhuyzen, D. Peters & A. Groner. 1981. Identification of a new nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* 38 : 297~298.
- Wood, H.A. 1980. Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus proteins. *Virology.* 103 : 392~399.
(1989년 1월 9일 접수)