

배추흰나비 夥粒病바이러스蛋白質의 生化學的 特性

Biochemical Characteristics of the Granulosis Viruses Proteins of Common Cabbage Worm, *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*

柳江善¹·陳炳來²·姜錫權²

Kang Sun Ryu¹, Byung Rae Jin², and Seok Kwon Kang²

ABSTRACT This study was carried out to acquire some basic biochemical informations on the granulosis virus(GV) of *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*. The capsule protein was composed of a single polypeptide with a molecular weight of 30,000 dalton for *P. rapae* GV and 31,000 dalton for *P. brassicae* GV. The major amino acids of capsule protein were glutamic acid, aspartic acid and lysine. When the capsule protein was partially digested with trypsin, chymotrypsin, papain or *Staphylococcus aureus* V8 protease, the digested products of the two viruses showed no difference in electrophoretic mobility. The patterns of the polypeptides of the two virus particle on SDS-polyacrylamide gel showed a little difference in high molecular weight region(over MW 100 kd).

KEY WORDS *Pieris rapae*, *Pieris brassicae*, granulosis virus, capsule protein, virus particle

초 록 배추흰나비 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV에 대한 봉입체 및 바이러스단백질의 물리화학적 성상을 비교 분석한 결과 電氣泳動法에 의한 封入體蛋白質은 그 분자량이 *P. rapae* GV는 30 kd, *P. brassicae* GV는 31 kd의 단일단백질이였으며, trypsin, chymotrypsin, papain 및 *Staphylococcus aureus* V8 protease에 의한 peptide mapping에서는 두 바이러스 간에 큰 차이가 없었다. 바이러스입자단백질의 전기영동법에 의한 분석결과, 두 바이러스에서 각각 4개의 band가 나타났으며 고분자량 부분에서 *P. rapae* GV의 경우는 115, 110, 105 및 103 kd의 4개 band인데 반해 *P. brassicae* GV는 107 kd의 한 band만 관찰되었다. 그리고 封入體蛋白質의 아미노산 분석비교에서 두 바이러스 간의 큰 차이는 없었으며 일반적으로 곤충에 많이 존재하는 산성아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid의 함량이 많았고 염기성 아미노산에서 lysine의 함량이 특히 많았으며 封入體蛋白質의 免疫學的인 試驗결과에서는 *P. rapae* GV 항혈청에 대해 두 바이러스는 공통 침강선을 형성하였다.

검 색 어 배추흰나비, 과립병바이러스, 봉입체단백질, 바이러스입자

Baculovirus subgroup B에 속하는 GV는 두 가닥의 DNA바이러스로 약 70여종의 나비목곤충에서 분리되었으며, NPV와 마찬가지로 숙주 특이성이 높고 봉입체를 형성하는 특이한 구조

를 하고 있어 미생물살충제로 개발되고 있다. 배추흰나비 GV의 封入體 및 바이러스 입자의 물리化學的 특성에 관해서 많은 연구가 보고되어 있다. 봉입체단백질은 바이러스입자를 포매하고 분자량이 30 kd(Crook 1981), 또는 28 kd의 단일band (Brown 등 1977, Tweeten 등 1980b)라고 보고되었으며, 封入體蛋白質의 아

1 농촌진흥청 잠업시험장(Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon Korea, 441-100)

2 서울대학교 농과대학(College of Agriculture, Seoul National University, Suwon Korea, 441-744)

미노산 조성에서 산성아미노산인 glutamic acid와 aspartic acid는 전함량의 24%로서 특히 많았다고 보고하였다(Longworth 등 1972, Im 등 1986).

바이러스입자 단백질의 경우 Crook(1981)는 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV 두 바이러스 모두 9개의 major band와 10개의 minor band로構成되고, 가장 큰 major band에서 *P. rapae* GV(MW 98 kd)가 *P. brassicae* GV(MW 96 kd)보다 2 kd 크게 나타나고, 반면 minor band에서 *P. rapae* GV(MW 77 kd)가, *P. brassicae* GV(MW 79 kd)보다 2 kd작다고 보고하였으며, Brown 등(1977)은 *P. brassicae* GV의 경우 분자량이 12~93 kd인 12개의 band로 분리된다고 보고하였다.

바이러스단백질의 전기영동상에 의한 바이러스 동정이 많이 시도되어 왔다. Smith와 Summers(1978)는 8종의 곤충에서 분리한 GV와 핵다각체병바이러스(이하 NPV로 略함)의 구조단백질을, Monroe와 McCarthy(1984)는 4종의 곤충으로부터 분리된 GV와 NPV를 비교분석하여 이들의 동정을 시도했다.

본 연구에서는 한국에 주로 분포하고 있는 *P. rapae* GV의 封入體蛋白質과 비리온蛋白質 특성등을 구명하여 微生物農藥開發의 기초자료로 활용할 수 있는 일련의 결과를 얻었다.

재료 및 방법

封入體蛋白質의 전기영동

封入體蛋白質은 정제된 封入體를 70°C에 2시간 가온한 후 12,000 rpm에서 40분간 원심하여 침전물을 0.1M Na₂CO₃, 0.01M EDTA, 0.17M NaCl(pH10.9)용액으로 浮遊시켜 37°C에서 30분간 가온하고 55,000 rpm에서 1시간 초원심하여 바이러스입자와 녹지않은 封入體를 沈澱 제거하고 上澄液을 취하여 封入體단백질의 전기영동시료로 사용하였고, 바이러스입자 단백질은 정제된 바이러스입자를 시료로 사용하였다.

전기영동은 Laemmli방법(1970)에 따라서 준비된 각시료에 sample buffer(0.0625M Tris-HCl(pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercapto ethanol, 0.001% bromophenol blue)를 첨가하고, 100°C에서 5분간 가열한 후 냉각시켜 시료로 사용하였다. 농축 gel은 acrylamide 2.5%, 분리 gel은 acrylamide 12.5%로 만들어 well당 2 μl의 시료를 넣어 농축 gel중에서는 20 mA, 분리 gel에서는 30 mA의 전류를 공급하면서 4°C에서 5시간 전기영동하였다. 봉입체단백질은 영동이 끝난 gel을 염색액(acetic acid : methanol : 증류수 = 10 : 40 : 50 ; 0.1% Coomassie brilliant blue)에서 2시간 염색한 후 脫色液(acetic acid : methanol : 증류수 = 10 : 40 : 50)으로 gel 배경이 깨끗해질 때까지 脫色하였다. 한편 바이러스입자단백질은 전기영동 후 gel을 non-kit 은염색방법(Oaklay 등 1980, Merril 등 1983)으로 methanol과 acetic acid, 10% glutaraldehyde로 고정시키고, AgNO₃용액으로 10분간 염색하여 현상액(0.05% citric acid 1 ml당 37% formaldehyde 5 μl 첨가)에서 반응시킨 후 3차증류수로 반응을 정지시켜 바이러스입자 단백질 band를 확인하였다.

봉입체단백질의 peptide mapping

封入體蛋白質의 peptide mapping은 Cleveland 등(1977)의 방법에 따라 Laemmli용액에 용해되어 있는 *P. rapae* 및 *P. brassicae* GV 封入體蛋白質에 trypsin, chymotrypsin, papain 및 *Staphylococcus aureus* V8 protease(sigma 製品)를 각각 10 μg/10 μl되게 첨가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 후 100°C에서 3분간 가열하여 반응을 정지시킨 다음 12.5% gel에서 SDS-PAGE를 행하였다.

봉입체단백질의 아미노산분석

Alkaline proteinase활성을 억제하기 위해 정제된 封入體 浮遊液을 70°C에 2시간 가온한 후 12,000 rpm에서 40분간 원심하여 알칼리용

액(0.1M Na_2CO_3 , 0.01M EDTA, 0.17M NaCl, pH10.9)으로 고농도 부유액을 만들어 37°C, 30분간 가온, 단백질을 용해시켜 55,000 rpm에서 1시간 초원심하여 上澄液을 6N HCl로 가수분해하여 아미노산분석기(Hitachi-880)로 아미노산을 분석하여 mole%로 산출하였다.

과립병바이러스 봉입체단백질의 抗血清調製 및 면역확산

정제된 *P. rapae* 封入體를 1 mg/ml 되게 하여 같은량의 freund's complete adjuvant와 충분히 혼합하여 Newzealand white 수토끼에 1 ml씩 1주일 간격으로 4회 皮下注射하고 5주째에 全採血하였다. 全採血한 혈액은 상온에서 2시간 방치후 5°C에서 하룻밤 냉장보관하여 上淸의 혈청을 분리, 56°C에 30분간 처리한 후 10% NaN_3 를 血清量의 최종농도 0.1%되게 넣고 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 上淸을 취하여 -20°C이하에 보관 사용하였다. 免疫擴散은 Ouchterlony(1968)의 방법에 준하여 실시하였으며, 이때 agarose gel은 0.014M veronal-acetate 완충액으로 1.2%의 농도를 사용하였다.

결과 및 고찰

정제된 봉입체를 알칼리용액에 용해 시킨 후 원심분리하여 그 상등액을 전기영동한 결과, *P. rapae* GV의 봉입체단백질은 분자량이 30 kd이고 *P. brassicae* GV의 경우는 31 kd으로 *P. rapae* GV에서보다 *P. brassicae* GV에서가 분자량이 크게 나타났으며, 두 바이러스의 封入體蛋白質은 단일단백질로 구성되어 있으며 minor band는 전혀 보이지 않았다(그림 1).

Crook(1981)에 의하면 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV의 封入體蛋白質은 단일band로 분자량이 30 kd로 거의 유사하다고 보고하였으며, Brown 등(1977)은 *P. brassicae* GV의 封入體蛋白質의 분자량은 28 kd이고, 4개의 minor band를, Tweenten 등(1980b)은 *P. interpunctella* GV의 경우 28 kd로 각각 보고하였다. 이들

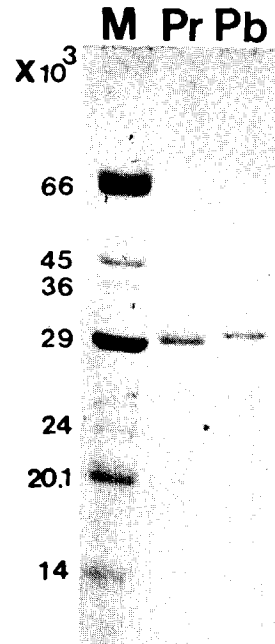


Fig. 1. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV granulins. Standard protein markers were bovine albumin(66 kd), egg albumin(45 kd), G-3-P dehydrogenase(36 kd), carbonic anhydrase(29 kd), trypsinogen(24 kd), trypsin inhibitor(20.1 kd) and α -lactalbumin(14 kd).

minor band는 封入體蛋白質이라 하기보다는 封入體蛋白質의 용해시 함께 용해된 바이러스 입자 단백질이라고 推察되었다. 封入體蛋白質의 분자량에서 본 실험과 약간의 차이는 인정되었으나 이는 숙주를 *P. rapae*로만 사용하였기 때문이라 생각된다.

봉입체단백질에 trypsin, chymotrypsin, papain 그리고 *Staphylococcus aureus* V8 protease를 처리하여 봉입체단백질의 peptide mapping을 행한 결과 chymotrypsin의 경우 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV간에 분해정도에서 다소 차이가 인정될 뿐 나머지 protease에 의한 봉입체단백질의 분해 pattern에서는 차이가 없어, 이들 봉입체단백질간에는 상동성이 매우 높은 것으로 나타났다(그림 2).

바이러스입자 단백질을 SDS-PAGE하여 염색한 결과 *P. rapae* GV의 경우 42개의 band

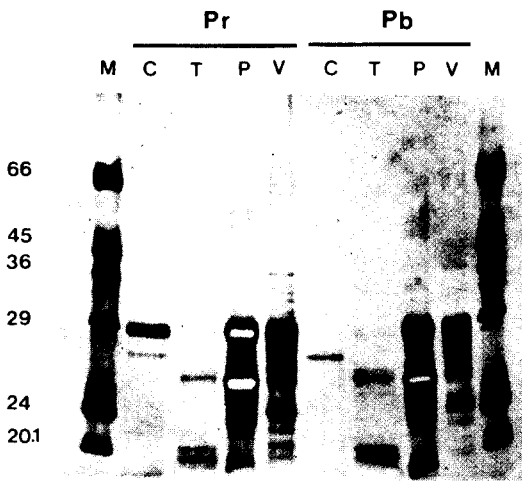


Fig. 2. Peptide mapping of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV granulin digested with chymotrypsin(C), trypsin(T), papain(P), and *Staphylococcus aureus* V8 protease (V). The standard proteins are the same as in the Fig. 1.

가 17~115 kd의 분자량 범위에서 *P. brassicae* GV의 경우도 같은수의 band가 17~107 kd의 분자량 범위에서 관찰되었다(그림 3). 분자량 100 kd 이상에서 *P. rapae* GV의 경우는 115, 110, 105 및 103의 4개 band인데 반해 *P. brassicae*는 107 kd의 한 band만 관찰되어 고분자량 부분에서 차이가 많이 나타났다(표 1).

Brown 등(1977)은 *P. brassicae* GV의 바이러스 입자 단백질을 SDS-PAGE한후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 결과, 분자량이 12~93 kd인 12개 band로 분리된다고 하였으며, Crook(1981)는 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV의 바이러스입자단백질 SDS-PAGE 결과 두 바이러스 모두 9개의 major band와 10개의 minor band로 구성되어 있으며, 가장 큰 major band에서 *P. rapae* GV(MW 98 kd)가 *P. brassicae* GV(MW 96 kd)보다 2 kd 정도 크게 나타나고, 반면 minor band의 경우는 *P. rapae* GV(MW 77 kd)가 *P. brassicae* GV(MW 79 kd)

Table 1. Molecular weights(kd) of virion polypeptides of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) granulosus viruses

No.	PrGV	PbGV	No.	PrGV	PbGV
1	115	107	22	41.5	39
2	110	95	23	39	37
3	105	93	24	38	35
4	103	84	25	36	33
5	99	83	26	35	32
6	93	78	27	34	30.5
7	87	75	28	33	27
8	84	69	29	30.5	26.5
9	83	67	30	30	26
10	77	63	31	27	25.5
11	75	61	31	26	25.2
12	70	59	33	25.4	25
13	67	57	34	25.2	24.5
14	62.5	55	35	24.5	24
15	59.5	52	36	24	22
16	56	50	37	22	21
17	54	48	38	21	20
18	51	45	39	19	19
19	49	43	40	18.7	18.3
20	47	42	41	17.3	18
21	43	40	42	17	17

* Molecular weights were caculated by Weber and Osborn's method(1969).

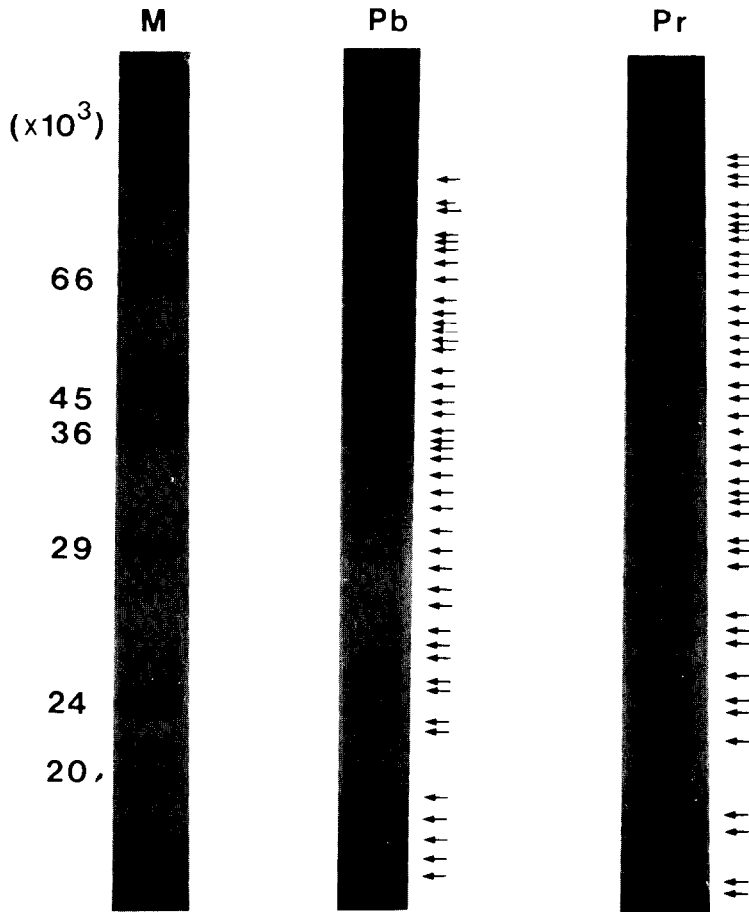


Fig. 3. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of *P. rapae* (Pr) and *P. brassicae* (Pb) GV virus particle polypeptides. The standard proteins are the same in the Fig. 1.

보다 2 kd 작다고 보고하였다.

바이러스단백질의 電氣泳動像을 이용한 바이러스의 同定이 많이 시도되어 왔다. Smith와 Summer(1978)는 2개의 GV와 6개의 NPV 구조단백질을 전기영동하여 비교분석하고 분자량 15~160kd의 band 15~25개를 관찰하였고, 바이러스에 따라서 그 양과 질에서 차이를 보인다고 하였으며, Monroe와 McCarthy(1984)는 4종의 곤충으로부터 분리된 GV와 NPV를 비교한 결과 바이러스입자의 경우는 약간의 차이가 있으나, nucleocapsid는 동일한 band패턴을 보인다고 하였으며, 또한 Crook(1981)도 *P.*

*rapae*와 *P. brassicae* GV에서 봉입체단백질은 거의 동일하고 바이러스입자단백질은 약간의 차이를 보이며 nucleocapsid는 동일한 band pattern을 보인다고 하였다. 본 실험에서는 Crook(1981)의 보고와 비슷한 결과로 바이러스입자단백질의 경우에서도 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV간의 큰 차이는 인정되지 않았으며 적은 차이는 acrylamide의 농도와 공시 시료량의 차이에 의해 유도된 결과로 생각된다.

封入體蛋白質의 아미노산 분석결과(표 2)는 *P. rapae* 및 *P. brassicae* GV에서 모두 aspartic acid, glutamic acid, lysine의 함량이 많았으며,

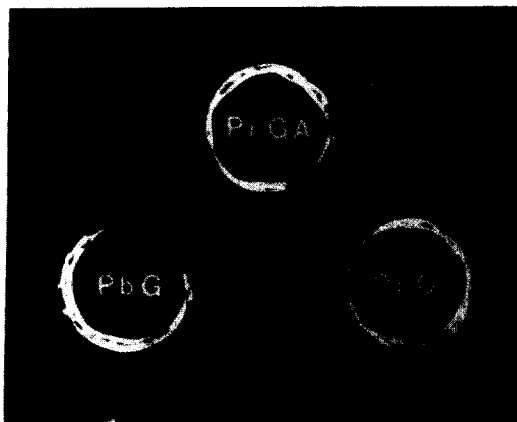


Fig. 4. Immunodiffusion of dissolved capsules of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV against antisera (PrGV) to *P. rapae* granulosis virus capsules.

Table 2. Amino acid compositions(mole%) of granulin of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) granulosis viruses

Amino acid	Pr GV	Pb GV
Cystine	Trace	Trace
Methionine	Trace	Trace
Aspartic acid	11.55	10.12
Threonine	5.96	5.96
Serine	4.56	4.75
Glutamic acid	14.54	12.40
Proline	Trace	Trace
Glycine	3.78	3.63
Alanine	4.25	3.44
Valine	5.46	5.80
Isoleucine	5.08	4.97
Leucine	7.94	7.46
Tyrosine	4.34	Trace
Phenylalanine	5.90	6.78
Lysine	14.65	26.13
Histidine	Trace	Trace
Arginine	7.14	7.12

특히 lysine의 함량은 *P. brassicae* GV에서 매우 높아 *P. rapae* GV에서 보다 거의 2배 가까이 많았고, tyrosine은 *P. rapae* GV에서 4.3mole% 인데 반해 *P. brassicae*는 흔적만을 나타내어 두 아미노산의 함량에서 큰 차이를 나타냈다.

Longworth 등(1972)은 *P. brassicae* GV의 封人體蛋白質을 아미노산 분석한 결과, aspartic

acid와 glutamic acid의 량이 많았던 반면 본 실험 결과에서는 이들 외에 lysine 함량이 높게 나타났다. proline, histidine, cystine 및 methionine은 흔적만 나타났으며, 酸性인 glutamic acid와 aspartic acid량이 20% 이상을 차지하여 비교적 많았고, 중성 및 염기성에서는 lysine의 함량이 특히 높게 나타났다.

P. rapae GV封人體의 抗體를 使用하여 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV 封人體단백질 2중免疫擴散法(Ochterlony 1982)에 의한 항원항체반응 결과 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV 모두 침강선을 형성하였으며, *P. rapae* GV 항원에서 뚜렷하였다(그림 4). 이것은 Crook(1981)의 *P. brassicae* 유충에서 증식된 *P. rapae* GV와 *P. brassicae* GV간 2重免疫擴散試驗結果와 거의 일치하는 것으로서 공통 antigenic determinant의 존재로 생각되어진다.

인용 문헌

Brown, D.A., H.M. Bud & D.C. Kelly. 1977. Biophysical properties of the structural components of a granulosis virus isolated from the cabbage white butterfly(*Pieris brassicae*). *Virology* 81 : 317~327.

Cleveland, D.W., S.G. Marc, M.W. Kirschner & U.K. Laemmli. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252 : 1102~1106.

Crook, N.E. 1981. A comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*. *Virology* 115 : 173~181.

Im, D.J., B.M. Shepard & R.M. Aguda. 1986. Amino acid of the granulosis virus of rice brown semilooper, *Mocis frugalis*(Fab). *Korean J. Pl. Prot.* 25 : 191~192.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680~685.

Longworth, J.F., J.S. Robertson & C.C. Payne. 1972. The purification and properties of inclusion body protein of the granulosis virus of *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* 19 : 42~50.

Merrill, C.R., D. Goldman & M.L. Van Keuren. 1983. Silver staining methods for polyacrylamide gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 96 : 230~

- 239.
- Monroe, J.E. & W.J. McCarthy. 1984. Polypeptide analysis of genotypic variants of occluded *Heliothis* spp. baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.* 43 : 32~40.
- Oakley, B.R., D.R. Kirsch & N.R. Morris. 1980. A simplified ultrasensitive silver staining for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Ann. Biochem.* 105 : 361~363.
- Ouchterony, ö. 1968. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Ann. Arbor Science Pub. Inc. Michigan.
- Smith, G.E. & M.D. Summers. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* 89 : 517~527.
- Tweenten, K.A., L.A. Jr. Bulla & R.A. Consigil. 1980b. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsids. *J. Virol.* 33 : 866~876.
- (1991년 3월 30일 접수)