

담배나방 핵다각체병바이러스의 형태 및 생화학적 특성

Morphology and Biochemical Characteristics of a Nuclear Polyhedrosis Virus Isolated from the Oriental Tobacco Budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenee)

진병래¹ · 박현우¹ · 우수동¹ · 김우진¹ · 박범석² · 강석권¹
Byung Rae Jin¹, Hyun Woo Park¹, Soo Dong Woo¹,
Woo Jin Kim¹, Beom Seok Park² and Seok Kwon Kang¹

ABSTRACT A nuclear polyhedrosis virus isolated from the oriental tobacco budworm larvae, *Helicoverpa assulta* (Guenee) was characterized by electron microscopy, SDS-PAGE, restriction endonuclease analysis and cross infectivity. The shape of a polyhedron was 1.0 μ m in average with icosahedral outline, and the virus particle was 65 nm \times 300 nm in average with rod-shape. The nuclear polyhedrosis virus was contained a single nucleocapsid within a viral envelope embedded in a polyhedron. The polyhedral protein was composed of a single polypeptide with a M.W of 31 Kd. The genome size of the virus by restriction endonuclease analysis was about 120 Kb. Among several nuclear polyhedrosis viruses, the nuclear polyhedrosis virus from *Helicoverpa assulta* (HaNPV) and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) were infected the oriental tobacco budworm larvae.

KEY WORDS *Helicoverpa assulta*, nuclear polyhedrosis virus, polyhedral protein, viral DNA

초 록 담배와 고추의 주요해충인 담배나방 [*Helicoverpa assulta*(Guenee)]의 미생물적 방제법을 개발하기 위하여, 아직 국내에서 보고되지 않은 담배나방 핵다각체병 바이러스를 담배나방 사충으로 부터 분리하고, 바이러스의 전자현미경 관찰 및 바이러스 DNA의 제한효소 분석 등을 통한 생화학적 특성을 조사하였다. 담배나방 핵다각체병 바이러스의 다각체는 구형에 가까운 20면체로서 크기는 평균 약 1.0 μ m 정도이고, 다수의 바이러스 입자가 다각체 단백질에 포매되어 있었다. 포매된 바이러스 입자는 한개의 봉상 nucleocapsid가 하나의 envelope 내에 매립된 형태의 SNPV(single embedded nuclear polyhedrosis virus)로, 형태는 전형적인 봉상으로서 그 크기는 약 65 nm \times 300 nm였다. 또한 다각체 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과, 분자량은 약 31 Kd이었으며, 담배나방 핵다각체병바이러스 DNA를 분리하여 EcoRI, HindIII 등 수종의 제한효소로 처리분석한 결과, 그 genome의 크기는 약 120 Kb 정도였다. 본 핵다각체병바이러스는 담배나방 유충에만 병원성을 나타내 기주특이성을 보였다.

검색어 담배나방, 핵다각체병바이러스, 다각체 단백질, 바이러스 DNA

담배나방 [*Helicoverpa assulta* (Guenee)]은 우리나라를 비롯하여 일본, 중국, 호주 및 아프리카 등지에 분포하고 있으며, 담배와 고추를 가해하는 주요해충으로 특히 우리나라의 경우 고추에 심각한 피해를 주고 있다. 그러나 담배나방은 특이한 가해 양상으로 인하여 실제 야외에서 화학살충제로 방제

함에 있어서 어려움이 많고, 또한 일부 살충제에 대한 저항성을 보이고 있다. 이러한 점에서 담배나방의 효과적인 방제를 위해서는 곤충 유효병원 미생물인 *Bacillus thuringiensis*나 곤충 바이러스를 이용한 미생물적 방제법이 환경오염, 저항성 및 잔류독성 등을 고려할 때 효과적인 방제법 중의 하나로 가능성이

¹ 서울대학교 농업생명과학대학(College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)
² 농촌진흥청 농업과학기술원(Agricultural Science and Technology Institute, Rural Development Administration, Suwon 441-744, Korea)

높다

곤충 유효병원 미생물중 바이러스는 특히 baculovirus subgroup A에 속하는 핵다각체병바이러스는 circular double-stranded DNA를 갖는 봉상 바이러스로 다각체 단백질내에 바이러스 입자가 매립되어 있는 특이한 구조로 인하여(Matthews 1982, Harrap 1972a, b), 바이러스 살충제 개발에 관한 많은 연구와 더불어 이미 10여종이 상품화되어 있으며, 주로 핵다각체병바이러스가 이용되고 있다(岡田 1994) 또한 국내에서도 흰불나방(*Hyphantria cunea*) (진 등 1987), 담배겨세미나방(*Spodoptera litura*) 및 과밤나방(*S. exigua*) 등의 해충방제에 핵다각체병 바이러스를 이용한 방제 연구가 시도되고 있다(임 등 1990a, b, 장 등 1995).

한편, 담배나방 방제를 위해 중국에서 담배나방 핵다각체병바이러스를 분리했다는 보고는 있었지만, 아직 그 생화학적 특성 등에 대한 연구 결과는 보고되지 않고 있다(Dongru & Hui 1992). 국내의 경우 담배나방에서 세포질다각체병바이러스는 이미 분리되어 그 특성 연구 등에 대한 결과가 보고되었으나(임 등 1991), 아직 핵다각체병바이러스의 분리는 보고되지 않고 있다.

따라서 본 연구는 아직 국내에서 보고되지 않은 담배나방 핵다각체병바이러스를 담배나방 사충으로부터 분리하고, 바이러스의 전자현미경 관찰 및 바이러스 DNA의 제한효소 분석등으로 담배나방 핵다각체병바이러스의 생화학적 특성을 조사하여 담배나방의 미생물적 방제 이용 기술을 얻고자 수행하였다

재료 및 방법

바이러스

담배나방 핵다각체병바이러스(*Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus; HaNPV)는 경기도 일원에서 채집된 담배나방을 살내 누대사육중 담배나방 사충으로부터 분리하였고, 담배나방 유충을 인공사료로 계대 사용하면서 교차감염 조사와 바이러스 증식에 사용하였다.

다각체 분리

HaNPV 감염 사충을 마쇄하여 거즈로 여과한 후,

원심분리(3,000 rpm, 5분)를 3~4회 반복하여 부분 정제된 다각체를 0.01% SDS용액에 부유시키고 sonication하여, 40~65%(W/W) sucrose density gradient를 작성, 24,000 rpm(Hitachi, SRP-28SA)에서 30분간 원심분리하여 순수한 다각체를 분리하였다.

바이러스입자 분리

바이러스입자의 분리는 순수하게 정제된 다각체를 알칼리 용액(0.1 M Na₂CO₃, 0.01 M EDTA, 0.17 M NaCl, pH 10.9)에 부유시켜 37°C에서 30분간 처리한 후, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 용해되지 않은 침전물은 제거하고, 상청액을 30~60% sucrose density gradient를 이용 25,000 rpm(Hitachi, SRP-28SA)에서 90분간 원심분리하여 바이러스 입자를 분리하였다.

전자현미경 관찰

다각체의 외부 형태 관찰은 정제된 HaNPV 다각체를 알루미늄 시료대 위에 도말한 후, critical-point-drying하여 건조시키고 금으로 coating하여 주사 전자현미경(Phillips SEM 515)으로 관찰하였다. 다각체의 내부구조 관찰은 정제된 다각체를 3% glutaraldehyde로 고정하고, 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 충분히 씻은 후, osmium tetroxide를 함유한 동완충액에서 2차 고정하였다 그 후 50, 70, 90, 100%의 ethanol과 100% acetone으로 탈수하고, Epon 수지(Epon 812)에 포매한 뒤, LKB-Ultratome(MT 5000)으로 초박절편을 제작하여 투과 전자현미경(Hitachi HU-II)으로 관찰하였다. 바이러스 입자의 형태 관찰은 정제된 바이러스 입자를 carbon으로 coating된 시료대 위에 흡착시킨 후, 2% uranyl acetate로 염색하여 투과 전자현미경(Hitachi HU-II)으로 관찰하였다.

다각체단백질의 전기영동

다각체단백질 분리는 생체 증식된 다각체에 혼재되어 있는 alkaline protease를 불활화시키기 위하여 정제된 다각체를 100°C에서 10분간 가열한 후(Wood, 1980), 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 다각체 침전물을 얻었다. 이 침전물을 알칼리용액(0.1 M Na₂CO₃, 0.17 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 10.9)에 부유시켜, 37°C에서 15분간 용해시킨 후, 15,000

rpm에서 5분간 원심분리하여 용해되지 않은 다각체를 제거하고, 다시 상층액을 25,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 바이러스 입자를 제거하고 다각체단백질 용액을 얻었다. 이 용액에 2배 농도의 Laemmli용액(0.062 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenolblue)을 동량 혼합하고, 100°C에 10분간 가열한 뒤, Laemmli(1970) 방법에 따라 15% 농도로 SDS-polyacrylamide gel에 의한 전기영동을 행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

바이러스 DNA 분리 및 제한효소 분석

바이러스 DNA를 분리하기 위하여 정제된 다각체를 알칼리 용액(pH 10.9)에 부유시켜 37°C에서 1시간 가온하고, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, SDS와 proteinase K를 각각 1%와 0.5 mg/ml 농도가 되도록 첨가하여 37°C에서 1시간 가온하였다. 여기에 TE buffer(pH 7.5)로 포화된 phenol을 동량 첨가하여 완전히 혼합시킨 다음, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상부의 물층을 취하여 동일한 방법으로 phenol 추출을 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 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA 침전을 얻었다. 이 DNA 침전을 70% ethanol로 3회 이상 세척한 뒤, evaporator로 ethanol을 완전히 제거하고 TE buffer로 100 μ g/ml의 농도로 만들어 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

제한효소(BM Co.) 처리는 100 μ g/ml 농도의 DNA용액 18 μ l(약 1.8 μ g)와 10x 반응 완충액 2 μ l에 각 제한효소를 15~20 unit를 각각 첨가한 후, 37°C에서 4시간 정도 처리하고 반응 정지 완충액(0.1 M EDTA, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 처리된 DNA는 agarose gel에서 전기영동을 행하고 EtBr로 염색하여, UV transilluminator로 관찰하였다.

교차감염

Baculovirus의 담배나방에 대한 교차감염을 조사하기 위하여, *Autographa californica* MNPV(AcMNPV), 담배거세미나방 핵다각체병바이러스(*Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus; SINPV) (임 등 1989) 및 파밤나방 핵다각체병 바이러스(*S. exigua* nuclear polyhedrosis virus; SeNPV), 가잠 핵다각체병바이러스(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus; BmNPV), 흰불나방 핵다각체병바이러스(*Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus, HcNPV) (진 등 1991a, b, 1993)와 HaNPV 등을 공시하여 각 바이러스를 담배나방 인공사료에 도말하고 음건한 뒤, 담배나방 3령 유충에 마리당 1.0×10^6 PIB/ml 농도로 경구접종하였으며, 이병된 유충은 위상차현미경으로 다각체 유무를 검정하였다.

결과 및 고찰

다각체와 바이러스 입자의 전자현미경 관찰

담배나방에서 생체 증식된 HaNPV를 sucrose density gradient를 이용 초원심 분리하여, 정제된 다각체의 외부 형태를 주사 전자현미경으로 관찰하였다. 그림 1에서 보여지는 것처럼 HaNPV의 다각체는 구형에 가까운 20면체 형태로 크기는 약 0.8 μ m에서 1.5 μ m로 다양하며 평균 약 1.0 μ m 정도였다. 이는 이미 보고된 SINPV의 평균 1.9 μ m(임 등 1989), SeNPV 평균 1.5 μ m(진 등 1991a), HcNPV 및 BmNPV(진 등 1991b) 다각체의 크기보다 다소 작은 크기

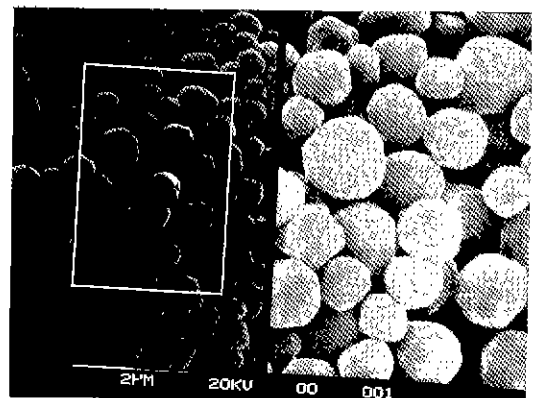


Fig. 1. Scanning electron micrograph of polyhedra of *Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus.

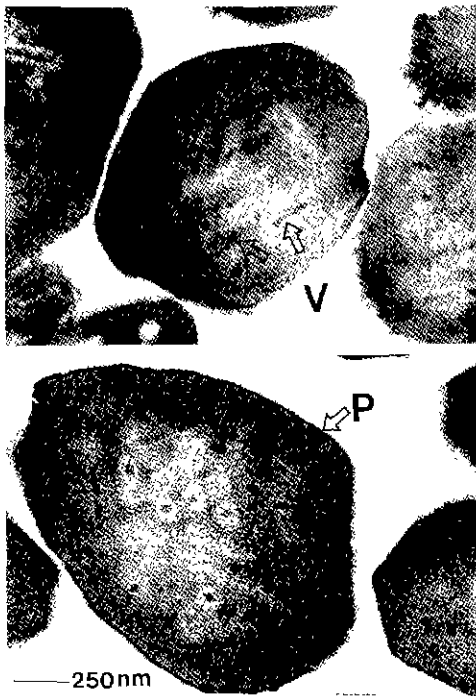


Fig. 2. Transmission electron micrograph of polyhedra of *Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus. V: Virus particles, P: Polyhedron.

였다.

HaNPV 다각체의 내부구조를 투과 전자현미경으로 관찰한 결과, 많은 수의 바이러스 입자가 다각체 단백질에 포매되어 있으며, 그 바이러스 입자는 한 개의 봉상 nucleocapsid가 하나의 envelope내에 매립된 형태의 SNPV(single embedded nuclear polyhedrosis virus)였다(그림 2). 또한 정제된 HaNPV 바이러스 입자의 negative 염색에 의한 투과 전자현미경 관찰 결과, 전형적인 봉상으로 그 크기는 약 300 nm×65 nm였다(그림 3). 일반적으로 NPV는 다수의 200~400 nm 크기의 봉상 nucleocapsid가 하나의 envelope 내에 매립된 형태인 MNPV(multiple embedded nuclear polyhedrosis virus)가 많으며(Harrap 1972a, b), 발현 벡터로서 많은 연구가 되어진 AcMNPV나 국내에서 보고된 HcNPV, SINPV 및 SeNPV 등은 MNPV로(임 등 1989, 진 등 1991a), BmNPV는 SNPV로 보고되었다(진 등 1991b)

다각체단백질의 전기영동 및 바이러스 DNA의 제한효소 분석

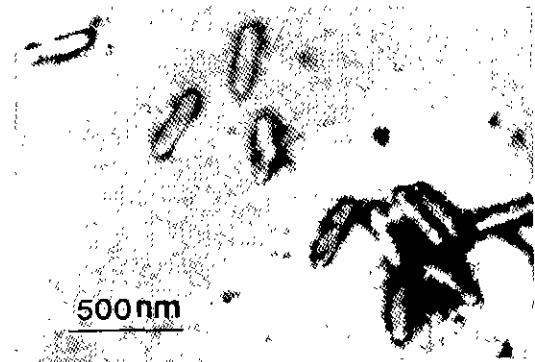


Fig. 3. Electron micrograph of negatively stained virus particles of *Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus.

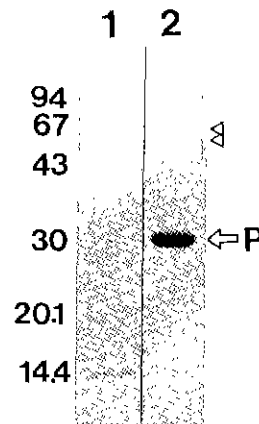


Fig. 4. SDS-PAGE of polyhedral protein purified from *Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus on 15% polyacrylamide gel. Lane 1: Protein standard markers, Lane 2: Polyhedral protein (P). Arrow heads represent the polymer of polyhedral protein.

생체 증식된 HaNPV의 다각체 단백질은 숙주곤충의 중장소화액으로부터 유래되는 것으로 알려져 있는 alkaline protease를 열처리에 의해 불활화시킨 후(Wood 1980; 진 등 1993), 다각체 단백질을 분리하여 15% SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과, HaNPV의 다각체 단백질은 단일밴드로 분자량 약 31 Kd으로 나타났으며, 또한 그 중합체로 보이는 밴드를 관찰할 수 있었다(그림 4). 다각체 단백질은 일반적으로 전기영동상에서 28~33 Kd의 주단백질(polyhedrin)과 그의 다각체 단백질의 중합체(polymer)와 alkaline protease에 의해 저분자화된 단백질로 나타나는데 (Wood 1980). SINPV와 HcNPV는

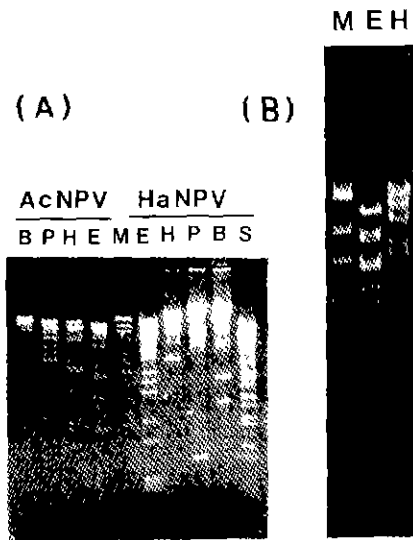


Fig. 5. Restriction endonuclease patterns of genome of *Helicoverpa assulta* nuclear polyhedrosis virus. Restriction endonuclease patterns of HaNPV and AcNPV DNAs electrophoresed on 1% agarose gel (A). Genome size of HaNPV DNA electrophoresed on 0.7% agarose gel (B) M: Lambda DNA digested with HindIII served as standard marker (Kb), E: EcoRI, H: HindIII, P: PstI, B: BamHI, S: Sall.

31 Kd, SeNPV와 BmNPV는 30 Kd 정도로 보고되어 있다(진 등 1993).

HaNPV의 DNA를 분리하고 수종의 제한효소를 처리하여 agarose gel 전기영동으로 제한효소 절단 패턴을 분석하였다. EcoRI으로 절단한 경우 24개의 절편, HindIII로 절단한 경우는 14개의 절편으로 관찰되었으며, Sall으로 절단한 경우 많은 수의 저분자량 절편으로 나타나 제한효소 절단 부위가 많은 반면, PstI과 BamHI의 제한효소 절단 부위는 적은 것으로 나타났다(그림 5). 이 HaNPV의 제한효소 분석 결과는 이미 국내에서 보고된 SINPV, HcNPV, BmNPV 및 SeNPV 등과는 전혀 다른 패턴을 보였다(임 등 1989, 진 등 1991a, b).

한편, 여러가지 NPV를 공시하여 담배나방 3령 유충에 교차감염 여부를 조사한 결과, 본 시험에서 공시한 HaNPV와 AcNPV는 담배나방에 병원성을 보인 반면 SINPV, SeNPV, HcNPV 및 BmNPV는 전혀 병원성을 나타내지 않아 서로 교차감염되지 않는 기주 특이성을 보였다(표 1). 따라서 표 1의

Table 1. Infectivity of baculoviruses against 3rd instar *Helicoverpa assulta* larvae

Viruses*	Infectivity
<i>Bombyx mori</i> SNPV	-
<i>Hyphantria cunea</i> MNPV	-
<i>Spodoptera litura</i> MNPV	-
<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	-
<i>Autographa californica</i> MNPV	+
<i>Helicoverpa assulta</i> SNPV	+

* 1.0×10^6 PIB/ml of each NPV was fed on the 3rd instar of *Helicoverpa assulta* larva

결과에서 AcNPV가 담배나방에 교차감염됨으로, 본 실험에서 분리된 HaNPV가 AcNPV의 감염에 따른 것인지 여부를 구명하기 위하여 AcNPV DNA와 여러가지 제한효소 처리로 비교 분석한 결과, 제한효소 절단 패턴이 HaNPV DNA와 전혀 다름을 확인할 수 있었다(그림 5A). 또한 제한효소 EcoRI과 HindIII로 절단한 후, 고분자량 절편의 크기를 관찰하기 위하여 agarose gel의 농도를 0.7%로 하여 전기영동하고(그림 5B), 그림 5a의 1% agarose gel에서 명확하게 관찰할 수 있는 저분자량 절편의 크기 등으로 genome의 크기를 분석한 결과, HaNPV의 대략적인 genome 크기는 약 120 Kb 정도였다. Baculovirus의 genome은 circular double-stranded DNA로 그 크기는 90~160 Kb 정도며(Matthews 1982), 발현 벡터제로 많은 연구가된 AcNPV와 BmNPV의 genome은 약 130 Kb로 알려져 있다(Maeda 등 1985, Smith & Summers 1978). 또 국내에서 보고된 SINPV의 genome 크기는 약 130 Kb이고(임 등 1989), SeNPV는 약 110 Kb라고 보고(진 등 1991a) 된 것을 참고로 할 때, 본 실험의 HaNPV genome 역시 일반적인 baculovirus의 크기에 속한다고 할 수 있다.

이상의 결과로 국내에서 처음으로 분리된 HaNPV는 전형적인 봉상의 바이러스로 다각체 단백질 내에 SNPV로 존재하는 특성을 보이며, DNA의 제한효소 분석이 이루어짐으로서 새로운 유전자원이 확보되어, 차후 다각체 단백질 유전자의 클로닝에 따른 발현 벡터제의 응용 및 담배나방의 미생물적 방제를 위한 살충제로의 개발 가능성에 대한 연구가 계속 요망되어 진다.

사 사

본 연구는 서울대학교 유전공학연구소(1994)와 농업생물신소재연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었음

인 용 문 헌

- Dongrui, L. & Hui, L. 1992. A catalog of insect viruses discovered in China. Proc. '92 Agric. BioTech. Symp. on New Biopesticides. 189-199.
- Harrap, K. 1972a. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle. *Virology*. **50**: 114-123.
- Harrap, K. 1972b. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III. Virus assembly. *Virology*. **50**: 133-139.
- 임대준, 박범석, 최귀문, 강석권, D.K. Reed. 1989. 담배거세미나방 핵다각체병 바이러스의 생화학적 특성. *한용곤지*. **19**(2): 113-122.
- 임대준, 진병래, 최귀문, 강석권 1990a. 곤충 핵다각체병바이러스를 이용한 담배거세미나방의 생물적 방제 II. 담배거세미나방 핵다각체병바이러스의 살충제 제제화. *한용곤지* **29**(4): 244-251.
- 임대준, 진병래, 최귀문, 강석권. 1990b. 곤충 핵다각체병바이러스를 이용한 담배거세미나방의 생물적 방제 III. 담배거세미나방 핵다각체병바이러스 살충제의 살포효과. *한용곤지* **29**(4): 252-256
- 임대준, 장동숙, 최귀문, 강석권 1991. 담배나방 세포질다각체병바이러스의 동정 및 병원성에 관한 연구. *한용곤지* **30**(3): 219-226.
- 진병래, 박범석, 제연호, 강석권. 1991a. 파밤나방 핵다각체병바이러스의 생화학적 특성. *한용곤지*. **30**(2): 144-149.
- 진병래, 박범석, 류강선, 제연호, 강석권. 1991b. 가잠배양세포에서 핵다각체병 바이러스의 다각체 단백질 합성과 DNA 복제. *한용곤지*. **33**(1): 21-26
- 진병래, 박범석, 우수동, 김주읍, 강석권. 1993. 곤충 핵다각체병 바이러스 다각체 단백질의 소화액에 의한 분해. *한국산업미생물학회지*. **21**(6): 513-519.
- 강석권, 이준호, 최용철, 유연우, 오병열. 1995. 세균 및 바이러스를 이용한 미생물 살충제 개발. *농촌진흥청 보고서*. 1-207
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa, M. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*. **315**: 592-594
- Matthews, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*. **17**: 1-199
- 岡田齊夫. 1994. 微生物的防除の現状と展望 植物防疫. **48**(11). 449-454.
- Smith, G.E & M.D Summers. 1978 Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology*. **89**: 517-527.
- Wood, H.A 1980. Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus protein. *Virology*. **103**: 392-399.

(1995년 6월 3일 접수)