

家蠶 培養細胞에서 核多角體病 바이러스의 多角體 蛋白質 合成과 DNA複製

陳炳來 · 朴範錫* · 柳江善** · 諸連鎬 · 姜錫權

서울대학교 農科大學. *農業技術研究所 昆蟲科. **蠶業試驗場 育蠶科

Polyhedral Protein Synthesis and DNA Replication of *Bombyx mori*, Nuclear Polyhedrosis Virus in a *B. mori* Cell Line

Byung Rae Jin, Beom Seok Park*, Kang Sun Ryu**, Yeon Ho Je and Seok Kwon Kang

College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

*Entomology Division, Agricultural Sciences Institute, R. D. A., Suwon, Korea

**Sericultural Experiment Station, R. D. A., Suwon, Korea

Summary

Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) was successfully multiplied in the nuclei of BmN4 cells cultured with insect Grace's medium. By electron microscopic observation, the virions had a single nucleocapsid in an envelope. Polyhedral protein synthesis of BmNPV in BmN4 cells was detected at 18 hr p.i. and polyhedral protein was a single-polypeptide with a M.W of 30 kd. At 48 hr p.i. polyhedra formation was observed by inverted microscope and electron microscope. Genome analysis of BmNPV by restriction endonucleases was not revealed the difference between virus produced *in vivo* and that *in vitro*.

緒 論

家蠶 核多角體病 바이러스(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus : BmNPV)는 分子量 2.2×10^6 Da 의 복쇄 DNA를 갖고 있으며 이 복쇄 DNA는 capsid protein에 둘러싸여 280×40 nm 크기의 봉상 nucleocapsid를 이루고 이들이 격자구조를 갖는 다각체 단백질에 매립되어 $0.5 \sim 15 \mu\text{m}$ 크기의 다각체를 형성하고 있다(僕坂 등 1972).

한편 증식조직에 따라 특히 精巢皮膜과 같은데서는 multiple NPV(MNPV)가 주로 형성되기도 하나 주된 증식조직인 眞皮細胞, 氣管皮膜 및 脂肪組織에서는 주로 single NPV(SNPV)가 형성되어(渡部, 1975) BmNPV는 SNPV의 대표적인 바이러스로 알려져 있

다(Matthews, 1982).

최근에는 BmNPV genome의 physical map이 작성되었으며(Maeda & Majima, 1990), 다각체 단백질 유전자의 구조분석과 더불어 이 유전자의 promoter를 이용한 발현 vector개발(Maeda *et al.*, 1985)에 관한 연구가 수행되고 있다. 한편, Baculovirus의 증식기구와 유전자 발현기작에 관한 분자유전학적인 연구를 위해서, 확립된 누에 배양세포주(Grace, 1967 ; Quiot, 1982 ; Inoue & Mitsuhashi, 1984, 1988)를 이용한 연구가 수행되고 있다.

따라서 본 연구는 바이러스 증식과 새로운 외래유전자 발현 vector 개발을 위한 기초연구로서 Bm 배양세포주에서 BmNPV의 다각체 단백질 합성을 관찰하고, Non-occluded virus(NOV) 상태 및 DNA로

transfection하여 형성된 virus의 DNA와 Wild type BmNPV DNA의 제한효소 분석을 통해 *in vivo*, *in vitro*에서 형성된 virus의 DNA패턴을 비교하였다.

材料 및 方法

바이러스 및 배양세포주

바이러스는 국내에서 분리되어 서울대학교 농과대학 곤충병리학 실험실에서 계대 보존되고 있는 BmNPV를 공시하였으며, 누에는 동방유량(주)의 누에 인공사료로 사육하면서 바이러스를 생체 증식하였다.

Bm 배양세포주(BmN4)는 일본 잠사곤충 농업기술 연구소의 井上박사로부터 분양받아 Summers & Smith(1987)의 방법에 따라 10% fetal bovine serum (Sigma Co.)이 함유된 insect Grace's medium으로 27°C 항온기에서 계대 배양하였다.

배양세포주에 바이러스 감염

바이러스 감염은 정제된 BmNPV를 알칼리용액(pH 10.9)에 용해시킨 후 0.45 µm membrane filter로 여과한 virion 용액을 사용하여 monolayer가 형성된 배양세포에 1시간 동안 접종한 후, medium을 교체하여 27°C 항온기에 배양하면서, 도립현미경으로 다각체 형성 여부를 관찰하였다. 또한 Summers & Smith(1987)의 방법에 따라 정제된 BmNPV의 DNA를 transfection buffer(25 mM HEPES, pH 7.1, 140 mM NaCl, 125 mM CaCl₂)에 혼합하여 배양세포에 접종하고, 27°C에서 4시간 경과 후 medium을 교체한 뒤 위와 같은 방법으로 관찰하였다.

다각체 분리

생체에서 증식된 다각체의 분리는 병사충의 체액을 여과한 후, 3,000 rpm에서 5분간 3~4회 원심분리하여 얻은 부분정제된 다각체를 0.01% SDS용액에 부유시키고, sonication하여 40~65%(W/W) sucrose density gradient로 24,000 rpm(Hitachi, SRP-28SA)에서 30분간 원심분리하여 순수한 다각체를 얻었다.

배양세포에서 증식된 다각체의 분리는 1% Triton X-100-0.01 M Tris-Cl(pH 7.0) 용액을 처리하여 배양세포로부터 다각체를 유리시킨 뒤 이와같은 방법으로 다각체를 분리하였다.

전자현미경 관찰

바이러스를 배양세포에 접종하고, 48시간이 경과된 세포를 수거하여, 2,000×g, 15분 원심분리하여 얻은 침전물을 3% glutaraldehyde로 1차고정하고, 0.5%

sodium cacodylate 완충액으로 충분히 세정한 후, 1% OsO₄를 함유한 완충액에서 2차 고정하였다. 그 후 50, 70, 90, 100%의 ethanol 및 100% acetone으로 탈수하고 EPON수지(EPON812)에 포매한 뒤, LKB-Ultratome(MT-5000)으로 초박절편을 작성하여 전자현미경(HU-12A형과 JEOL-1200EX형)으로 관찰하였다.

Western blot 분석

배양세포에서 다각체 단백질 합성의 Western blot 분석은 배양세포에 바이러스를 접종한 뒤, 27°C 항온기에서 배양하면서 일정한 시간별로 수거하였다. 수거된 배양세포를 2,000×g, 15분 원심분리하여 침전시키고, Laemmli(1970)의 방법에 의거 SDS-PAGE를 수행하였다.

SDS-PAGE한 gel은 Towbin 등(1979)의 방법에 의거 Western blotting buffer(24 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)에서 nitrocellulose filter로 단백질을 electrophoretic blotting한 후, nitrocellulose filter를 1% bovine serum albumin으로 blocking시킨 뒤, 다각체 단백질 항체(朴 등, 1988)를 TBST buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 100배 희석하여 1차 항체로, anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 2차 항체로 결합시켰으며, 염색용액으로 alkaline phosphate용액(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 15 ml에 NBT(nitro blue tetrazolium, 50 µg/ml in 70% dimethyl-formamide) 99 µl와 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 50 µg/ml in 70% dimethylformamide) 50 µl를 잘 섞어 발색시켰으며, 증류수로 반응을 정지시켰다.

바이러스 DNA분리 및 제한효소 분석

정제된 다각체를 알칼리용액(0.1 M Na₂CO₃, 0.01 M EDTA, 0.17 M NaCl; pH 10.9)에 부유시켜 37°C에서 1시간 가온하고, microcentrifuge로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, 1% SDS, proteinase K 0.5 mg/ml가 되도록 각각 첨가하고 37°C에서 1시간 가온하였다. 여기에 TE buffer(pH 7.5)로 포화된 phenol을 동량 첨가하여 완전히 혼합시킨 다음, microcentrifuge로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상부의 물층을 취하여 동일한 방법으로 phenol추출을 반복하였다.

채취된 물층에 phenol : chloroform/isoamyl-alcohol(24/1)이 1 : 1로 혼합된 용액을 같은 양으로 넣어

혼합한 후 상기조건과 같이 원심분리하여 상부의 물층을 채취하였다. 여기에 chloroform/isoamyl alcohol (24/1) 용액을 동량첨가 혼합하여 같은 방법으로 원심분리하여 DNA가 함유된 물층을 2회 반복하여 채취하였다. 채취된 물층에 2배의 냉 ethanol을 첨가하고 혼합하여 -70°C에서 30분 정도 보관하였다가 microcentrifuge로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA 침전을 얻었다. 이 DNA 침전물을 70% ethanol로 3회 세척한 뒤 evaporator로 ethanol을 완전히 제거하고 TE buffer로 100 µg/ml의 농도로 만들어 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

제한효소(NEB Co, U. S. A.) 처리는 100 µg/ml 농도의 DNA 용액 18 µl(약 1.8 µg)과 10×digestion buffer 2 µl에 각 제한효소를 15~20 unit를 각각 첨가한 후, 37°C에서 4시간 정도 처리하여 mini-gel을 이용하여 digestion을 확인하고 stop buffer(0.1 M EDTA, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue) 3 µl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 처리된 DNA는 60%에서 15분간 가온한 후 빙냉시켜 0.7% agarose gel에서 전기영동하고, EtBr로 염색하였다.

結果 및 考察

Bm 배양세포주에서의 BmNPV증식

Insect Grace's medium에서 배양되고 있는 BmN4 배양세포에 BmNPV를 virion 또는 DNA로 감염시키고, 바이러스 증식을 도립현미경으로 관찰한 결과, virion이나 DNA로 감염시킨 경우 모두 48시간이 경과하면서 다각체가 형성되기 시작하여, 72시간이 경과하면서 다각체 형성이 왕성하였고, 96시간 후에는 대부분의 다각체들이 감염세포의 붕괴와 함께 유리되었다(그림 1).

이 때 감염세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 핵 내에서 형성중인 nucleocapsid 다발과 SNP로 존재하는 virus입자 및 다각체형성을 확인할 수 있었다(그림 2).

배양세포에서의 바이러스 증식은 NOV(non-occluded virus)와 DNA transfection이 일치한다고 보고되어 있으며(Tsuda 등, 1988), 본 실험의 결과 역시 NOV 감염이나 DNA transfection 경우 모두 다각체 형성이 왕성하였다.

다각체 단백질의 합성

BmNPV의 NOV를 접종한 후, 일정한 시간별로 감염세포에서 총단백질을 분리하고 SDS-PAGE하여, 다각체 단백질 항체를 이용, western blot 분석한 결과

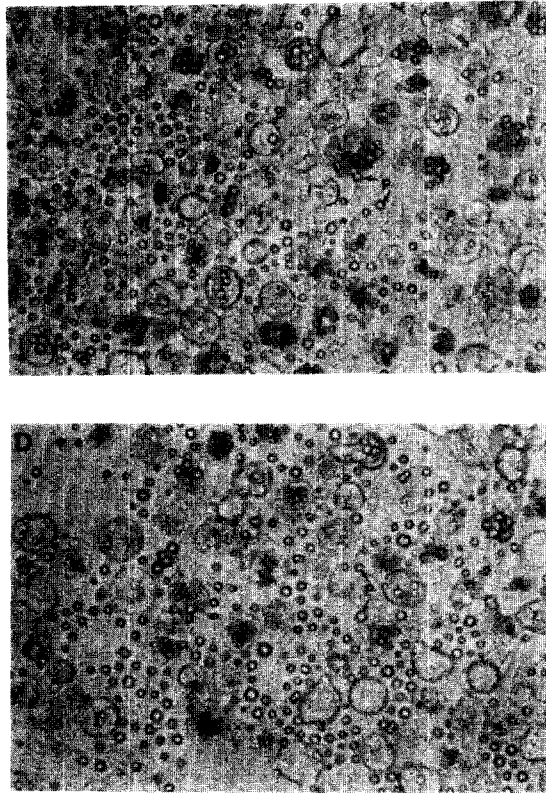


Fig. 1. BmN4 cells infected with alkali liberated virus particles(V) and DNA(D) of BmNPV(72 hr p.i.) p: polyhedra.

다각체 단백질의 합성은 접종 후 18시간이 경과하면서 분자량 30 kd의 단일 band로 나타나기 시작하여, 48시간이 경과하면서 뚜렷하였다(그림 3).

다각체 단백질 유전자는 바이러스 복제와는 무관한 very late gene으로(Smith 등, 1983), 접종 후 12시간이 경과하면서 다각체 단백질의 합성이 관찰되며, 감염말기의 다각체 단백질 합성량은 그 유전자의 강력한 promoter 조절에 의해 전세포 단백질의 약 20%까지 달한다는 보고(Adang & Miller, 1982; Smith 등, 1983; Quant 등, 1984)와 비교하면 본 실험에서 다각체 단백질의 합성은 위의 보고들과는 6시간 조금 늦은 접종 18시간 후부터 관찰할 수 있었고, 접종 후 48시간이 경과하면서 점점 더 뚜렷하였는데, 이는 그림 1의 도립현미경으로 관찰한 다각체 형성과 감염세포의 붕괴에 의한 다각체의 유리와 일치되는 결과였다.

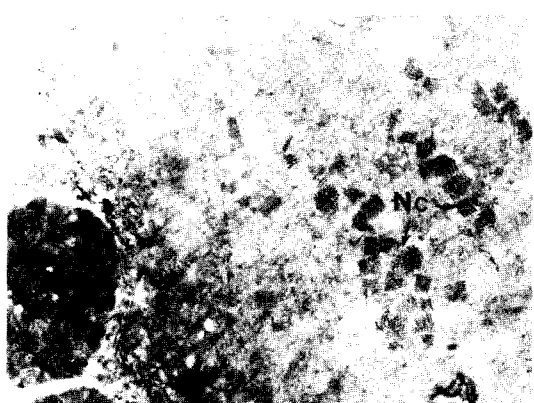
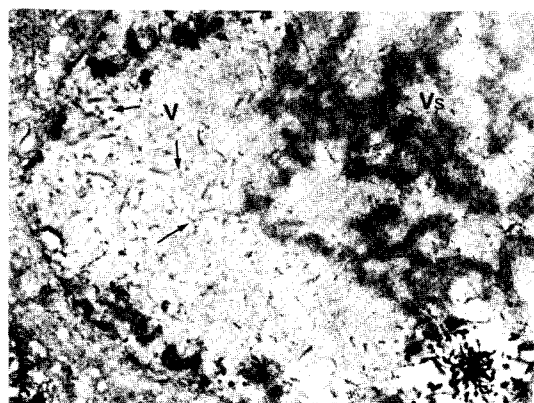


Fig. 2. Transmission electron micrographes of BmN4 cells infected with BmNPV at 12 hr p.i.(upper), at 24 hr p.i.(middle) and at 48 hr p.i.(bottom), respectively Vs: Virogenic stroma, v: virion, Nc: nucleocapsid, p: polyhedra.

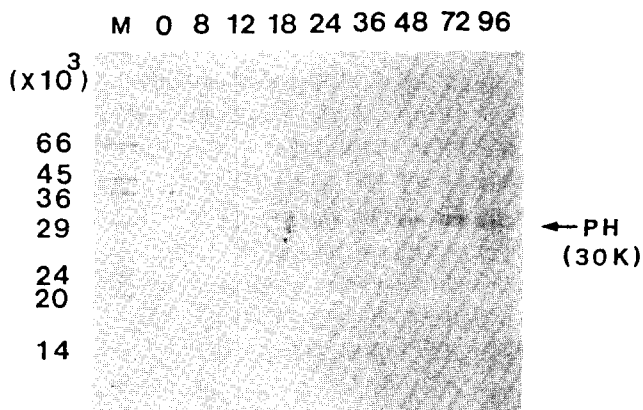


Fig. 3. Western blot analysis of polyhedrin synthesis. Total proteins of BmN4 cells infected with BmNPV at various incubation time were resolved on 15% SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose filter paper, and reacted with antisera against polyhedrin (primary antibody) and anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (secondary antibody).

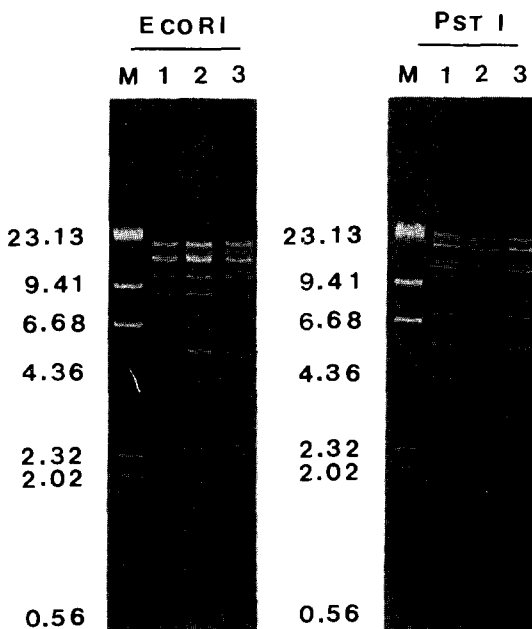


Fig. 4. Restriction patterns of BmNPV DNA isolated from wild type propagated *in vivo* (1), the polyhedra produced in BmN4 cells infected with NOV (2), and the polyhedra produced in BmN4 cells transfected with DNA (3), Lambda phage DNA digested with Hind III was used as size marker(M).

DNA 복제

배양세포주에서 DNA 복제는 BmN4세포에서 BmNPV의 NOV와 DNA transfection으로 증식된 다각체에서 NPV DNA를 추출하여, wild type의 DNA와 제한효소 패턴으로 비교·분석하였다.

BmNPV wild type의 DNA와 Bm세포에서 NOV와 DNA transfection에 의해 증식된 각각의 DNA를 EcoRI 및 PstI으로 digestion하고, 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 비교한 결과 제한효소 패턴상에 차이가 없었다(그림 4).

Carstens 등(1980)은 AcNPV의 NOV와 DNA를 *Spodoptera frugiperda* 세포에 감염시킨 후, DNA의 제한효소 패턴을 비교한 결과 동일하였다고 보고했으며, Naser 등(1987)은 *Choristoneura murinana* NPV의 *in vivo*와 *in vitro*에서 증식된 NPV DNA간의 제한효소 패턴은 차이가 없었다는 보고 등을 참고할 때, 본 실험의 결과와도 일치하는 것으로서 *in vivo*와 *in vitro*에서 복제된 BmNPV DNA는 서로 차이가 없음을 알 수 있었다.

摘 要

Bm 배양세포주(BmN4)에서 BmNPV의 다각체 단백질 합성과 DNA복제에 대한 실험결과는 다음과 같다.

1. BmNPV는 insect Grace's medium에서 배양되고 있는 BmN4 세포에서 NOV나 DNA로 감염시킨 경우 모두 잘 증식되었으며, 독립현미경 관찰 결과 접종 후 48시간이 경과하면서 다각체가 형성되기 시작하였다.
2. 또한 전자현미경으로 핵내 형성된 다각체와 형성중인 nucleocapsid 다발을 관찰하였으며, 바이러스 입자는 SNPV로 존재하였다.
3. Western blot분석에 의한 다각체 단백질의 합성은 접종 후 18시간부터 관찰되었으며, 다각체 단백질의 분자량은 30 kd이었다.
4. Wild type BmNPV DNA와 Bm 세포(BmN4)에서 NOV 및 DNA 감염에 의해 형성된 바이러스 DNA간의 제한효소 패턴은 차이가 없었다.

사 사

본 연구는 1990년도 과학재단 연구비 지원에 의해 수행되었음.

引 用 文 獻

Adang, M. J. and L. K. Miller(1982) Molecular cloning of DNA complementary to mRNA of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: location and gene products of RNA transcripts found late in infection. *J. Virol.* **44** : 782-793.

Carstens, E. B., S. T. Tjia and W. Doerfler(1980) Infection DNA from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virol.* **101** : 311-314.

Croizier, G. and J. M. Quiot(1981) Obtention and analysis of two genetic recombinants of baculovirus of Lepidoptera. *Autographa californica* Speyer and *Galleria mellonella* L. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur).* **132E** : 3-18.

Grace, T. D. C.(1967) Establishment of a line of cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature(London)* **216** : 613-614.

保坂康弘·川瀬茂具·松井千秋(1972) ウイルス図鑑. 講談社. pp. 343-345.

Iatrou, K., Ito, K. and Witkiewicz, H.(1985) Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **54** : 436-445.

Inoue, H. and J. Mitsuhashi(1984) A *Bombyx mori* cell line susceptible to a nuclear polyhedrosis virus. *J. Sericult. Sci. Jpn.* **53** : 108-113.

Inoue, H. and J. Mitsuhashi(1988) Characterization of a new continuous cell line from silkworm (*Bombyx mori*) Embryos. *Appl. Ent. Zool.* **23(1)** : 8-14.

Laemmli, U. K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227** : 680-685.

Maeda, S. and K. Majima(1990) Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71** : 1851-1855.

Maeda, S., T. kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horichi, Y. Saeki, Y. Soto and M. Furusawa(1985) Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature(London)* **315** : 592-594.

Matthews, R. F. F.(1982) Classification and nomenclature of viruses. *Intervirol.* **136** : 221-234.

Naser, W. L., J. P. Harvey, A. M. Huger and J. Huber (1987) *Choristoneura murinana* nuclear polyhedrosis virus: Comparative biochemical and biological examination of replication *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **68** : 1251-1260.

박범석·김현옥·진병래·임대준·강석권(1988) 수종 나비목 핵다각체병 바이러스의 다각체 단백질 특성과 그에 대한 alkaline protease의 영향. *한울콘지* **27(4)** : 211-218.

Quant, R. L., M. N. Pearson, G. F. Rohrmann and G. S. Beaudreau(1984) Production of polyhedrin monoclonal antibodies for distinguishing two *Orygia pseudotsugata* baculoviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 48 : 732-736.
- Smith, G. E., M. J. Fraser and M. D. Summers**(1983) Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000 molecular weight protein. *J. Virol.* **45** : 215-225.
- Summers, M. D. and Smith, G. E.**(1987) A Methods for the Baculovirus Vector and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
- Towbin, H. R., R. Stachelin and J. Gordon**(1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A.* **76** : 4350-4354.
- Tsuda, K., E. Mizuki, T. Kawarabata and K. Aizawa** (1984) Replication of *Xestia c-nigrum*(Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus in continuous cell cultures. *Appl. Ent. Zool.* **19** : 293-298.
- Tsuda, K., E. Mizuki, T. Kawarabata and K. Aizawa** (1988) Comparative neutralization of nuclear polyhedrosis virus infectious to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*(Lepidoptera: Noctuidae), in a cell line of *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.* **52** : 248-252.
- 渡部 仁**(1975)家蠶 核多角體病 桿狀粒子 增殖組織別變異. *日蠶雜* **44**(6) : 497-498.