

누에 및 *Autographa californica* 核多角體病 바이러스에 대한 遺傳子 再組合

Genomic Recombination of *Bombyx mori* and *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Viruses

禹秀東 · 朴範錫¹ · 朴芝玄 · 鄭仁植² · 梁在明³ · 姜錫權

Soo Dong Woo, Beom Seok Park¹, Ji Hyun Park, In Shik Chung², Jai Myung Yang³ and
Seok Kwon Kang

ABSTRACT Twelve recombinant viruses with wider host range were plaque purified after coinfection of *Autographa californica* and *Bombyx mori* NPVs into Sf9 or BmN-4 cells. Restriction endonucleases analysis of the recombinant's DNAs showed that the recombination between AcNPV and BmNPV genomes had occurred more than once. When the recombinant RecB-8, derived from BmN-4 cells, was observed by electron microscopy, the shape of the polyhedron was a regular tetrahedron, and few virions were occluded into a polyhedron.

KEY WORDS Nuclear Polyhedrosis Virus, coinfection, recombination, wider host range

초 록 숙주범위가 서로 다른 *Autographa californica* NPV(AcNPV)와 *Bombyx mori* NPV(BmNPV)를 *Spodoptera frugiperda*(Sf9) 또는 *Bombyx mori*(BmN-4)의 세포에 동시감염(coinfection)시킨 후, 숙주범위가 확장된 재조합 바이러스를 Sf9세포에서 10종 BmN-4세포에서 2종씩 플라크 순화하여 선별하였다. 각 재조합 바이러스 DNA의 제한효소 분석결과는 한번 이상의 재조합이 일어났음을 보여주었다. 재조합 바이러스 RecB-8의 전자현미경 관찰결과는 다각체의 모양이 모바이러스인 AcNPV나 BmNPV와는 전혀 다른 정사면체 모양이었으며 또한, 모바이러스와는 달리 virion이 다각체에 거의 메립되어 있지 않은 특징을 보였다.

검 색 어 핵다각체병 바이러스, 동시감염, 재조합, 숙주범위확대

核多角體病 바이러스 (nuclear polyhedrosis virus: NPV)는 baculovirus subgroup A에 속하는 곤충 병원성 바이러스로 double-stranded supercoiled DNA genome과 11-25종의 構造蛋白質로 구성된 nucleocapsid가 envelope에 싸여서 바이러스 입자를 형성하고 있다(Kelly 1985). NPV는 특히 나비目 곤충의 유충에 강

한 병원성을 보여서, 현재 수종의 NPV가 微生物 殺蟲劑로 개발·사용되고 있다. 한편, NPV의 살충제로서의 효과를 증진시키고자 그 病原性, 複製過程, 바이러스 生産性 및 分子遺傳學的 性狀등 다양한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Tomalski 등 1992, Russ 등 1992).

본 연구는 NPV의 높은 宿主 特異性에서 비

서울大學校 農業生物新素材 研究센터(Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University)
1 農村振興廳 遺傳工學研究所(Agriculture Biotechnology Institute, R.D.A.)
2 慶熙大學校 遺傳工學科(Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University)
3 西江大學校 生物學科(Department of Biology, Sogang University)

롯되는 좁은 殺蟲範圍에 따른, 微生物 殺蟲劑로서 NPV 제제의 개발과 생산 및 적용에 따르는 비경제성과 대량증식을 위한 숙주선택 제한 등의 단점을 극복하고자, NPV의 宿主範圍를 결정하는 요인을 규명하기 위하여 시작되었다. 최근에 Kondo와 Maeda(1991)가 遺傳子再組합을 통한 NPV 宿主範圍 擴張 결과를 보고한 바 있으나, 우리는 우선 *Autographa californica* NPV(AcNPV)와 *Bombyx mori* NPV(BmNPV)를 Sf9 또는 BmN-4 각 세포주에 동시감염하고 숙주범위가 넓어진 遺傳子再組합 바이러스를 선별하여 그 形態學的 및 遺傳學的인 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

바이러스

供試 바이러스는 국내의 蠶業 農家에서 분리하여 본 연구실에 보관중이던 BmNPV와 미국에서 도입한 AcNPV를 누에 幼蟲(*B. mori*)과 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 幼蟲에서 각각 증식하여 사용하였다.

昆蟲細胞株 및 培養

Sf9 培養細胞株는 *Spodoptera frugiperda*의 卵巢에서 유래된 것으로 미국 Idaho 대학교의 Miller 박사로부터 분양받았으며, *Bombyx mori* (BmN-4) 培養細胞株 역시 *B. mori* 卵巢에서 유래된 것으로 일본 잠사곤충 농업기술연구소의 小林亭 박사로부터 분양받아 Summers와 Smith의 방법(1987)에 따라 10% fetal bovine serum(Sigma Co.)이 함유된 Insect Grace's medium과 TC-100 medium으로 27°C 항온기에서 繼代培養 하며 실험에 사용하였다.

昆蟲細胞株에 대한 바이러스 感染

昆蟲 培養細胞株에 대한 바이러스의 초기감염은 NPV에 감염된 유충의 腹肢를 잘라, 얼음으로 냉각시킨 튜브에서 혈액을 채취하고 10,000rpm으로 4°C에서 1분간 원심 분리하여 혈

구와 세포파편 및 다각체를 제거하고, 上淸液을 serum이 함유되지 않은 배양액으로 희석한 후, 0.45 μ m millipore filter로 여과하여 monolayer가 형성된 배양세포에 접종하였다. 접종 1시간 후 감염되지않은 바이러스 입자를 제거하기 위하여 10% serum이 함유된 새 배양액으로 2~3회 세척하고 최종적으로 5ml를 첨가하여 27°C 항온기에서 배양하였다. 접종 2~3일 후부터 도립현미경으로 세포내 다각체 형성을 관찰하여 감염유무를 확인하였다.

宿主範圍 擴張을 위한 바이러스의 同時感染

宿主範圍가 擴張된 再組합 바이러스의 선별을 위해 AcNPV와 BmNPV의 NOV(non-occluded virus)를 혼합하여 Sf9세포와 BmN-4세포주 각각에 세포당 5 PFU/ml의 농도로 同時感染을 하였다. 그 외의 방법은 Summers와 Smith(1987)의 바이러스 접종법과 동일하였다. 세포내에서 다각체가 형성되어지는 접종 3~5일 후에 각 동시감염 배양액의 NOV를 반대세포에서 플라크 검정하였다. 형성된 플라크의 크기와 다각체 형성 모양이 AcNPV 또는 BmNPV와 차이가 있는 플라크를 분리하여 2~3회 플라크 순화를 반복하였다.

플라크 검정

昆蟲 培養細胞株를 60×15mm 배양플레이트당 2.0×10⁶개로 분주하여 1시간동안 정치한 후, 배양액을 제거하고 준비한 바이러스액 1ml을 접종하여 27°C에서 1시간동안 배양하였다. 그 후 접종액을 제거하고 새 배양액으로 2회 세척하여 감염되지않은 바이러스를 제거하고 Sea Plaque Agarose(Sigma Co.)가 1.5% 함유된 배양액을 3ml보충하여 27°C에서 배양하였다. 접종 2~3일 후 부터 플라크형성 유무를 도립현미경으로 관찰하였다.

바이러스 DNA의 分離 및 制限酵素 分析

바이러스 DNA의 분리는 Smith와 Summers(1982)방법에 따라 바이러스에 감염된 死蟲을

마쇄, 여과한 후 40~65%(W/W) sucrose density gradient를 작성하고, 24,000rpm(Hitachi, SRP-28SA)으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 순수한 다각체를 분리하였다. 정제된 다각체는 알칼리용액(0.1M Na₂CO₃, 0.17M NaCl, 0.01M EDTA, pH10.9)에 부유시켜 37°C에서 1시간 처리한 후, 원심분리하여 上淸液에 1% SDS와 Proteinase K가 0.5mg/ml(Sigma Co.)가 되도록 각각 첨가하여 50°C에서 1시간 처리하였다. 그 후 phenol/chloroform방법으로 정제하고 냉에탄올로 DNA침전을 얻은 후, TE buffer에 녹여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 배양세포로부터 바이러스 분리는 감염된 배양세포액을 5,000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 上淸液을 25,000rpm으로 4°C에서 1시간 동안 원심 분리하여 NOV침전을 얻었으며, 그 밖의 DNA 추출방법은 앞서와 동일하였다. 전기영동 분석은 DNA에 여러가지 제한효소를 처리한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

電子顯微鏡 觀察

정제된 다각체를 알루미늄 원반 시료대위에 서 자연건조시킨 후 탄소와 금으로 coating하여 주사전자현미경(Hitachi, S-570)으로 관찰하였다. 배양세포내 바이러스 관찰은 접종 후 72시간이 경과된 세포를 수거하여 2,000×g, 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 3% glutaraldehyde로 1차 고정하고 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 충분히 씻은 후, 1% OsO₄를 함유한 同 완충액에서 2차 고정하였다. 그 후 50, 70, 90, 100%에탄올 및 100%아세톤으로 탈수하고 EPON수지(EPON812)에 포매한 뒤, LKB-Ultratome(MT-5000)으로 초박절편을 작성하여 전자현미경(HU-12A형과 JEOL-1200EX형)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

宿主範圍 比較

宿主範圍가 서로 다른 두가지 NPV를 이용하여 宿主範圍 擴大와 더불어 그 메카니즘을 규명하고자, 우선 NPV의 숙주범위를 *in vivo*와 *in vitro*에서 비교하였다. AcNPV와 BmNPV의 感染性을 *in vivo*에서 누에(*B. mori*)와 과밤나방(*S. exigua*) 幼蟲을, *in vitro*에서 Sf9세포와 BmN-4세포를 이용하여 조사한 결과, 두 바이러스는 서로 交叉感染性이 없었다(표 1).

Table 1. Comparison of infectivity between *Autographa californica* NPV(AcNPV) and *Bombyx mori* NPV(BmNPV).

Host	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Sf9 cell	BmN-4 cell	<i>S. exigua</i>	<i>B. mori</i>
AcNPV	○	×	○	×
BmNPV	×	○	×	○
Rees(12)	○	○	○	○

○ : high infectivity × : no infectivity

이와 같이 두 바이러스가 서로 交叉感染性이 없다는 결과에 따라 본 실험에서 목적한 宿主範圍 擴張을 위한 再組合 실험의 재료로서 이들을 적합한 바이러스로 판단할 수 있었으며, genome 類似性도 매우 높다고 보고되어 있으므로(Iatrou et al. 1985) 遙傳子 再組合 실험의 실험 가능성을 예측할 수 있었다.

同時感染 및 플라크 純化

서로 交叉感染性이 없는 AcNPV와 BmNPV의 virion을 Sf9세포에서 1시간 동안 동시감염시킨 후, 남아있는 virion을 가능한 완전히 제거하기 위하여 새 배양액으로 2~3회 세척해낸 후 27°C 항온기에서 배양하였다. 접종 3~4일 후, 증식된 바이러스 다각체가 Sf9 세포내에서 형성될 때, 감염된 세포배양액을 수거하고 BmN-4세포에서 플라크 검정하였다. 이때 플라크의 크기 및 모양, 형성되는 다각체의 모양이 외형상으로 모바이러스인 BmNPV와 차이가 있다고 판단되는 플라크를 선발하여 다시 Sf9세포에서 플라크 검정하였다. 필요에 따라서는 이러한 플라크 純化를 수차례 반복하여

미쳐 제거되지않고 남아있거나 플라크 채취시
쉬일 수 있는 인접 플라크의 바이러스를 제외

시킬 수 있었다(그림 1). 그리고 BmN-4세포
에서 동시감염 시킨 경우에도 위와 같은 플라

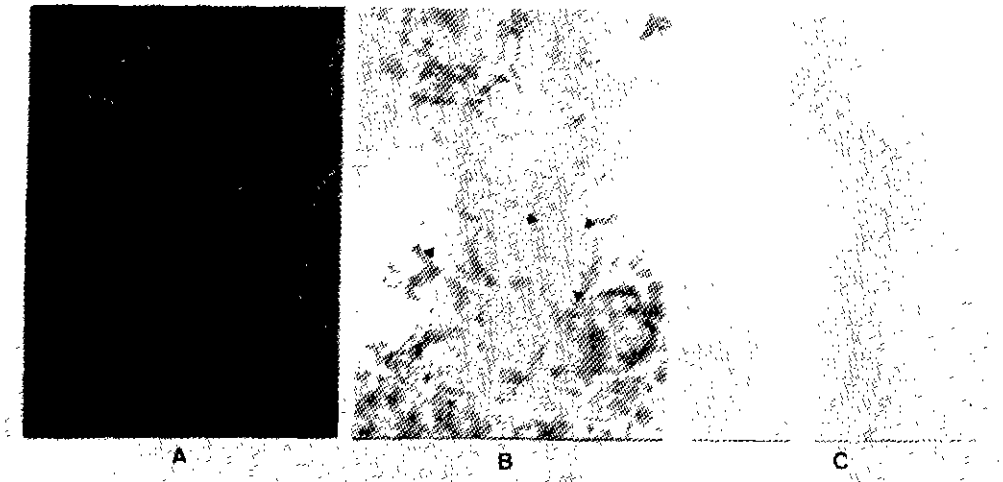


Fig. 1. Plaques were produced on a Sf9 cell monolayer infected with recombinant virus RecB-8 at 72h p. i. (A : $\times 50$, B : $\times 300$). Sf9 cells were infected with recombinant virus RecB-8 (C : $\times 200$).

크 검정 순화하였다. 이러한 과정을 통해, 현재
Sf9세포에서 동시감염시킨 경우 宿主範圍가 擴
張된 10개의 再組合 바이러스를, 그리고 BmN
-4세포에서 동시감염 시킨 경우 2개의 再組合
바이러스를 선발하였다(표 1).

再組合 바이러스 DNA의 制限酵素 分析

재조합 바이러스의 DNA를 분리하기 위하여
宿主範圍가 擴張된 각각의 再組合 바이러스 배
양액을 초원심 분리하여 NOV침전을 얻은 후,
Summers와 Smith(1987)의 방법에 따라 SDS/
Proteinase K, Phenol/chloroform으로 정제한
DNA에 여러가지의 제한효소를 처리하고 그
DNA 패턴을 母바이러스(AcNPV 및 BmNPV)
와 비교하였다. 그림 2에서 볼 수 있는 것과
같이 각 재조합 바이러스 DNA의 제한효소 패
턴이 母바이러스와 서로 相異함을 볼 때 再組
합이 일어났음을 알 수 있었으며, 또한 제한효
소에 따라 여러 fragments에서 차이를 보이는
것으로 보아 DNA간의 再組合이 상당히 넓은
영역에서 한번 이상 일어났음을 지적해 주고

있다. 그리고 처음 동시감염이 BmN-4세포에
서 일어난 재조합 바이러스중 한개(RecB-727)
를 제외한 모든 바이러스가 주로 BmNPV 보
다 AcNPV의 DNA와 비슷한 제한효소패턴을
나타내었다. 이것은 genome간의 再組合과정
이 AcNPV가 중심이되어 BmNPV DNA를 일부
획득하여 일어났음을 지적해 주고있으며, 宿
主範圍의 擴張 역시, AcNPV가 BmNPV의 숙
주 범위 決定因子를 획득했음을 시사해주고 있다.

電子顯微鏡 觀察

선발된 再組合바이러스들의 주사전자현미경
관찰결과에서 동시감염이 BmN-4세포에서 일
어난 RecB-8의 경우 母바이러스의 일반적인
형태인 AcNPV의 육면체, BmNPV의 이십면체
와는 다른 정사면체 모양을 보였다(그림 3).
이러한 결과는 Carstens 등(1986)이 다각체 단
백질 유전자내의 BamHI site에서 point muta
tion의 결과, 아미노산 변경으로 인하여 다각체
모양이 정육면체로 변화한다고 보고한 것과 같
이, 再組合 바이러스 RecB-8의 다각체 모양이

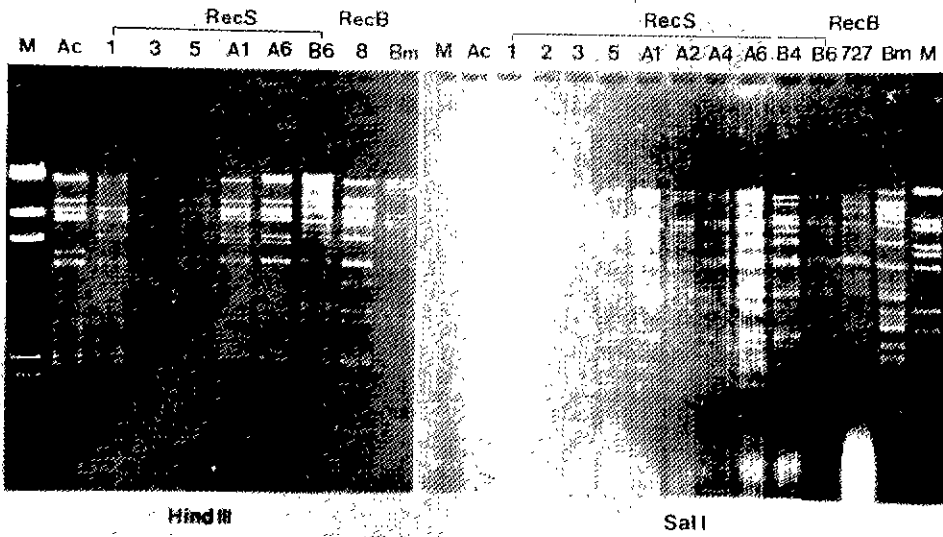


Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of recombinant viruses DNAs derived from Sf9 cells(RecS-) or BmN-4 cells(RecB-), which had been conected with AcNPV and BmNPV. Purified viral DNAs of recombinant and parent viruses were cleaved with Hind III and Sal I, and electrophoresed on a 0.7% agarose gel. Lane M, lambda DNA cleaved with Hind III.

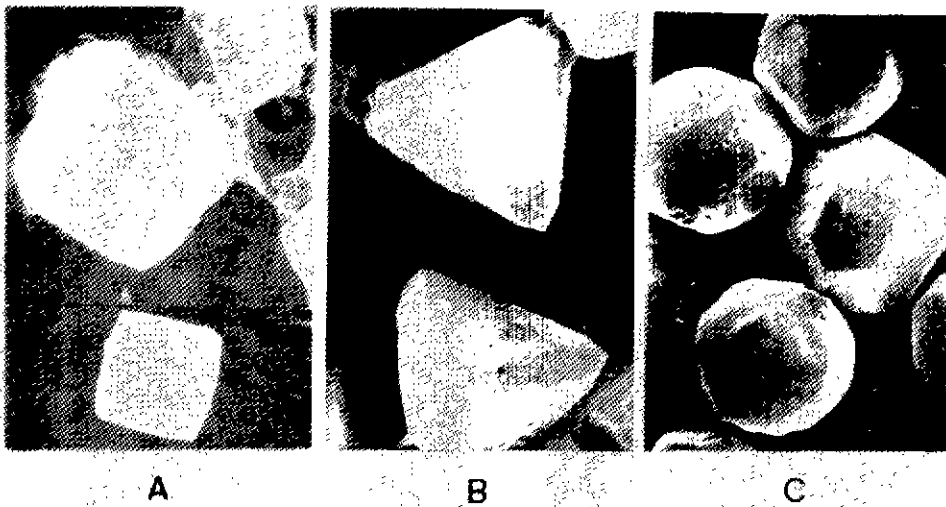


Fig. 3. Polyhedron of parent viruses(AcNPV and BmNPV) and recombinant virus RecB-8 were examined by scanning electron microscopy. The recombinant virus RecB-8 came from BmN-4 cells which had been conected with AcNPV and BmNPV. The shape of the polyhedron of RecB-8 is a regular tetrahedron. Abbreviation: A, AcNPV ($\times 7,000$); B, RecB-8 ($\times 8,000$); C, BmNPV ($\times 10,000$).

母바이러스에서는 볼 수 없었던 정사면체로 변
한 결과도 두 바이러스 遺傳子간의 자연 再組

합 과정에서 宿主範圍에 관련된 因子 뿐 만 아
니라, 다각체 단백질의 유전자 내에서 일부 再

組合이 일어남으로써 이러한 결과를 나타내는 것으로 추측할 수 있다.

그리고 RecB-8의 투과전자현미경 관찰결과는 바이러스 입자(virion)가 母바이러스와 비교관찰할 때 다각체에 거의 埋立되지 않는 결과를 보였다(그림 4). 다각체내에 virion이 埋

立 되지 않는 결과에 대해서는 Fuxa등(1992)이 感染性이 없는 즉, virion이 埋立되어 있지 않은 다각체의 垂直的 傳播에 대한 관찰 결과를 보고한 바 있으며, RecB-8의 경우에는 宿主範圍의 확장과 더불어 이러한 결과를 나타낸 것이 특징적이라 할 수 있다.

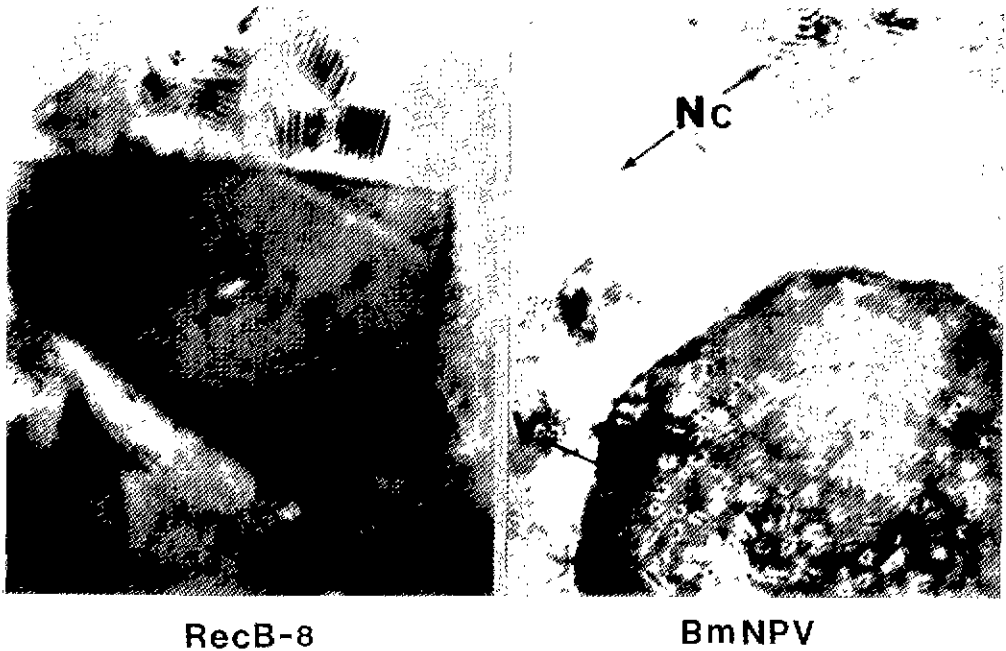


Fig. 4. Transmission electron micrographs of Sf9 cell and BmN-4 cell infected with RecB-8 and BmNPV, respectively. Abbreviation : Nc, Nucleocapsid; P, Polyhedron; V, Virion.

또한 RecB-8을 Sf9세포에 감염시킨 경우 약 90%이상의 세포가 감염되지만 다각체의 크기가 AcNPV와 비교할 때 비교적 크게 보였으나, 세포당 다각체 수는 1~4개로 그 수가 현저히 적게 나타났다. 또한 BmN-4세포에 감염시킨 경우에는 다각체의 크기 및 세포당 감염수는 BmNPV와 크게 다르지 않았으나 세포감염율이 현저히 낮아서 전체세포의 30~40%만이 다각체를 형성하였다. 이러한 결과에 대해서는 세포배양을 통한 바이러스의 계속적인 증식이 세포내 다각체수의 감소를 일으킨다는 보고가 있었으며(Mackinnon 등 1974, Polter 등 1976), 이것이 그 유전자 변화와 관련되어 있다는 보고가 있었다(Crozier & Quoit 1981).

현재, NPV의 宿主範圍를 결정하는 因子는 아직 정확히 알려져 있지 않다. 蝨추동물 바이러스의 경우에는 宿主細胞 수용체(receptor)에 바이러스의 초기 흡착이 감염의 중요한 과정으로 여겨지고 있으며(Lenz 1990), NPV의 경우에도 감염과정에서 바이러스 envelope단백질인 gp64가 바이러스 입자의 宿主細胞表面 흡착에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다(Volkman 등 1984). 또한 granulosis virus는 위식막(peritrophic membrane)의 파괴에 의해 NPV의 숙주세포 부착효율을 높여 주는 것으로 알려져 있으며(Yamamoto & Tanada 1978), AcNPV의 경우 거의 모든 비감염성 곤충세포의 핵에 침입할 수 있는 것으로 보아 그 宿主範圍를 결정

하는 메카니즘은 주로 바이러스 genome과 연관되어 있다고 알려져 있다(Carbonell & Miller 1987).

재조합 바이러스 DNA의 분석결과에 따라 앞으로 NPV의 숙주범위를 결정하는 인자가 완전히 규명되어, 숙주범위를 인의로 조절할 수 있게 되면 바이러스 살충제의 개발을 활성화함은 물론 baculovirus expression vector에도 그 응용성이 기대된다.

사 사

본 논문은 1992년도 과학기술처 시행 특정연구개발 사업의 연구 결과중 일부임.

인 용 문 헌

- Carbonell, L.F. & L.K. Miller. 1987. Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1412~1417.
- Carstens, E.B., A. Krebs & C.E. Gallerneault. 1986. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *J. Virol.* 58: 684~688.
- Crozier, G. & J.M. Quoit. 1981. Obtention and analysis of two genetic recombinants of baculoviruses of Lepidoptera, *Autographa californica* Speyer and *Galleria mellonella* L. *Annales de Virologie.* 132: 3~18.
- Fuxa, J.R., E.H. Weidner & A.R. Richter. 1992. Polyhedra without virions in a vertically transmitted nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 53~58.
- Iatrou, K., K. Ito & H. Witkiewicz. 1985. Polyhedrin gene of *Bombyx mori* Nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 54: 436~445.
- Kondo, A. & S. Maeda. 1991. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 65: 3625~3632.
- Lenz, T.L. 1990. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *J. Gen. Virol.* 71: 751~766.
- Mackinnon, E.A., J.F. Henderson, D.B. Stoltz & P. Faulkner. 1974. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro. *J. Ultrastruct. Res.* 49: 419~435.
- Potter, K.N., P. Faulkner & E.A. Mackinnon. 1976. Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 18: 1040~1050.
- Russ E., D.R. O'Reilly, B.D. Hammock & L.K. Miller. 1992. Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1583~1591.
- Smith, G.E. & M.D. Summers. 1982. DNA homology among subgroup A, B, and C baculoviruses. *Virology* 123: 393~406.
- Summers, M.D. & G.E. Smith. 1987. A methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
- Tomalski, M.D. & L.K. Miller. 1992. Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides. *Bio/Technology.* 10: 545~549.
- Volkman, L.E., P.A. Goldsmith, R.T. Hess & P. Faulkner. 1984. Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. *Virology.* 133: 354~362.
- Yamamoto, T. & T. Tanada. 1978. Phospholipid, an enhancing component in the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 48~56.

(1993년 7월 8일 접수)