

배추흰나비 顆粒病바이러스 感染組織에서의 바이러스 成熟

柳 江 善·姜 錫 權*

Maturation of the Granulosis Virus of Common Cabbage Worm, *Pieris rapae*

Ryu, Kang Sun and Seok Kwon Kang*

(Received April 1, 1991)

Abstract

The virus maturation in fat body cells infected with *P. rapae* granulosis virus were also examined to have the following results.

Thin section of *P. rapae* GV granules showed a regular lattice of the granule enclosing virus particles. Virus particles were observed to penetrate the fat body cells by fusion or viropexis type. The blood and fat body cells uptaked the granulosis viruses a phagosome, in which they were digested by lysosomal enzymes.

緒 論

바이러스의 숙주 內 浸入 增殖過程에 있어서 GV(Granulosis Virus)는 脂肪體細胞, 眞皮細胞, 血球, 말피기관 및 氣管皮膜細胞 등의 細胞質에 增殖하며 主感染組織은 脂肪體細胞로 알려져 있다(Arnott and Smith, 1968 ; Asayama and Osaki, 1970 ; Carner

and Barnett, 1975 ; Hamm, 1968 ; Huger, 1963).

일반적으로 곤충에 있어서 바이러스의 숙주 浸入形態로는 viropexis(Tanada and Leutenegger, 1970) 膜의 融合(Summers, 1971), 그리고 核物質單의 注入(小林, 1972)등이 있고, GV에서는 앞의 두 경우가 보고되어 있으며, 高等動物에서 주로 일어

농촌진흥청 잠업시험장

*서울대학교 농과대학

Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea, 441-100

*College of Agriculture, Seoul National University, Suwon Korea, 441-744

나는 phagocytosis는 곤충의 경우 누에의 血球에서 관찰된다고 하였으나(井上, 1974 ; 入戸野, 1960), 배추흰나비의 GV에 있어서는 보고된 바 없다.

Stairs(1964, 1968)는 異常形 封入體생성이 바이러스의 遺傳的 支配를 받는다고 하였으나, Arnott와 Smith(1968)는 *Plodia interpunctella*의 경우 正常封入體의 15:20배 크기의 거대한 封入體등 異常形의 생성은 非遺傳性이라 하였고, 또한 渡部와 今西(1972)는 *Adoxophyes fasciata*의 경우에서 이와 같은 현상은 非遺傳的인 것이라고 보고하였다.

P. rapae GV의 내부구조, 血球에 바이러스의 흡착과 phagocytosis 및 脂肪體細胞에서 감염에 따른 바이러스 증식에 대한 연구를 수행하여 얻은 결과를 보고한다.

材料 및 方法

接種 GV는 病死蟲의 磨碎液을 가아제로 여과한 후, 원심분리법에 의해 정제된 고농도의 封入體 浮遊液을 사용하였다. 접봉은 封入體 浮遊液 일정량에 triton X-100을 0.01% 되게 첨가하여 양배추잎에 도말, 음건한 후 經口接種하였다.

실험곤충은 양배추 밭에서 채집한 유충을 사육하여 실내 採卵孵化시킨 배추흰나비 2령 유충을 사용하였다. 접종한 2령 유충은 실내(25°C)에서 사-레 사육하였으며 접종 후 4일째 1.6% paraformaldehyde와 3% glutaraldehyde가 함유된 0.1M sodium cacodylate 완충액 내에서 해부하여 脂肪體細胞와 表皮를 시료로 채취한 후, 3% glutaraldehyde로 고정하고 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 충분히 세척한 후, 동 완충액으로 만든 1% osmium tetroxide 로 2차 고정하였다. 그후 50, 70, 90, 100% 의 에탄올 및 100% 아세톤으로 탈수, Epon 樹脂 (Epon812)에 包埋, LKB-

Ultratome (MT-5000)으로 超薄切片을 만들어 電子顯微鏡(HU-12A型和 JEOL-1200EX型)으로 관찰하였다.

結 果

1) 바이러스의 内部構造

顆粒病바이러스 감염 4일째 脂肪體細胞에서 관찰된 封入體는 橢圓形 또는 長橢圓形이 일반적이며 각 封入體에 1개의 바이러스 입자가 들어 있는 것이 보통이나(Fig. 1a) 드물게는 부정형의 큰 封入體가 관찰되었고 그 중에는 2개의 바이러스 입자를 갖고 있는 경우도 확인되었다(Fig. 1c). 또 封入體의 단백질은 結晶性 格子구조로 배열되어 있었다(Fig. 1a).

성숙한 nucleocapsid는 200×33nm이고 (Fig. 1a), envelope의 二重膜간격은 3.3nm였다(Fig. 1b). 또 바이러스 입자는 233×60nm의 간상이고 封入體는 484×316nm의 橢圓體였다(Fig. 1a).

한편 피막과 nucleocapsid의 간격은 바이러스 성숙과정에 있는 것과 성숙이 끝난 封入體 내의 것과는 다르며, 각각 14nm와 9nm로(Fig. 1d) 성숙과정에 있는 것과 완전히 성숙된 것과의 차이는 Fig. 1d에서와 같이 성숙이 되면서 capsid protein과 피막이 밀착되어 간격이 좁아지기 때문인 것으로 추정되었다.

2) 바이러스의 血球내 浸入

GV에 감염된 血球에서 바이러스의 침입 형태 중 viropexis에 의한 것(Fig. 2c)과 膜의 融合에 의한 경우(Fig. 2b) 모두를 관찰할 수 있었다.

生體防禦機能을 주로 담당하고 있는 lysosome에 의한 세포 내 소화현상이 血球에서 관찰되었다(Fig. 2a). 본 실험에서도 phagosome의 형성 및 lysosome에 의한 바이러스의 消化分解像이 관찰되었다(Fig. 2a).

특히 본 실험에서는 血球뿐만 아니라 바

이러스의 증식이 왕성한 脂肪體細胞에서도 lysosome의 기능이 인정되었다(Fig. 3a, b, c). 즉 봉입체라든가 膜系物質등이 식하여(Fig. 3a) 소화분해되는 것(Fig. 3b) 뿐만 아니라, 골지체에서 분화되는 lysosome에 의해 봉입체가 에워싸지는 것(Fig. 3c)도 관찰되었다.

3) 異常形封入體의 증식

GV에 감염된 배추흰나비 유충의 脂肪體細胞에서 封入體의 형태는 대부분 橢圓形으로서 정상적인 封入體였지만, 드물게는 異常封入體가 다수 형성되어 있는 세포도 관찰되었다(Fig. 4a). 이 세포에서의 封入體는 바이러스 입자를 관찰할 수 없는 대형의 부정형 및 사각형(Fig. 4a, b)과 1개의 바이러스 입자를 갖고 있으나 크기가 正常封入體의 2-3배 정도가 되는 부정형도 존재하였다(Fig. 4c).

배추흰나비 GV의 경우는 감염세포내에 이상형봉입체와 정상봉입체가 혼재되어 있는 것(Fig. 4a)으로 보아 바이러스의 遺傳性, 非遺傳性이라기 보다는 세포의 특성에 따른 것이라 생각된다. 그러나 이 점에 대해서는 금후 더 구명해야 할 여지가 있다.

考 察

Baculovirus subgroup B에 속하는 GV는 蛋白質로 되어 있는 封入體로 바이러스粒자를 包埋하고 있는 것이 그 特徵으로 되어 있다.

渡部와 今西(1972)는 *Adoxophyes fasciata*에서 성숙한 바이러스 입자 크기는 약 305×70 nm이고 封入體의 크기는 $500-540 \times 250-280$ nm, Carner와 Barnett(1975)는 *Platyphenax scabra*의 경우 前者는 $229 \pm 7 \times 47 \pm 1$ nm, 後者는 $342 \pm 10 \times 178 \pm 7$ nm.라고 보고하였다. *Plutella xylostella* GV의 경우 피막은 새롭게 형성될 때부터 2층의 單位膜구조를 보이고, 그 二重膜間隔은 약 4nm라고

하였다(淺山, 1975). 이와같이 숙주에 따른 GV 封入體와 바이러스 입자의 크기는 서로 相異했으나, envelope의 二重膜間隔은 큰 차이를 보이지 않았다.

곤충바이러스의 숙주세포 침입형태는 주로 viropexis, 膜의 融合, 核物質만의 注入 등 3형태로 나누어지는데 viropexis는 Tanada와 Leutenegger(1970)가 *T. ni* GV의 中腸조직에 침입시 관찰되었다고 보고하였으며, 膜의 融合은 Summers(1971)가 *T. ni*의 血球에 GV가 침입하는 과정 중 脫外被하여 막에 融合하는 것을, 核物質만의 注入은 小林(1972)가 누에 中腸細胞에서 細胞質多角體病 바이러스의 경우 核物質의 방출주입을 보고하였다.

본 實驗에서는 膜의 融合과 viropexis의 경우를 관찰할 수 있었는데, 피막을 가진 바이러스 입자 상태로는 막의 융합에 의해 침입하고, nucleocapsid가 침입하는 경우는 viropexis에 의해 침입하는 것으로 생각된다.

먼저 외래 단백질의 침입을 받게 되면 phagosome이 형성되고, 이 phagosome에 lysosome이 융합하게 되어 lysosome의 분해 효소 활성으로 소화분해된다고 알려져 있으며(井上, 1974), 누에의 體腔內 墨汁(入戸野, 1960), 또는 核多角體病바이러스(井上, 1974)를 주사하여 관찰한 결과, 고등동물에서와 같은 phagocytosis현상이 나타난다고 보고하였다.

이는 lysosome이 생체방어기능을 담당하는 세포소기관이기에 봉입체 형성후에도 그 기능을 갖고 있는 것으로 생각된다.

GV에는 입방체상의 봉입체를 형성하는 변이체가 출현하기 쉽고, 그 바이러스의 후대는 전대와 같은 봉입체를 형성하기 때문에 봉입체의 형태는 바이러스의 유전적 지배를 받는다고 보고(Stairs, 1964, 1968)가 있으나, Arnott와 Smith(1968)는 *Plodia*

*interpunctella*의 顆粒病에서 유전성이 있는 입방체상의 봉입체와 정상의 15-20배 크기를 보이는 거대한 봉입체등과 같은 비유전성의 여러 이상형태를 보이는 封入體에 관하여 보고하였으며, 한편 渡部와 今西(1972)는 *Adoxophyes fasciata* 과립병에서 관찰되는 이상형봉입체는 정상봉입체를 갖는 감염세포에 드물게 혼재되어 있으므로 비유전성임을 시사하고 있다.

부정형(Fig. 4a)과 사각형(Fig. 4b)의 부정형은 1개 封入體를 중심으로 封入體 蛋白質의 附加重合이 無制御로 연속하여 일어난 것이고, 또 정상 봉입체크기의 2-3배의 부정형은 소위 雙封入體 발생을 한 것이라 생각된다. 또한 배추흰나비 GV의 경우는 감염세포 내에 이상형봉입체와 정상봉입체가 혼재되어 있는 것(Fig. 4a)으로 보아 바이러스의 遺傳性, 非遺傳性이라기 보다는 세포의 특성에 따른 것이라 생각된다. 그러나 이 점에 대해서는 금후 더 구명해야 할 여지가 있다.

結 論

배추흰나비(*P. rapae*) 課粒病바이러스의 감염과정과 病理組職學的인 변화를 電子顯微鏡으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 顆粒病바이러스의 내부구조에 있어 nucleocapsid는 200×33nm, 바이러스입자는 233×60nm의 간상이고, 피막의 二重膜間隔은 3.3nm, 封入體는 484×316nm의 타원형이었다. 血球에서는 lysosome의 細胞內消化 현상 및 바이러스의 침입양식 중 膜의 融合과 viropexis가 확인되었으며, 生體防禦機能은 血球에서 뿐만아니라 脂肪體細胞에서도 관찰되었다. 그리고 異常形封入體가 많이 혼재되어 있는 세포도 있었다.

References

Arnott, H. J. and K. M. Smith. 1968. An ul-

trastructural study of the development of granulosi virus in the cells of the moth. *Plodia interpunctella*(Hbn). J. Ultrastruct. Res. 21, 251-268.

Asayama. T. and N. Osaki. 1970. A granulosi of the diamondback moth. *Plutella xyostella*. J. Invertebr. Pathol. 15, 284-286.

淺山 哲. 1975. コナガ顆粒病ウイルスの成熟過程. 應動昆. 19, 149-156.

Carner, G. R. and O. W. Barnett. 1975. A granulosi virus of the green cloverworm. J. Invertebr. Pathol. 25, 269-271.

Hamm, J. J. 1968. Comparative histopathology of a granulosi and a nuclear polyhedrosis of *Spodoptera frugiperda*. J. Invertebr. Pathol. 10, 320-326.

Huger, A. 1963. Granulosi of insects. pp. 531-575 in "insect pathology"(E. A. Steinhaus, ed.), Academic Press, New York.

井上 金治. 1974. カイコの顆粒細胞における核多角體の食細胞現象と酸性ポスプアタゼの局在. 日蠶雜. 43, 394-400.

小林 正彦. 1972. カイコの中腸皮膜培養細胞における多角體病ウイルスの吸着と浸入. 日蠶雜. 41, 1-6.

入戸野 康彦. 1960. 家蠶の血球に關する研究. 蠶試報告. 16(4), 171-266.

Stairs, G. R. 1964. Selection of a strain of insect granulosi virus producing only cuboidal inclusion bodies. Virology 24, 520-521.

Stairs, G. R. 1968. Inclusion-type insect viruses. Current topics in microbiology and immunology 42, 1-23.

Summers, M. D. 1971. Electron microscopic observations on granulosi virus entry, uncoating and replication processes during

- infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. J. Ultrastruct. Res. 35, 606-625.
- Tanada, Y. and R. Leutenegger. 1970. Multiplication of a granulosis virus in larval midgut cells of *Trichoplusia ni* and possible pathways of invasion into the hemocoel. J. Ultrastruct. Res. 30, 589-600.
- 渡部 仁, 今西 建一. 1972. 顆粒病ウイルスに感染したチャノコカクモンハマキ脂肪體の電子顯微鏡觀察. 應動昆. 16, 193-201.

Figure Legends

- Fig. 1.** Cross and longitudinal sections of *P. rapae* GV in fat body cells.
- a ; Longitudinal section of a virus rod within a capsule : note the crystalline lattice of the capsule. G, granulin ; EN, envelope ; N, nucleocapsid.
 - b ; Densely staining material filled the gap between the envelope and nucleocapsid.
 - c ; Longitudinal section a capsule enclosing two virus particles.
 - d ; An enveloped nucleocapsid occluded partially.
- Fig. 2.** Phagocytosis and virus invasion of the blood cells.
- a ; A blood cell phagocytosed the granulosis virus which was digested by lysosomal enzymes. Digested products were seen at the arrow mark. Many virus particles are seen to penetrate into the blood cells.
 - b ; The virus particle invasion with fusion.
 - c ; The nucleocapsid invasion with pinocytosis(viropexis).
- Fig. 3.** Phagocytosis in the fat body cells
- a ; Phagosome in the fat body cells containing various material of the GV replication, network structures, membrane structures and granulin.
 - b ; A region was digested in the phagosome.
 - c ; The lysosome enclosed the capsules.
- Fig. 4.** Electron micrographs showing many abnormal capsules in a cell.
- a, b ; Irregular clumps of granulin protein appeared to be associated with nucleocapsid in the capsule formation.
 - c ; The nucleocapsid occluded by irregular clumps of granulin.







