

흰불나방 핵다각체바이러스 다각체단백질 유전자포함 절편의 클로닝

Cloning of the Polyhedrin Gene-Containing DNA Fragment of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus

朴鎬用¹·陳炳來¹·朴順植¹·金正一¹·姜錫權²

Ho Yong Park, Byung Rae Jin, Soon Sik Park, Jeong Il Kim, and Seok Kwon Kang

ABSTRACT The polyhedrin gene-containing DNA fragment of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus (HcNPV) was localized by southern hybridization with *Autographa californica* NPV EcoRI-I fragment(7.3 kb), *Bombyx mori* NPV PstI-F fragment(7 kb) and synthetic oligonucleotide(30-mer) as probes. the PstI-L(5.3 kb) fragment of HcNPV was cloned to *E. coli* and the plasmid of the fragment was named as pHcP-L(8.0 kb). The pHcP-L was physically mapped and subcloned to *E. coli* as pHcP-L1(4.7 kb), pHcP-L2(7.1 kb), pHcP-L3(5.3 kb), pHcP-L4(4.2 kb) and pHcP-L5(4.5 kb).

KEY WORDS *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus(NPV), polyhedrin gene, localization, cloning

초 록 흰불나방 핵다각체바이러스(*Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus: HcNPV) 다각체단백질 유전자포함 절편의 탐색과 클로닝을 행하였다. *Autographa californica* NPV EcoRI-I 절편 (약 7.3 kb), *Bombyx mori* NPV PstI-F 절편 (약 7 kb) 및 합성 oligonucleotide(30-mer) 를 probe로 한 southern hybridization을 행하여 HcNPV PstI-L 절편 (5.3 kb)을 탐색하고, pUC18을 이용하여 *E. coli*에 형질전환시켜 클로닝하였다. 클로닝한 plasmid의 EcoRI, SalI, KpnI, HindIII, SacI 및 Aval의 제한효소지도를 작성하고 pHcP-L(8.0 kb)이라 명명하였으며, 이를 다시 pHcP-L1(4.7 kb), pHcP-L2(7.1 kb), pHcP-L3(5.3 kb), pHcP-L4(4.2 kb) 및 pHcP-L5(4.5 kb)로 subcloning 하였다.

검 색 어 흰불나방, 핵다각체바이러스, 다각체단백질 유전자, 탐색, 클로닝

Baculovirus는 숙주특이성과 병원성이 강하기 때문에 오래전부터 해충의 미생물적 방제에 이용되어져 왔으며, 최근에는 분자생물학적 연구에 있어서 유용한 발현벡터로서의 이용가능성 또한 점점 높아 인식되어지고 있다. Baculovirus의 subgroup A에 속하는 핵다각체 바이러스(nuclear polyhedrosis virus: NPV)는 분자량 50~100 megadalton인 이중환상나선구조 DNA를 함유하고 있으며, 바이러스 입자는 일반적으로 40 × 350 nm 크기의 막대형으로서 분자량 28-33 kd인 다각체단백질(polyhedrin)에 매입되어 있다(Kelly 1985). NPV의 다각체단백질은 감염말기에 숙주세포 전체단백질의 약 30% 이상으로 다량 합성되어지며, 이는 다각체단백질 유전자의 강력한 promotor에 의해 조절되고 있다는 것이 밝혀졌다(Hoof van

조 DNA를 함유하고 있으며, 바이러스 입자는 일반적으로 40 × 350 nm 크기의 막대형으로서 분자량 28-33 kd인 다각체단백질(polyhedrin)에 매입되어 있다(Kelly 1985). NPV의 다각체단백질은 감염말기에 숙주세포 전체단백질의 약 30% 이상으로 다량 합성되어지며, 이는 다각체단백질 유전자의 강력한 promotor에 의해 조절되고 있다는 것이 밝혀졌다(Hoof van

1 한국과학기술연구원 유전공학연구소(Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejeon 305-606, Korea)

2 서울대학교 농업생명과학대학(Coll. of Agric. & Life Science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Iddekinge 등 1983, Maeda 1989). 또 다각체단백질 유전자는 바이러스의 감염과 복제에는 비필수적이기에, 외래유전자의 삽입과 다각체 형성여부에 따른 선발표지형질(selection marker)로 선발이 용이하며 외래유전자의 이중단백질을 다량으로 발현시킬 수 있다(Luckow와 Summers 1988, Smith 등 1983, Vlak과 Rohrman 1985). 이러한 NPVs는 생명공학분야에서 차세대의 재조합 벡터로까지 기대될 만큼 조작이 쉽고 효율이 높기때문에 많은 주목을 받고 있다. 현재 *Autographa californica* NPV (AcNPV)와 *Spodoptera frugiperda* 배양세포계를 조합한 것과 누에 NPV(*Bombyx mori* NPV: BmNPV)와 누에유충 생체 및 배양세포를 이용하는 2종류의 baculovirus 발현벡터 시스템에서 100여종 이상의 박테리아, 바이러스, 동식물에 다양한 유전자를 발현시키고 있으며, 이와 같이 발현된 이중단백질은 면역학적으로나 기능적으로 본래의 것과 동일하다(Maeda 등 1985, Pennock 등 1984, Smith 등 1983, Luckow와 Summers 1988, Maeda 1989, 박 1992). 최근에는 외래유전자 발현효율증대를 위한 multiple expression vector 개발(Weyer 등 1990)과 비융합외래단백질(nonfused foreign protein) 발현 등의 연구가 시도되고 있다(Luckow와 Summers 1988, 1989) (Gonzalez 등 1989, Rohrman 1986). 본 연구에서는 농업 및 의약품산업등에 필요한 유용물질을 유전공학적인 기법에 의해 대량생산할 수 있는 새로운 baculovirus 발현벡터 개발을 위한 연구의 일환으로, 우리나라에서 비교적 연구가 잘 되어 있는(임 등 1979, 강 등 1982, 박 1983, 류 등 1984, Choe 등 1986), 농작물, 산림 및 가로수의 주요해충인 흰불나방(*Hyphantria cunea* Arctiidae, Lepidoptera)의 NPV를 이용하여 다각체단백질 유전자의 탐색, 클로닝 및 구조분석에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

곤충바이러스

본 연구에 사용된 바이러스는 우리나라에서 분리, 계대보전중인 흰불나방 핵다각체바이러스(*Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus: HcNPV)이며 (강 등 1982, 박 1983), 바이러스의 양적 확보는 실내에서 25°C, 55~65% R. H., 16L:8D의 조건에서 인공사료로 누대사육한 흰불나방의 5령 유충에 HcNPV를 접종시켜 사육하면서 8~10일 경과후 감염유충을 회수하였다. 바이러스다각체는 감염유충을 마쇄하여 2점의 거-즈로 여과한 후, 3,000 rpm에서 3~4회 원심분리하여 부분정제한후 바이러스다각체를 0.01% SDS용액에 현탁시키고 초음파 처리하여 40~65%(w/w)의 설탕밀도구배를 작성, 24,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 정제하였다(Beckman XL-90 ultracentrifuge, SW41 rotor). 이후 정제된 다각체를 증류수로 세척하고 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 동결건조하여 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

바이러스 핵산의 분리

다각체로부터 바이러스 핵산의 분리는 Smith와 Summers(1979)의 방법을 약간 변경하여 행했다. 정제된 다각체를 0.1M Na₂CO₃, 0.17M NaCl, 0.01M EDTA, pH 10.9 용액에서 37°C, 1시간 처리하고, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, SDS와 proteinase K를 각각 0.5 mg/ml 첨가하고 37°C, 1시간 처리했다. 여기에 TE 완충액(pH 7.5)으로 포화된 phenol을 같은 양을 가하여 충분히 혼합시킨 뒤 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층을 취하여 같은 방법으로 phenol 추출을 반복했다. 채취된 상층에 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(24:1) 혼합용액을 가하고, 위의 조건으로 원심분리하여 상층을 취하였다. 이와 같은 방법을 3회 반복하여 채

취된 상층에 두배량의 차가운 ethanol을 가하고 혼합하여 -70°C 에서 30분간 방치하고, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 핵산을 침전시켰다. 이 핵산의 침전물을 70%의 차가운 ethanol로 3회 이상 세척하고 evaporator로 ethanol을 완전히 제거한 후 TE 완충액으로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 만들어 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

HcNPV 다각체단백질 유전자의 탐색

AcNPV와 BmNPV 다각체단백질 유전자 절편의 이용; HcNPV 다각체단백질 유전자를 탐색하기 위하여 이미 다각체단백질 유전자의 위치와 구조가 밝혀진 AcNPV EcoRI-I 절편(7.3 kb)과 BmNPV PstI-F 절편(7 kb)을 probe로 이용하였다. Probe의 표지와 탐색은 nonradioactive DNA labeling and detection kit (Boeringer Mannheim Co.)를 이용하였다. 각각 약 2 μg 정도의 AcNPV EcoRI-I 절편과 BmNPV PstI-I 절편을 95°C 에 10분간 열처리하여 ligation 시킨 후, hexanucleotide mixture 2 μl , dNTP labeling mixture 2 μl , klenow enzyme 1 μl , D.W. 10 μl 를 섞어 37°C 에서 15분간 반응시켜서 표지하였다. HcNPV DNA를 여러 가지 제한효소로 각각 처리한 뒤 0.7% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.5N NaOH, 1.5M NaCl 용액에서 denaturation시키고, 0.5M Tris-HCl, 1.5M NaCl(pH 7.4) 용액에서 중화시키고, 10X SSC transfer를 통하여 DNA 절편을 nitrocellulose membrane에 옮겨, 진공건조하여 흡착시킨 후 42°C 에서 2시간 정도 prehybridization 용액 [5X SSC, 50% (v/v) formamide, 0.1% (w/v) N-laurylsarcosine, 0.02% (w/v) SDS, 5% (w/v) blocking solution]에서 반응시킨 후, 표지된 probe가 포함된 잡종화(hybridization) 용액으로 42°C 에서 15시간 반응시켰다. 잡종화가 끝난 nitrocellulose membrane은 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl(pH 7.5)으로 세척한 후, diluted antibody-conjugate

용액에서 45분 정도 반응시키고 다시 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl(pH 7.5) 용액으로 세척했다. 세척한 nitrocellulose membrane은 NBT 45 μl 와 X-phosphate 용액 35 μl 가 포함된 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 (pH 9.5) 용액으로 발색시키고, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA(pH 8.0) 용액에서 반응을 정지시켰다.

Oligonucleotide의 이용; 몇 종류의 곤충바이러스 다각체단백질간의 상동성을 이용하여 (Hooft van Iddekinge 등 1983, Iatrou 등 1985), HcNPV 다각체단백질 유전자의 위치를 탐색하기 위해 30-mer oligonucleotide, 5'-CCC ACC ATC GGG CGT ACT TAC GTG TAC GAC-3'를 solid phase phosphoramidite법으로 합성하여 사용하였다(Beckman system I plus DNA 합성기). 여러가지 제한효소로 절단된 HcNPV DNA 절편을 nitrocellulose membrane에 옮기고 진공건조오븐에서 80°C , 2시간 처리하였다. 건조된 nitrocellulose membrane을 42°C 에서 2시간 동안 prehybridization 용액(5X Denhardt's solution, 6X SSC, 0.5% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured calf thymus DNA)으로 반응시킨 후, 상기의 합성 oligonucleotide에 1M Tris-HCl(pH 8.0) 2 μl , 0.2M MgCl_2 , 0.1M dithiothreitol, 0.1M spermidine 1 μl , [γ - ^{32}P]ATP 2 μl , T4 bacteriophage kinase 2 μl , 증류수 8 μl 를 넣고 37°C 에서 1시간 반응시키고, 반응 후 G-25 Sephadex spun column을 통하여 삽입되지 않은 방사성 동위원소를 제거하여, kination에 의해 [γ - ^{32}P]ATP 동위원소로 label된 합성 nucleotide probe가 포함된 잡종화용액으로 42°C 에서 15시간 반응시켰다. 잡종화가 끝난 nitrocellulose membrane을 2X SSC, 0.1% SDS 용액과 1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 42°C 에서 세척한 후 -70°C 에서 X-ray film에 감광시키고 현상하였다.

균주 및 배지

본 실험에 사용한 *E. coli* 균주는 DH1 [F⁻, recA1, endA1, gyrA196, thi-1, hsdR17, (rk⁻,

mk⁺), supE⁺44, relA1]과 DH5 α [F⁻, Φ 80dlacZ Δ M15, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (rk⁻, mk⁺), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF) U169]였다. *E. coli* 증식은 LB배지(11당 10 g의 Bacto-tryptone, 5 g의 Bacto-yeast extract와 10 g의 NaCl)를 사용하였으며, plate를 만들 때에는 1.5%(w/v)의 Bacto-agar를 넣었고, 필요할 경우 Ampicillin(50 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

HcNPV 다각체단백질 유전자 절편의 클로닝

Southern blot 분석에서 탐색된 HcNPV 다각체단백질 유전자를 포함하고 있는 DNA 절편을 electroelution 하여, CIP 처리된 pUC19와 pUC18 plasmid에 T4 DNA ligase로 16°C에서 16시간 동안 ligation시켜, *E. coli*에 CaCl₂ 처리 방법으로 형질전환하였다. *E. coli*의 형질전환은 사용할 *E. coli* 균주를 하루전에 접종하여 밤새 키운 후, 50 ml LB 액체배지에 0.5 ml 접종하여 37°C 진탕기에서 2~3시간 배양후 OD₆₀₀=0.4 정도되게 하고, 얼음에 10분간 방치해 두었다가 4°C, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 균체를 차가운 0.1M CaCl₂ 용액 10 ml에 현탁시켜 얼음에 5~10분 방치하고 다시 원심분리한 세포에 0.1M CaCl₂ 용액을 가하여 competent cell을 만들었다. 멸균한 미소원심관에 competent cell 0.2 ml를 넣고 pUC18, pUC19에 ligation 시키기 위하여 16°C에서 16시간 반응시킨 DNA ligation mixture를 넣어 섞은 후 얼음 속에서 30분간 반응시켰다. 이것을 42°C 수조에서 90초 동안 열충격을 가하고 얼음그릇에서 1~2분간 식힌 후, 0.8 ml SOC 배지를 첨가하여 37°C에서 45분간 배양하다가 Ampicillin이 들어 있는 사-레에 도말하여 37°C에서 12~16시간 배양한 후 생성된 균총들을 관찰하였다.

Plasmid DNA의 분리

세균균총을 Ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하고, 원심분리한

후 4°C에서 보관했다. 세균침전물을 100 μ l의 찬 얼음 제 I 용액(50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl(pH 8.0), 4 mg/ml lysozyme)에 넣고 실온에서 5분간 처리후, 200 μ l의 제 II 용액(0.02N NaOH, 1% SDS)를 가하고 얼음에서 5분간 방치했다. 제 III 용액(5M potassium acetate)을 150 μ l 넣고 얼음에서 5분간 방치 후 4°C에서 원심분리하고 상층액을 취했다. 여기에 같은 양의 phenol/chloroform을 넣어 plasmid를 추출하고 두배량의 ethanol로 침전시켜 사용하였다.

결과 및 고찰

HcNPV 다각체단백질 유전자의 탐색

HcNPV 다각체단백질의 유전자를 가진 DNA 절편을 탐색하기 위하여 여러가지 probe를 이용하여 southern blot 분석을 행하였다. 먼저 AcNPV EcoRI-I(약 7.3 kb) 절편을 probe로 하여 여러가지 제한효소로 절단한 HcNPV DNA에 southern hybridization한 결과, 이미 다각체단백질 유전자의 존재가 밝혀진 BmNPV DNA의 PstI-F 절편과 EcoRI-E 절편에서 뚜렷하게 잡종화를 이루었으며, HcNPV DNA의 EcoRI과 PstI 절편에서 각각 2개의 밴드가 잡종화되는 것이 관찰되었다(그림 1). 또한 BmNPV PstI-F 절편(약 7 kb)을 probe로 하여 southern hybridization을 행한 결과 HcNPV DNA의 EcoRI과 PstI 절편의 경우 그림 1의 AcNPV EcoRI-I 절편을 probe로 사용하였을 때와 마찬가지로 EcoRI-B와 D 절편에서, 또 PstI-B와 L 절편에서 hybridization되어 2개의 밴드로 나타났으며, PstI의 경우 L 절편에서 뚜렷하였다(그림 2). 다각체단백질 유전자는 Summers 등(1980)이 AcNPV에서 EcoRI-I 절편에서 존재한다고 밝혔고, 그 후 Hooft van Iddekinge 등(1980)에 의해 염기서열이 결정되었으며, Maeda 등(1985) 및 Iatrou 등(1985)에 의해 BmNPV 다각체단백질 유전자의 염기서열도 분석되었다. 그외에 *Spodoptera frugiperda*

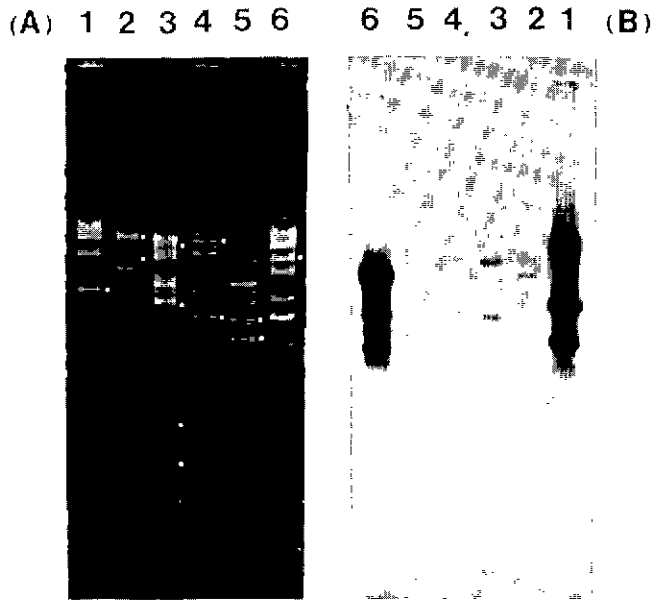


Fig. 1. Southern hybridization of HcNPV DNA restriction digests. HcNPV DNAs were digested with various restriction enzymes, and the digests were resolved on 0.7% agarose gel(A). After electrophoresis the gel digests were subsequently southern transferred to membrane sheets, hybridized to labeled EcoRI fragment containing polyhedrin gene of the AcNPV(B). Lane 1 & 6: BmNPV DNA digested with PstI & EcoRI. Lane 2,3, 4 & 5: HcNPV DNA digested with EcoRI, HindIII, PstI & Sall, respectively.

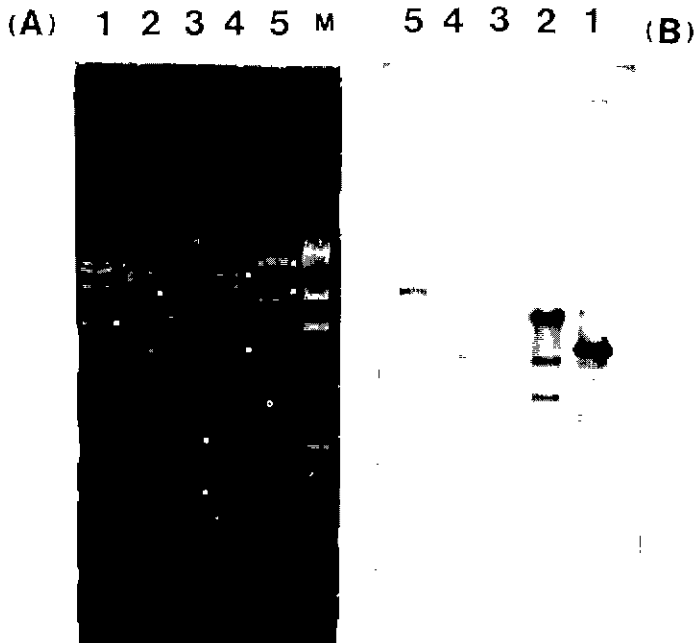


Fig. 2. Southern hybridization of HcNPV DNA restriction digests. HcNPV DNAs were digested with various restriction enzymes, and the digests were resolved on 0.7% agarose gel(A). After electrophoresis the gel digests were subsequently southern transferred to membrane sheets, hybridized to labeled PstI-F fragment containing polyhedrin gene of the BmNPV(B). Lane 1 & 2: BmNPV DNA digested with PstI & EcoRI. Lane 3,4 & 5: HcNPV DNA digested with Sall, PstI & EcoRI, respectively. M: lambda DNA digested with HindIII.

NPV(SfNPV), *Orygia pseudotsugata* NPV (OpNPV) 등 많은 NPV 다각체단백질 유전자에 관해서도 연구되어져 이들 다각체단백질 유전자간에는 상동성이 상당히 높은 것으로 밝혀졌는데, AcNPV와 BmNPV 사이에는 86%, SfNPV의 경우 AcNPV와는 84.4%, OpNPV와는 87.8%, OpMNPV와는 83.2%, BmNPV와는 81.2%로 염기배열 유사성이 높은 것으로 보고하고 있다(Leisy 등 1986a, b, Gonzalez 등 1989). 이미 밝혀진 다각체단백질 유전자의 상동성을 근거로 합성된 oligonucleotide, 5'-CCC ACC ATC GGG CGT ACT TAC CTG TAC GAC-3'에 [γ - 32 P]ATP로 표지한 것을 probe로 하여 제한효소 EcoRI, HindIII, PstI 및 Sall으로 절단한 HcNPV DNA에 southern hybridization 한 결과, 각각 probe와 특이적으로 잡종화되면서 단일 밴드로 나타난 제한효소 절편을 탐색할 수 있었으며, 그 중 PstI-L 절편 (5.3 kb)이 적당한 크기로 생각되었다(그림 3).

HcNPV 다각체단백질 유전자의 클로닝

다각체단백질 유전자간의 상동성을 근거로 합성된 oligonucleotide와 다각체단백질 유전자가 존재하는 것으로 밝혀진 AcNPV EcoRI-I 절편과 BmNPV PstI-F 절편을 probe로 여러가지 제한효소로 절단된 HcNPV DNA와 southern hybridization을 행하여 공통적으로 잡종화된 모양을 보였으며, 적당한 크기로 생각되어지는 PstI-L 절편을 elution 후 pUC18 plasmid DNA에 ligation 시켜서 *E. coli*에서 클로닝하였다. 클로닝된 HcNPV PstI-L 절편을 probe로 하여 다시 제한효소 처리된 BmNPV, AcNPV 및 HcNPV에 southern hybridization을 행하여 올바른 클로닝 여부를 확인하였다(자료생략). 클로닝된 plasmid를 증식, 분리하고 agarose gel 전기영동분석으로 EcoRI, Sall, KpnI, HindIII, SacI, Aval 등의 제한효소 절단부위를 관찰후(그림 4), 제한효소지도를 작성하여 이를 pHcP-L(8.0 kb)이라 명명하였다(그림 5). 또한 클로닝된 pHcP-L 절편 (5.3 kb)의 다각

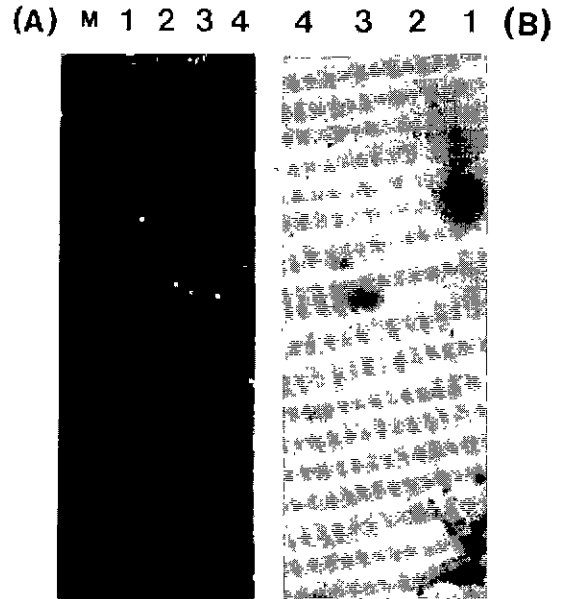


Fig. 3. Southern hybridization of HcNPV DNA restriction digests. HcNPV DNAs were digested with various restriction enzymes, and the digests were resolved on 0.7% agarose gel(A). After electrophoresis the gel digests were subsequently southern transferred to membrane sheets, hybridized to labeled synthetic 30-mer oligonucleotide(B). Lane 1,2,3 & 4: HcNPV digested with EcoRI, HindIII, PstI & Sall. M: lambda DNA digested with HindIII.

체단백질 유전자 부위탐색과 조작을 쉽게하기 위하여 다시 적당한 크기로 subcloning하였다. 먼저 그림 5의 pHcP-L 제한효소지도에 나타나 있는 PstI과 HindIII 절편의 subcloning된 약 2.0 kb를 subcloning 하고 pHcP-L1(4.7 kb)이라 명명하였고, EcoRI과 PstI 절편의 subcloning된 약 4.4 Kb는 pHcP-L2(7.1 kb)라 명명하였다. pHcP-L3(5.3 kb)는 EcoRI과 HindIII 절편 약 2.6 kb를, pHcP-L4(4.2 kb)는 pHcP-L 가운데 HindIII 절편 약 1.5 kb를, 또한 pHcP-L5(4.5 kb)는 HindIII와 PstI 절편 약 1.8 kb를 subcloning하였다(그림 6, 7). 다각체단백질 염기서열은 Hooft van Iddekinge 등 (1983)에 의해 AcNPV에서 다각체단백질 유전자의 전체 염기서열 1,143 bp가 결정되면서, 다각체단백질 코-드 영역은 ATG로 시작하여 TAA로 끝나는 총 732 bp로 구성되어 있고,

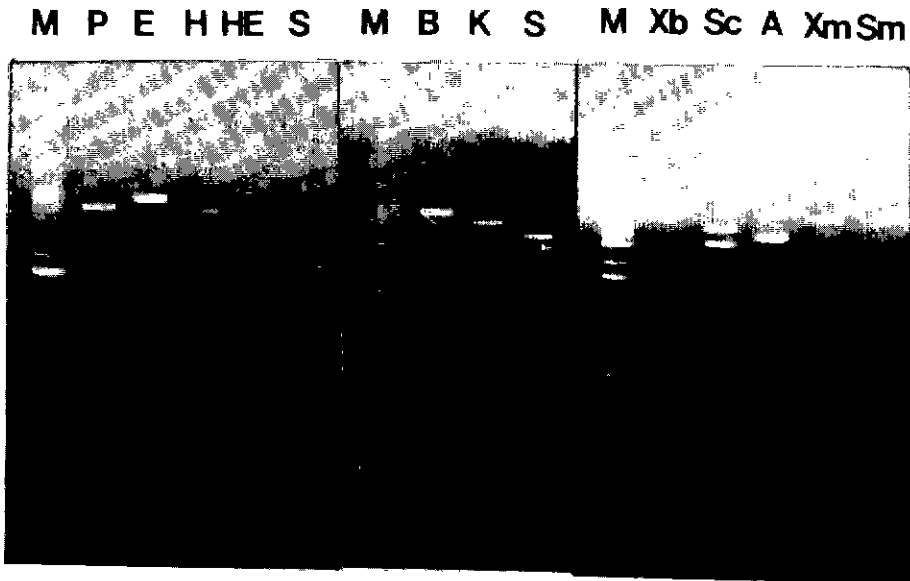


Fig. 4. Restriction endonuclease digestion of pHcP-L. A: *Ava*I, B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, HE: *Hind*III & *Eco*RI, K: *Kpn*I, P: *Pst*I, S: *Sa*II, Sc: *Sac*I, Sm: *Sma*I, Xb: *Xba*I, Xm: *Xma*I, M: 1 kb ladder.

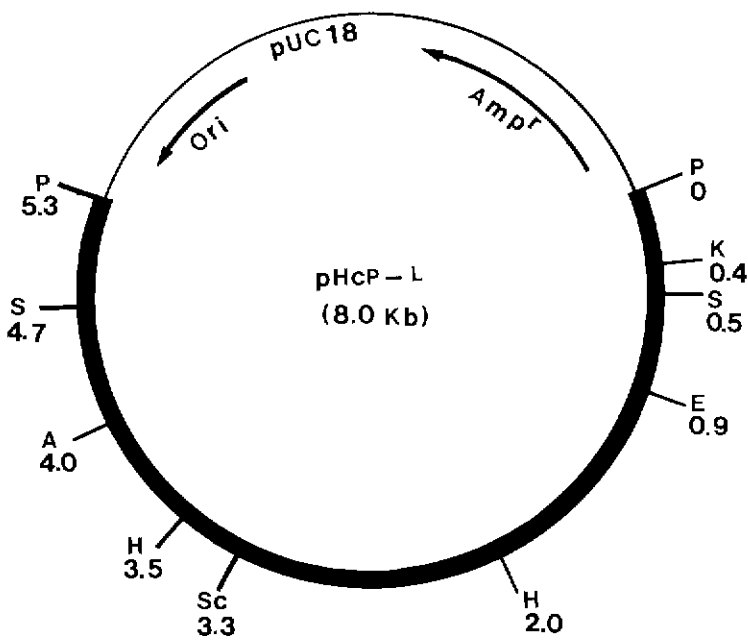


Fig. 5. Restriction endonuclease map of pHcP-L. A: *Ava*I, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, K: *Kpn*I, P: *Pst*I, S: *Sa*II, Sc: *Sac*I.

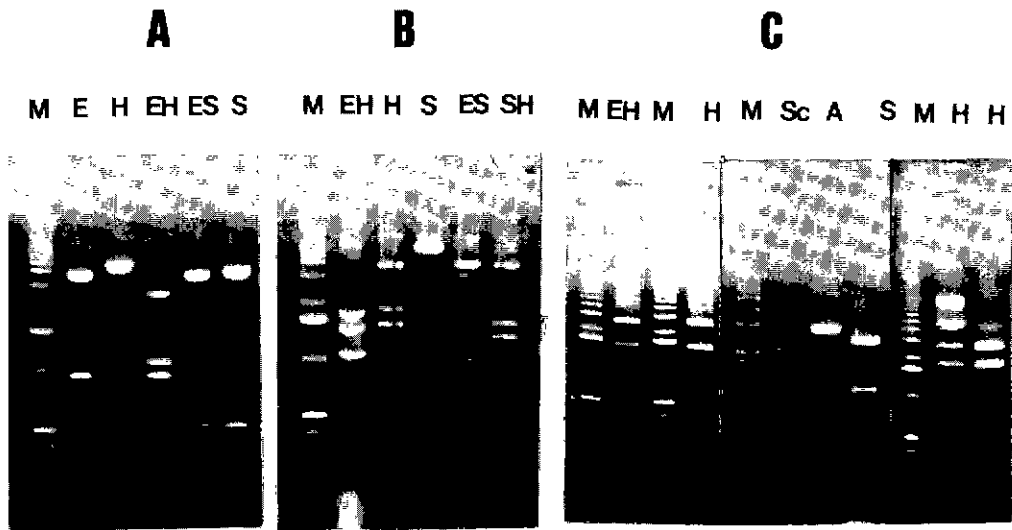


Fig. 6. Restriction endonuclease digestion of pHcP-L1(A), L2(B), L3, L4 & L5(C). A: A_{va}I, E: EcoRI, EH: EcoRI & HindIII, ES: EcoRI & S_{al}I, H: HindIII, S: S_{al}I, Sc: S_{ac}I, M: 1 kb ladder, λ HindIII.

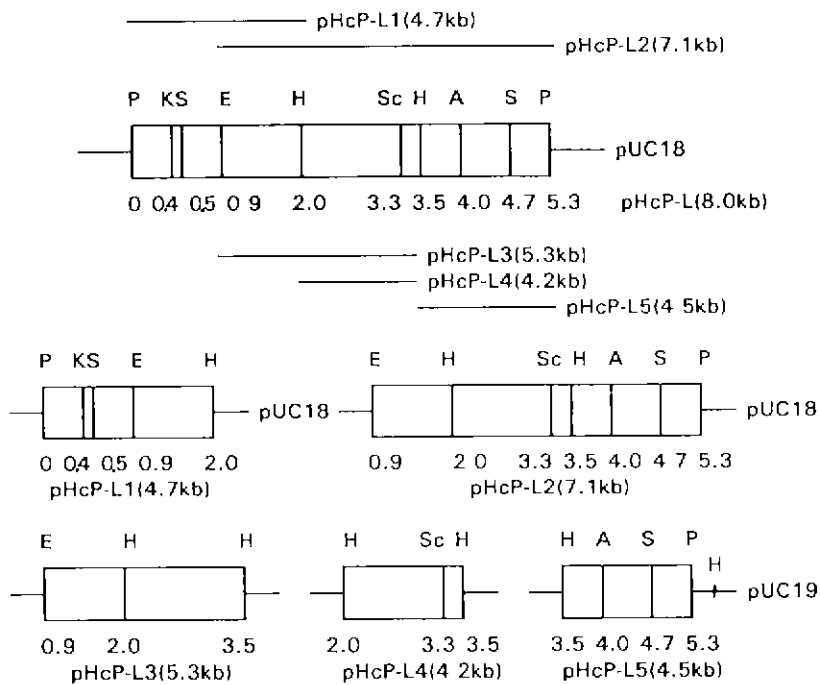


Fig. 7. Restriction endonuclease map of pHcP-L1, L2, L3, L4 & L5. A: A_{va}I, E: EcoRI, H: HindIII, K: KpnI, P: PstI, S: S_{al}I, Sc: S_{ac}I.

이 염기서열로부터 총 244 아미노산 서열이 결정됨으로써, 분자량이 28,872 dalton임이 밝혀졌다. 다각체단백질의 번역개시점(ATG의 A를 +1)으로부터 77 bp와 upstream(-77과 -109)에 "TATA" 및 "CAAT" box에 해당하는 "TAATTA AAAAT"와 "TATCAATAT"가 존재하는 외에, -127과 -141에 "CACAAACT"의 반복배열도 관찰되었으며, 다각체단백질 mRNA는 57 bp인 번역되지 않은 leader 부분을 가지고 있다는 것도 밝혀졌다. 또한 그들은 protein initiation upstream 20~70 nucleotide에서 시작하는 mRNA start site로 생각되는 AT 풍부한 12 nucleotide "AATAAGTATTTTT"가 존재하며, 이 염기서열은 P10 유전자에서도 존재하는 것도 밝혔다. BmNPV 다각체단백질 유전자는 Maeda 등(1985)과 Iatrou 등(1985)에 의해 구명되었으며, AcNPV와 BmNPV 다각체단백질 유전자간의 염기서열상 86%의 상동성이 인정된다고 하였다. 본 연구에서는 현재 HcNPV 다각체단백질 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 우선 subcloning 한 pHcP-L1, pHcP-L2, pHcP-L4, 및 pHcP-L5의 부분적인 sequencing을 수행하여 약 1,500 bp 정도의 염기서열을 밝혔다(자료생략). 본 연구가 더 진전된다면 HcNPV 다각체단백질 유전자의 구조가 밝혀질 것으로 기대되며, 아울러 transfer vector 작성에 의한 새로운 baculovirus 발현벡터의 개발도 가능하리라 전망된다.

인 용 문 헌

- Choe, Y.K., S.M. Byun, H.H. Lee, T.W. Chung, H.Y. Park & S.K. Kang. 1986. A nuclear polyhedrosis virus of *Hyphantria cunea* replicates in vitro. *Biotech. Letters*. 8(12): 853~858.
- Gonzalez, M.A., G.E. Smith & M.D. Summers. 1989. Insertion of the SfNPV polyhedrin gene into an AcNPV polyhedron deletion mutant during viral infection. *Virology* 170: 160~175.
- Hooft van Iddekinge, B.J.L., G.E. Smith & M.D. Summers. 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 131: 561~565.
- Iatrou, K., K. Ito & H. Witkiewicz. 1985. Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 54(2): 436~445.
- 임대준, 현재선, 백운하, 임종성. 1979. 흰불나방 핵다각체 바이러스의 성장과 병원성에 관한 연구. *한국식물보호학회지* 18(1): 1~10.
- 강석권, 박호용, 우건석, 조용섭. 1982. 주요 농작물해충의 미생물학적 방제 I. 흰불나방의 바이러스병. *서울대학교 농학연구* 7(2): 117~124.
- Kelly, D.C. 1985. The structure and physical characteristics of baculoviruses. In *Viral Insecticides for Biological Control*. pp. 469~488. Edited by K.E. Shermann & K. Maramorosch, Academic Press, New York & London.
- Leisy, D., M. Nesson, M. Pearson, G. Rohrman & G. Beaudreau. 1986. Location and nucleotide sequence of the *Orygia pseudotsugata* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. *J. Gen. Virol.* 67: 1073~1079.
- Leisy, D., G. Rohrman & G. Beaudreau. 1986. The nucleotide sequence of the polyhedrin gene region from the multicapsid baculovirus of *Orygia pseudotsugata*. *Virology* 153: 280~288.
- Lightner, D.V. & R.M. Redman. 1981. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Panaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 299~302.
- Loh, L.C., J.J. Hamm, C. Kawanishi & E.S. Huang. 1982. Analysis of the *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome by restriction endonuclease and electron microscopy. *J. Virol.* 44(2): 747~751.
- Luckow, V.A. & M.D. Summers. 1988 a. Signals important for high level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 167: 56~71.
- Luckow, V.A. & M.D. Summers. 1988 b. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*. 6: 47~55.
- Luckow, V.A. & M.D. Summers. 1989. High level expression nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*. 170: 31~39.
- Maeda, S. 1989. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 351~372.
- Maeda, S., T. Kwai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato & M. Furusawa. 1985. Production of human α -interferon in the silkworm using baculovirus vector. *Nature*. 315: 592~594.
- 박호용. 1983. 흰불나방의 Baculoviruses에 관한 연

- 구. 서울대학교 대학원 석사학위 논문: 57pp.
- 박호용. 1992. 곤충세포배양을 이용한 유용물질생산. 생물화학 6(4): 47~59.
- Pennock, G.D., C. Shoemaker & L.K. Miller. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4: 399~406.
- Rohrmann, G.F. 1986. Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* 67: 1499~1513.
- 류강선, 박호용, 김근영, 강석권. 1984. 해충병원 바이러스의 분리동정과 바이러스 농약개발 I. 흰불나방 핵다각체병 바이러스감염 지방조직세포의 전자현미경관찰과 바이러스의 병원성. 서울대학교 농학연구 9(1): 39~51.
- Smith, G.E. & M.D. Summers. 1979. Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoptusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases SmaI, KpnI, SacI, XhoI and EcoRI. *J. Virol.* 30(3): 828~838.
- Smith, G.E. & M.J. Fraser & M.D. Summers. 1983 a. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46: 584~593.
- Smith, G.E., M.D. Summers. M.J. Fraser. 1983b. Production of human α -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3(12): 2156~2165.
- Summers, M.D., G.E. Smith, J.D. Knell & J.P. Brand. 1980. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedrosis virus recombinants. *J. Virol.* 34: 693~703.
- Vlak, J.M. & G.E. Rohrman. 1985. The nature of polyhedrin. In *Viral Pesticides for Biological Control*. pp. 489-542, Edited by K.E. Shermann & Maramorosch. Academic Press, New York & London.
- Weyer, U., S. Knight & R.R. Possee. 1990. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vector. *J. Gen. Virol.* 71: 1525~1534.

(1992년 12월 9일 접수)