

## 누에 핵多角體病 바이러스를 이용한 有用物質 생산

金 權 榮

農村振興廳 蠶絲昆蟲研究所

### 緒 論

지구상에 알려져 있는 動物 중 대부분을 짐하고 있으며, 環境에 대한 적응능력이 뛰어나 生態界에 광범위하게 분포하고 있는 昆蟲은 다양하고 무한한 응용잠재력을 지녀 새로운 遺傳資源이나 生物新素材로 주목받고 있다. 이러한 곤충에 대한 연구는 農業, 山林 및 保健 害蟲으로서 防除의 대상으로 대부분 연구가 집중되어 왔었으며, 일부에서는 遺傳學이나 發生學 등의 研究素材로서 곤충의 기능에 대한 연구가 진행되어 온 실정이다.

최근 遺傳子 조작 기술의 발달에 따른 生命工學의 진전으로 昆蟲 遺傳子에 대한 分析 및 有用物質 생산을 통한 자원화에 대한 연구가 급진전을 보이고 있다. 특히 昆蟲 生體 防禦 機作에 관련된 有用遺傳子 중 抗菌 蛋白質 관련 유전자는 생체내 안정성 및 부작용이 적은 抗生劑 개발에 응용될 수 있을 뿐 아니라, 그 구조가 간단하여 기존 抗生劑에 대해 강한 耐性を 보이는 微生物에 作用하는 새세대 항생제 개발의 가능성을 제시하고 있다. 또한 곤충의 각종 hormone의 경우 昆蟲細胞에서 發現할 경우 곤충생체에서 존재하는 natural hormone 수준으로 발현될 가능성이 다른 發現系에 비해 상당히 높은 것으로 보고되어 害蟲의 生物學的 防除 등에 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

이와같이 昆蟲은 그 자체가 人類를 위한 資源으로 각광받고 있으며 곤충 유용유전자는 分子生物學의 研究에 무한한 가능성을 제시하여 주고 있다. 그 중 각광받고 있는 최근 연구 분야는 곤충을 이용한 有用物質 생산으로 이는 곤충 자체 生理活性 物質과 昆蟲 病原 微生物을 이용하여 도입된 有用 遺傳子를 곤충에서 大量發現하는 것과 또한 곤충에 外來遺傳子를 삽입하여 유용물질을 생산하고자 하는 즉 形質 轉換 昆蟲(transgenic insect) 개발에 초점이 집중되고 있다.

이러한 관점에서 특히 누에는 오랜 養蠶의 역사와 더불어 인간과 친밀한 産業昆蟲으로서 養蠶技術의

발전과 함께 生理·生化學, 遺傳·育種 및 病理學의 研究의 진전으로 昆蟲 由來 生理活性 物質이나 누에 생체를 이용한 異種 蛋白質의 효율적인 大量生産을 위한 Biotechnology의 좋은 재료로 크게 흥미를 끌고 있으며, 특히 누에는 유충기에 蛋白質 合成이 높고, 開放血管系라는 점, 血液組織은 蛋白質을 分解하지 않고 저장능력을 구비하고 있다는 점과 경제적인 대량사육이 가능하다는 점 등이 큰 장점으로 작용하고 있다.

한편, 누에에 感染되어 濃病을 일으켜 양잠의 생산성 저하를 초래해 온 누에 핵多角體病 바이러스(BmNPV)는 유전자 조작 기술의 발전에 의해 감염 말기에 다량으로 합성되는 바이러스의 病原성과 複製에는 무관한 多角體 蛋白質 遺傳子의 構造가 밝혀졌다. 이러한 다각체 단백질 유전자의 강력한 promoter 活性을 이용하여 外來遺傳子를 대량발현 할 수 있는 발현벡터의 개발로 昆蟲細胞 또는 昆蟲生體를 이용하여 抗菌 peptide에서 부터 바이러스 백신 및 바이러스 치료제로서 抗體에 이르는 수많은 有用物質을 생산하고 있으며, 이는 醫藥産業에서 뿐만 아니라 農業 분야에서도 크게 주목받고 있다.

### 本 論

#### 1. 發現 벡터로서 누에 핵多角體病 바이러스

##### 1) 핵多角體病 바이러스의 特性

昆蟲에도 다른 動·植物에서 처럼 여러종류의 바이러스들이 감염되어 疾病을 일으키는데, 지금까지 分離된 곤충 바이러스 중 약 83%가 나비목, 14%가 벌목, 3%가 메뚜기목, 딱정벌레목 및 파리목에서 보고되었다(Tweenten *et al.*, 1981). 모두 8과에 속하는 바이러스가 곤충에 감염되는데, 그중 Baculoviridae는 다시 핵多角體病 바이러스(NPV), 顆粒病 바이러스(GV) 및 封入體 非形成 바이러스 등의 subgroup으로 세분되고 있다. NPV는 다른 바이러스보다 宿主領域이 넓고, 그 종류가 다양하기 때문에 일반적으로 이 NPV를 baculovirus라고 부르고 있으며, 현재 약 400

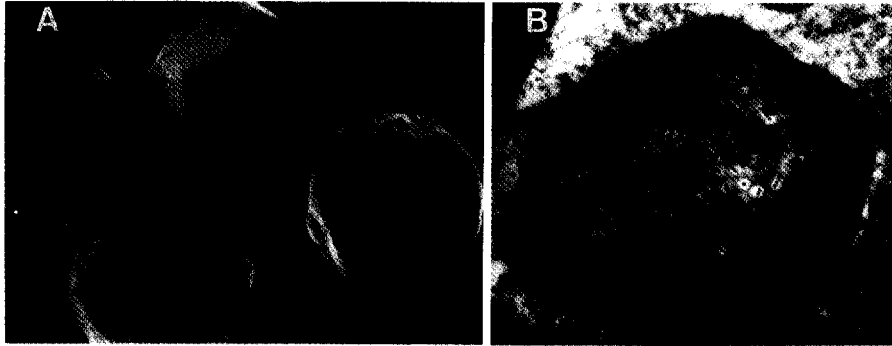


Fig. 1. Electron micrographs of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. A, Scanning electron microscopy; B, Transmission electron microscopy; V, Virus particle; P, Polyhedrin.

종의 NPV가 분리되어 있고, 宿主는 대부분 나비목에 치중되어 있다(Matthew, 1982).

NPV는 分子量 90~170 Kb 크기의 環狀, 두가닥 DNA genome과 envelope를 가진 棒狀 바이러스 粒子 (20~40 nm×200~400 nm)가 분자량 약 30,000 dalton의 結晶性 蛋白質(polyhedrin)로 구성된 0.5~15 μm 크기의 多角體(polyhedra)에 埋立되어 있다. 세포내에서의 바이러스는 다각체내에 들어있는 occluded virus(OV)와 粒子 그대로 있는 nonoccluded virus(NOV)로 구분되는데, 이는 1개의 envelope 내에 2-수십개의 바이러스 입자 다발을 내장한 MNPV(multiple nucleocapsid NPV)와 1개의 바이러스 입자만을 내장한 SNPV(single nucleocapsid NPV)로 세분되며, BmNPV의 경우는 주로 SNPV로 알려져 있다(Jin *et al.*, 1991).

NPV의 蛋白質은 전기영동 분석(SDS-PAGE)에 의해서 11~25종의 바이러스 구조 단백질과 1종의 다각체 단백질로 분리되고 있다(Harrap and Payne, 1979). 바이러스의 다각체는 생태계에서 바이러스 입자를 내장하여 그 活性을 보호하며, 야외에서 안전하게 病原性을 유지하는 역할을 한다. 이러한 특성으로 인하여 NPV는 微生物殺蟲劑로서 개발되어 실제 적용되고 있다.

多角體가 먹이와 함께 섭취되어 장내에 들어가게 되면, 다각체는 중장의 消化液과 蛋白質 分解 酵素에 의해서 溶解되는 동시에 병원력을 가진 바이러스가 遊離되어서 장내에 방출되게 된다. 방출된 바이러스 입자는 바이러스 envelope와 중장의 微細絨毛(microvilli) 細胞膜과의 融合(fusion)을 통해 細胞質로 침입하고, 核膜內에서 uncoating에 의해서 바이러스 DNA는 核內로 주입 된다. 이때부터 모든 바이러스 特異物質이 合成되기 시작하고, 核은 肥大해 지면서

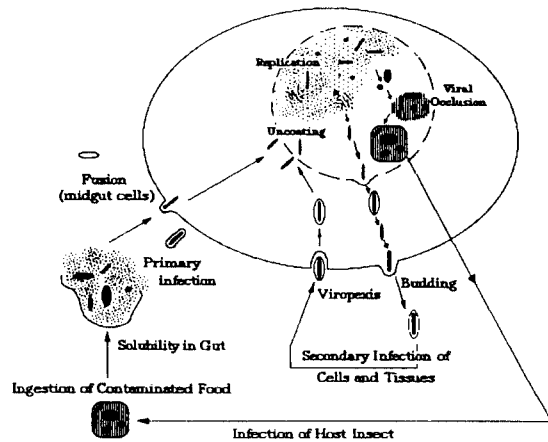


Fig. 2. Replication cycle of nuclear polyhedrosis virus.

virogenic stroma라는 chromatin 類似物質로 이루어진 nucleocapsid assembly site를 형성한다. 즉 이 밀도가 높은 VS를 중심으로 주위에서 합성된 바이러스 DNA와 蛋白質이 素材가 되어서 많은 수의 바이러스 입자가 형성되고, 이들 바이러스 입자는 埋立되어서 최종적으로 多角體가 완성된다. 이때에 매립되지 않은 NOV는 出아(budding)에 의해서 envelope를 획득하여 동일 숙주내의 다른 細胞나 組織에 침입하여 增殖하는 감염원의 역할을 하고, 다각체는 수적 증가에 의한 물리적인 압력 등으로 인해 세포가 파괴되면서 개체를 이탈하는 동시에 生態界 내에서의 제 2 감염원이 된다(Luckow and Summers, 1988).

이와 같은 NPV의 增殖 cycle은 uncoating 후 6시간이 지나면 DNA 複製가 일어나고, NOV의 budding에 의한 遊離는 10시간 후에, 多角體 蛋白質 合成은 12시간 후에 각각 觀察되며, 완전한 다각체 형

성은 약 24시간 이후에 일어나기 시작하고 아울러 NOV의 수적인 최대치는 바이러스 접종후 36-48시간 사이에 나타난다. 그리고 多角體 蛋白質의 合成은 4-5일 동안 축적되고 그후 感染細胞가 崩壞되어 遊離될 때까지 지속된다. 이런 점에서 다각체 단백질은 바이러스의 病原성과 複製에는 무관하며 단지 個體를 이탈했을 때 바이러스의 활성 보호 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

## 2) 누에 核多角體病 바이러스 벡터의 特性

NPV의 多角體 蛋白質은 바이러스 감염 말기에 宿主細胞內 蛋白質의 약 30%까지 다량합성되고, 이 多角體 蛋白質 遺傳子 發現은 일시적으로 調節되며, 강력한 promoter의 조절을 받는 것으로 밝혀졌다. 그러면서 이 다각체 단백질 유전자는 바이러스의 複製와 感染에는 불필요하며, 발현벡터로서의 필수조건 중 하나인 강력한 promoter로서의 역할을 충분히 만족시킬 수 있다. 따라서 多角體 蛋白質 遺傳子를 外來遺傳子와 대체하고 그 promoter를 이용한 발현 벡터 개발에 대한 연구가 집중되어, 현재 AcNPV(*Autographa californica* NPV)와 Sf(*Spodoptera frugiperda*) 昆蟲細胞를 이용한 것(Smith *et al.*, 1983)과 BmNPV와 누에 培養細胞 및 누에 幼蟲을 이용한 두가지 벡터가 개발되어 있다(Maeda *et al.*, 1985)(그림 3).

이들 발현벡터 시스템은 다각체 단백질 유전자의 강력한 promoter는 그대로 이용하고 coding region에 발현코자하는 외래유전자를 삽입할 수 있는 발현벡터를 제작한 후, 이 발현벡터와 야생주(wild type) NPV의 DNA와 배양세포에 칼슘 침전법 등으로 동시감염시키면 相同性에 의한 재조합(homologous recombination)이 일어나 야생주 NPV의 多角體 蛋白質 遺傳子 위치 부위가 外來遺傳子가 포함된 발현벡터 절편으로 교체되어 다각체를 형성하지 않는(occ-) 재조합 바이러스를 제작할 수 있다(Summers and Smith, 1987).

이 재조합 바이러스는 多角體를 형성하지 않기 때문에 野生株 바이러스와 plaque 檢定 方法 등으로 顯微鏡 하에서 구별되어져 쉽게 screening 할 수 있다. 또한 NPV는 脊椎動物이나 植物에 病原성을 지니지 않고 특히 재조합 바이러스의 경우 다각체를 형성하지 않기 때문에 유출되더라도 쉽게 불활화된다는 안전성 면에서 장점을 가지고 있다. 또 보조 바이러스(helper virus)의 불필요성, 크기가 비교적 큰 DNA의 插入이 가능, 유전자 조작의 간편함 및 유전자 도입 標識子로서의 적합성과 무엇보다도 高等 眞核細胞와 강력한 promoter 調節에 의해 높은 生體 活性 및 發現量이 다른 발현벡터 시스템에 비해 상당히 유리하다고 할

수 있다(O'Reilly *et al.*, 1992).

또한 昆蟲細胞는 大量 浮遊 培養이 가능함으로서 연속적인 대량배양에 의한 有用物質 생산이 용이하며, 특히 BmNPV 발현벡터의 경우는 앞에서 열거된 여러가지 장점을 가지고 있는 누에 5령 유충을 이용함으로써 발현 수율을 극대화 시키는 방법도 가능하다. 이와같이 곤충 개체를 異種 蛋白質 生産을 위한 宿主로 이용한 최초의 시도는 1985년 Maeda 등에 의해 발표됨에 따라 대단한 관심을 집중시켰으며, 현재 응용되고 있다. 실제 사람  $\alpha$ -interferon을 대량생산하기 위해, 누에 5령 유충에 경피적으로 300,000 PFU의 바이러스를 감염시킨 후 4일째의 感染 幼蟲 體液 中에는  $4 \times 10^7$  U/ml의 interferon 즉 40  $\mu$ g/體液 ml이 생산되었으며, 누에 유충 한마리 당으로 환산했을 시는 약 60  $\mu$ g 정도로, 이러한 결과는 이미 보고된 다른 眞核細胞 發現系에서 얻은 양보다 발현효율이 약 100배 이상 높다는 것을 의미한다(Maeda *et al.*, 1985).

또 分子量이 크며, 복잡한 구조로 遺傳子가 H鎖와 L鎖로 구분되어 있는 抗體 遺傳子 發現을 위해 누에 세포주와 누에 유충에서 발현정도를 비교한 결과, 누에 세포주에서는 접종후 72 시간째에 培養液 ml 당 6.4  $\mu$ g의 抗體를 얻을 수 있었으며, 누에 유충을 이용한 경우는 접종후 7일째 培養液 ml당 800  $\mu$ g으로 다른 발현벡터계와 비교될 수 없을 정도의 높은 발현 효율을 얻을 수 있다고 보고되었다(Reis *et al.*, 1992).

AcNPV 발현벡터의 경우에도 사람 apolipoprotein E를 Sf21 세포주에서 접종후 60시간째 培養液 ml당 30  $\mu$ g의 높은 發現量을 얻을 수 있었으며, *M. sexta*의 幼蟲 生體를 이용했을 경우는 體液 ml당 218  $\mu$ g으로 상당히 발현효율을 증대시킬 수 있었다고 보고했다(Gretch *et al.*, 1991).

이러한 곤충 세포주나 생체를 이용한 발현시스템은 경제적인 면에서 굉장히 유리한 조건으로, 특히 누에 NPV와 누에 5령 유충의 組合은 이상적이라 할 수 있었다.

## 2. 누에 生體 防禦 關聯 有用遺傳子 探索

昆蟲은 病原體의 침입시 일차적인 細胞性 免疫과 체내에 상존하면서 병원체에 방어 능력을 가지는 體液性 免疫 體系를 갖고 있다. 체액성 면역에 관련된 물질 중 抗菌 펩타이드는 그 구조가 간단하고 分析이 용이하여 많은 연구가 진행되고 있다. 이 항균 펩타이드류에는 lysozyme, attacin, cecropin, defensin 등이 있으며, 이들 물질은 兩棲類, 哺乳類 등에 다양하게 분포되어 있다. 최근까지도 새로운 生物에서 新規

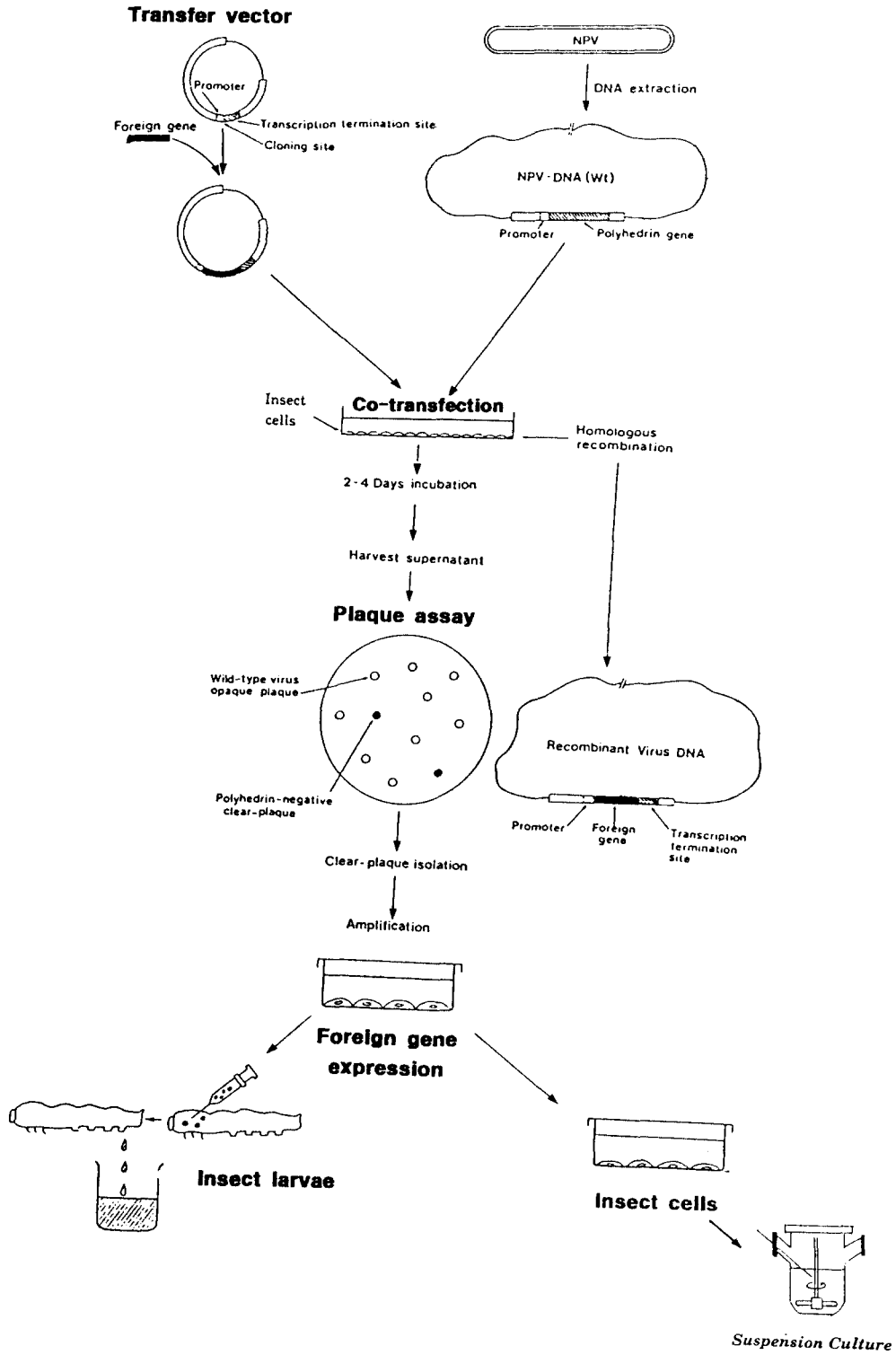


Fig. 3. Schematic representation of baculovirus expression vector system.

抗菌 關聯 物質 및 遺傳子가 보고 되고 있으며 앞으로 계속 될 것이다(Gupta, 1991).

昆蟲의 生體 防禦 機作은 脊椎動物에 비해 비교적 단순하지만 곤충이 생존하는데 있어 전혀 지장이 없는 것을 감안할 때 곤충의 生體 防禦 物質에 대한 해명은 免疫強化劑, 신중의 抗生劑 開發 등에 의한 이들 물질이 人體에 유용하게 적용 될 수 있어 주목받고 있다. 1980년대 중반부터 곤충의 생체 방어 물질 중 특히 항균 관련 물질들이 많이 분리되고, 이들 物質의 蛋白質 수준에서의 活性 및 生化學的 研究가 많이 수행되어져 왔다. 물질 분리는 상당히 난이하고 기존의 분리된 것과 동일한 경우가 많이 발생하고 있어 유전자 수준에서의 探索이 시도되고 있다.

1990년대에 와서는 遺傳子 수준에서 抗菌 物質을 이해하고 大量生産 體系 확립을 위한 연구를 진행하게 되어 Harvard 대학의 Peng Liang은 다양한 세포 및 서로 다른 조건에서 다르게 發現되어 지는 遺傳子를 분리, 동정하는 새로운 기법을 제안하였다(Peng Liang *et al.*, 1992). 이 방법은 기존의 Subtraction Library Screening 방법(Fargnoli, 1990)을 개선한 것으로 mRNA 수준에서의 발현 정도를 random primer 와 Oligo dT primer를 이용한 逆轉寫 遺傳子 增幅法을 이용하여 직접 확인하는 작업을 말한다. 이 방법을 응용하여 누에 생체내에 細菌을 주입한 후 이 물질에 대한 生體 防禦 機作을 유전자 수준에서 조사해 볼 수 있을 뿐만 아니라, 곤충 바이러스에 대한 生體 防禦 機作도 연구해 볼 수 있게 되었다.

이러한 일련의 遺傳子 探索 研究 結果는 주로 곤충이 갖고 있는 特異 遺傳子를 발현시켜 인체에 유용한 물질을 효율적으로 생산하는 일종의 分子生物學的 産業化가 가능하게 될 것이고 부수적으로 生物學에서 發生·分化에 관련되는 遺傳子 變異와 같은 生命에 대한 비밀의 숲에서 해명을 기다리는 生命現狀의 해석에도 진일보를 가져 올 수 있는 계기를 제공하게 될 것으로 기대된다.

### 3. 벡터를 이용한 有用物質 生産

Baculovirus 발현벡터 시스템은 발현수준이 높을 뿐만 아니라 안정하며, 이 發現系를 이용하여 생산된 異種 蛋白質은 生物學的 活性 및 免疫學的 性質이 원래의 단백질과 매우 유사한 것으로 알려졌으며 실제 眞核 및 原核生物의 다양한 遺傳子들이 昆蟲細胞系 및 幼蟲에서 發現되고 있다(O'Reilly *et al.*, 1992; Maeda, 1994).

昆蟲細胞는 大量 浮遊 培養이 가능하기 때문에 bio-reactor에 의한 scale-up과 無血清 培地의 개발로 昆蟲

細胞 培養을 통한 有用物質의 大量 生産 工程 體系가 상당히 진전되어 있다.

특히 醫藥 및 農業 등의 분야에서 주목되고 응용되고 있는 Baculovirus 발현 벡터 시스템은 高等 眞核細胞를 이용하기 때문에 轉移 後 變形 過程(post-translational modification)이 일어나는데 곤충세포에서 합성된 단백질은 signal peptide가 정확하게 절단되어 세포밖으로 분비되고, 糖鎖 附加(glycosylation)가 일어나는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 점에서 생산된 蛋白質의 生物學的 및 免疫學的 活性이 매우 높으며 아울러 발현수준도 다른 벡터 시스템에 비해 효율적이다(O'Reilly *et al.*, 1992).

이러한 예들은 현재 수백종 이상의 遺傳子 發現에서 보고되고 있는데, AcNPV와 Sf 培養細胞를 조합한 baculovirus 발현 벡터 시스템을 최초로 개발한 미국 Texas A & M 대학의 Summers팀은 사람  $\alpha$ -interferon을 昆蟲 培養細胞에서 發現했을 때 발현수준은 대장균(*E. coli*)에서 보다 500배, 생쥐 세포주에서 보다는 100배 이상 높았다고 했으며, 생산된  $\beta$ -interferon은 사람  $\beta$ -interferon의 單細胞群 抗體와 반응하고, tunicamycin 처리로 당쇄부가를 확인하였다고 했다(Smith *et al.*, 1983). BmNPV 발현벡터 시스템을 개발한 Maeda 역시 유사한 발현효율을 누에 5령 유충에서 보고하였으며, 이때 생산된  $\beta$ -interferon의 signal peptide는 정확하게 절단되어 세포밖으로 분비되어 누에 유충 체액에서 분해되지 않고 저장되어 있었으며 활성도 높았다고 했다(Maeda *et al.*, 1985).

B형 肝炎 바이러스의 경우(Kang *et al.*, 1987)와 Rota 바이러스(Crawford *et al.*, 1994) 등에서 表面抗原 遺傳子들을 조합하여 baculovirus 발현벡터를 이용하여 발현했을 때 곤충세포주에서 백신으로서 높은 免疫性을 나타낼 수 있는 無病原性의 바이러스 유사한 입자로 다량생산되어 재조합 백신으로의 가능성을 보여주었다. 또 B형 간염 바이러스의 豫防 및 治療劑로 사용하기 위한 사람-생쥐 재조합 抗體의 H鎖와 L鎖의 유전자 각각에 대해 재조합 baculovirus를 제작하여 곤충세포주에 동시 감염시켰을 때, 이 항체는 N-말단 아미노산 분석과 tunicamycin 및 glycosidase 처리와 抗原·抗體 分析(ELISA) 결과, 정확하게 signal peptide가 절단되었으며, 당쇄가 부가되어 H쇄와 L쇄가 sulfide 결합에 의해 assembly되어 分子量 15만의 완전한 항체구조로 分泌됨을 확인하였고, 항체의 항원 결합 능력과 항원을 제거하기 위한 첫단계 과정인 사람 혈액중의 complement C1q 결합능력이 哺乳動物 세포주에서 발현된 항체와 차이가 없는 것으로 보고되었다(Jin *et al.*, 1993; 1995).

**Table 1.** List of genes expressed in the baculovirus expression system

Origin	Gene Product
<b>VIRUSES</b>	
Adenoviruses	
Human Adenovirus 2	DNA polymerase E1A pprotein (13s message) E3 protein (19K) Preterminal protein (pTP)
Arenaviruses	
Lymphocytic choriomeningitis virus	Glycoprotein precursor (GPC)  Nucleoprotein (N) Nucleocapsid protein
Lassa fever virus	
Bunyaviruses	
Maguari bunyavirus	Nucleocapsid protein (N)
Snowshoe hare bunyavirus	Nonstructural protein (NSs) Nucleoprotein (N)
Punta Toro phlebovirus	Neutralization antigen (N) Nucleoprotein (NSs)
Rift Valley fever virus	Envelope glycoprotein (G1) Envelopeglycoprotein (G1-G2)
Hantaan virus	Envelope glycoproteins G1 and G2 Nucleocapsid protein (N)
Caulimoviruses	
Cauliflower mosaic virus	Gene I protein
Comoviruses	
Cowpea mosaic virus	RNA polymerase B-RNA encoded proteins
Coronaviurses	
Bovine coronavirus	Hemagglutinin-esterase (HE) Spike glycoprotein (S) Spike glycoprotein subunit (S1) Spike glycoprotein subunit (S2) Spike glycoprotein (S1) Spike glycoprotein (S2)
Flaviviruses	
Dengue virus type 1	Envelope glycoprotein (E)
2	Envelope glycoprotein (E)
4	Capsid protein (C) Core protein Envelope glycoprotein (E) Nonstructural protein (NS1) Nonstructural protein (NS2a) Premembrane protein (PreM)
Japanese encephalitis virus	Envelope glycoprotein (E) Capsid protein (C) Nonstructural protein (NS1) Premembrane protein (PreM)
Yellow fever virus	Envelope glycoprotein (E) Nonstructural protein (NS1)
Hepadnavirus	
Hepatitis B virus	Core antigen Surface antigen

**Table 1.** *Continued.*

Origin	Gene Product
	Chimeric antibody X protein
Herpesviruses	
Bovine Herpes virus-1	Glycoprotein gIV
Epstein-Barr virus	Alkaline DNase Deoxyribonuclease (BGLF5) Nuclear antigen (EBNA1) Phosphoprotein pp58 (BMRF1) Terminal protein (TP-1)
Herpes simplex virus type 1	DNA polymerase Glycoprotein D Glycoprotein G (gG-1) Glycoprotein G (gG-2)
Human cytomegalovirus	DNA polymerase gp55-116(gB)
Marek's disease virus	A antigen
Pseudorabies virus	Glycoprotein gp50
Varicella zoster virus	DNA polymerase
Nepoviruses	
Arabis mosaic virus	Coat protein
Orthomyxoviruses	
Influenza virus A	
Ann Arbor strain	Nucleoprotein (NP)
Fowl plaque virus	Hemagglutinin (HA)
PR strain	hemagglutinin (HA) Polymerase subunits PA,PB1 and PB2
Shearwater strain	Nucleoprotein (NP)
Udorn strain	Neuraminidase (NA)
Influenza virus B	Nucleoprotein (NP)
(Ann Arbor strain)	
Papovaviruses	
Bovine papilloma virus	E1 protein(BPV1) E2 protein
Human papilloma virus type 6b	E2 protein
E5 oncoprotein	
Human papilloma virus type 6b	E2 protein L2 ORF
Human papilloma virus type 11	L2 ORF
Human papilloma virus type 18	E6 protein
Polyoma virus	Large T antigen Middle T antigen VP1 capsid protein
Simian virus40	Large T antigen Large T antigen, tsA58 temperature-sensitivemutant Small tantigen
Paramyxoviruses	
Human parainfluenza3	Fusion glycoprotein(F) Hemagglutinin-neuraminidase
Newcastle disease virus	Hemagglutinin-neuraminidase(NDV)

**Table 1.** *Continued.*

Origin	Gene Product
Measles virus	Hemagglutinin(H) Membrane fusion protein(F)
Respiratory syncytial virus	F glycoprotein Chimeric FG glycoprotein
Parvoviruses	
Adeno-associated viurs	Rep68 protein(AAV) Rep78 protein
Human parvovirus B19	Coat protein VP1 Coat protein VP2
Minute virus of mice	Nonstructural protein(NS-1)
Picornaviruses	
Foot-and-mouth disease Avirus	Capsid precursor protein P1-2 RNA polymerase
Hepatitis A virus	Capsid protein(VP1)
Poliomyelitis virus	3B protein(VPG) 3Cpor protein (protease) 3D pol protein(RNA polymerase) Capsid protein Structural proteins VP0, VP1 and VP2
Polydnaviruses	
Campoletis sonorensis virus	1.6 kb ORF (segment WHv1) 1.0 kb ORF (segment WHv2)
Reoviruses	
African horsesickness disease virus serotype4	Outer capsid protein VP7
Bluetongue virus serotype 1	Outer capsid protein VP2
Bluetongue virus serotype 2	Outer capsid protein VP2 Outer capsid protein VP5
Bluetongue virus serotype 10	Coreprotein VP6 E glycoprotein Inner coreprotein VP3 Nonstructural protein NS1 Nonstructural proteins NS3, NS3A Outer capsid protein VP2 Outer capsid protein VP5 Outer core protein VP7 Phosphoprotein NS2 RNA polymerase VP1 VP4
serotype 11	Outer capsid protein VP2
serotype13	Outer capsid protein VP2 Outer capsid protein VP5
serotype17	Inner core protein VP3 Outer capsid protein VP2 Nonstructural protein NS1
Epoxootic hemorrhagic disease virus serotype 2	
Boviner rotavirus type 1	Nucleocapsid protein VP6 Structural protein VP1
Bovine rotavirus strain RF	Structural protein VP1
Porcine rotavirus	Outer capsid protein VP4
Rhesus rotavirus	hemagglutinin VP8



**Table 1.** *Continued.*

Origin	Gene Product
Simian rotavirus SA11	Outer capsid protein VP4 Capsid antigen VP6 Nonstructural phosphoprotein NS26 Nonstructural glycoprotein NS28 nonstructural protein NS53 Outer capsid protein VP4 Outer capsid protein VP7 Structural protein VP1
Retroviruses	
Avian leukemia virus	env-gp85
Bovine leukemia virus	p34tax
Bovine immunodeficiencylike virus	Gag protein
Feline immunodeficiency virus	Gag protein
Feline sarcoma virus	v-fms
Human immunodeficiency virus type 1	Envelope protein gp120 Envelope protein gp160 Gag protein Gag-pol fusion protein Integration protein Major core p24 Nef protein Pol protein Protease Fev protein Tat protein
Human immunodeficiency virus type 2	Gag precursor protein
Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I)	p20E protein
Human T-cell leukemia virus type II (HTLV-II)	gp46 protein p40 protein Rex protein
Rous sarcoma virus	v-src tyrosine kinase
Simian immunodeficiency	Gag proteinvirus gp140
Simian sarcoma virus	v-sis/platelet-derived growth factor (PDGF- )homolog
Rhabdoviruses	
Rabies virus	
Rabies virus	Glycoprotein (G) Nucleoprotein (N)
Vesicular stomatitis virus	Glycoprotein (G)
Infectious hematopoietic necrosis virus	Glycoprotein
Togaviruses	
Rubella virus	Envelope protein (E1) Envelope protein (E2) Capsid protein (C)
Sindbis virus	Envelope proteins E1 and E2
Unclassified viruses	
Hepatitis delta virus	Delta antigen (HDAg)

Table 1. Continued.

Origin	Gene Product
Non-A, non-B (Hepatitis C virus)	Core protein (p22)
<b>BACTERIA</b>	
Bacillus anthracis	Protective antigen (PA)
Bacillus thuringiensis subspecies kurstaki	HD-73 delta endotoxin
Bacillus thuringiensis subspecies aizawai 7.21	Crystal protein
Clostridium tetani	Tetanus toxin fragment-C
Excherichia coli	Chloramphenicol acetyl transferase
	$\beta$ -Galactosidase
	$\beta$ -Glucuronidase
Pseudomonas diminuta	Phosphotriesterase
<b>FUNGI</b>	
Neurospora crassa	qa-1f activator protein
Phanerochaete chrysosporium	Manganese peroxidase
<b>PLANTS</b>	
Phaseolus vulgaris Phaseolin (French bean)	
Ricinus communis (Castor bean)	Ricin and Ricin B-chain
Solanum tuberosum (Potato)	patatin
Carica papaya (Papaya)	Papain
Zeamays(Corn)	Ac transposase
<b>PROTOZOA</b>	
Eimeria acervulina	Merozoite antigen
Plasmodium falciparum(Malaria)	Circumsporozoite protein
	Major merozoite surface antigen
	Precursor(PMMSA)
<b>INVERTEBRATES</b>	
Androctonus australis Hector(Scorpion)	Insect neurotoxin(AaIT)
Bombyx mori (Silkworm)	Chorion proteins
Buthus eupeus (Scorpion)	BeIT insectotoxin-1
Drosophila melanogaster	Kruppel gene product(Fruitfly)
	Shaker "A-type"K+ channel
Haementaria officianalis(Mexican leach)	Antistasin(ATS)
Heliiothis virescens(Tobacco budworm)	Juvenile hormone esterase
Hyalaphora cecropia(Giant sikmoth)	Basic preproattacin
Hirudo medicinalis(Leach)	Hirudin
Manduca sexta(Tobacco hornworm)	Diuretic hormone
	Eclosion hormone
Photinus luciferin(Firefly)	Luciferase
Pyemotes tritici(Mite)	Neurotoxin(TxP-I)
Sarcophaga pergrina(Fleshfly)	Sarcotoxin IA
Shistosoma mansoni (Shistosomiasis parasite)	Sm32 antigen
Spisula solidissima (Clam)	Cyclins A and B
<b>VERTEBRATES</b>	
Amphibians	
Xenopus laevis	Peptidylglycine -hydroxylating monoxygenase(amidating enzyme) pp90 protein kinase

Table 1. Continued.

Origin	Gene Product
	xlcaax-1 protein
Birds	
Chicken	Nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha$ -subunit) pp60 S-cyclophilin
Turkey	-adrenergic receptor
Fish	
Carp	Gonadotropin 1 and 2
Mammals	
Baboon	Estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein
Bovine	Calmodulin-sensitive (type I) adenyl cyclase Opsin Protein kinase C- $\gamma$
Hamster	$\beta$ -adrenergic receptor Scrapie prion (PrP)
Human	Acid $\beta$ -glucosidase Adenosine deaminase $\beta$ 2-adrenergic receptor Aldose reductase 2-adrenergic receptor Aldose reductase $\beta$ -amyloid precursor Antithrombin III (ATIII) Apolipoprotein-E CD2 (TII) erythrocyte receptor CD4 HIV receptor CD23 IgE receptor Choriogonadotropin, $\alpha$ -subunit (hCG ) Choriogonadotropin, $\beta$ -subunit (hCG ) Complement component C1r Corticosteroid binding globulin (hCBG) CR2 Epstein-Barr virus/ complement-3d receptor (extracellular domain) crk oncogene product (P47gag-crk) Cystic fibrosis gene product (CFTR) Epidermal growth factor receptor Epidermal growth factor receptor (ectodomain) epidermal growth factor receptor (intracellular domain) Epidermal growth factor receptor (tyrosine kinase domain) Erythropoietin (EPO) Estrogen receptor c-fms protooncogene protein c-fos protooncogene protein

Table 1. Continued.

Origin	Gene Product
	G25K protein
	$\beta$ -galactosidase
	Gastrin-releasing peptide precursor
	Glucocerebrosidase
	Glucocorticoid receptor
	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)
	Haptoglobin
	ha-ras trans forming protein
	hst-1 transforming protein
	immune activation gene Act-2
	$\alpha$ -interferon
	$\beta$ -interferon
	Interleukin-2
	Interleukin-5
	Interleukin-6
	Insulinlike growth factor 2
	Insulin receptor (cytoplasmic domain)
	Insulin receptor (extracellular domain)
	$\beta$ 2-micoglobulin
	Lymphocyte activation gene lag-1
	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase (p56lck)
	MHC class I HLA-B27 antigen
	Multidrug-resistant gene
	Kirsten-ras (4B) p21 protein
	Ku autoantigen
	5-lipoxygenase
	Mineralocorticoid receptor
	Multidrug transporter product(MDRI P-glycoprotein)
	Muscarinic cholinergic receptor (MACHR) m1 and m2 forms
	myelin-associated glycoprotein (soluble extracellular domain)
	c-myc gene product
	Myogenic determination factor
	$\beta$ -nerve growth factor
	Nerve growth-factor receptor (extracellular domain) (NGF-R)
	P53 cellular phosphoprotein
	P210 BCR-ABL oncogene product
Platelet-derived growth factor	(PDGF)-receptor
	Plasminogen
	Protein kinase C
	Protein kinase C, $\alpha$ , $\beta$ II and $\gamma$
	Raf-1 protein
	rap1A/Krev-1 gene product

**Table 1.** *Continued.*

Origin	Gene Product	
Mouse	Retinoblastoma gene product (pp110 <sup>KB</sup> )	
	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter protein	
	c-src tyrosine kinase	
	Tau microtubule-associated protein	
	T-cell growth factor	
	T-cell protein-tyrosine phosphate	
	Terminal transferase	
	Thyroid hormone receptor $\beta$ 1	
	Tissue plasminogen activator	
	Transferrin receptor	
	Tumor necrosis factor receptor	
	Tyrosine hydroxylase	
	Urokinase-type plasminogen activator	
	Vitamine -D receptor	
	Adipsin	
	Basement membrane glycoprotein(entactin)	
	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent kinase II	
	Egr-1 transcription factor	
	c-ets-1 protooncogene	
	Immunoglobulins	
	Interferon gamma receptor	
	Interleukin (IL-3, IL-4, IL-5)	
	p53	
	Protein kinase C-e	
	Transcription factor S-II	
	Rabbit	Cytochrome P450
	Rat	Protein phosphatase 1
	Atrial natriuretic peptide receptor	
	guanylyl cyclase (GC-A)	
	Cytochrome P450 IIA1	
	Ornithine transcarbamylase	
	Muscarinic acetylcholine receptor	
	Tyrosine hydroxylase	
	Protein kinase C- $\beta$ II, C- $\gamma$ subtype M3	

**Table 2.** *Post-translational processing and yields of proteins produced in various expression systems*

Processing	Expression system			
	<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
Proteolytic cleavage	+/-	+/-	+	+
Glycosylation	-	+	+	+
Secretion	+/-	+	+	+
Folding	+/-	+/-	+	+
Phosphorylation	-	+	+	+
Acylation	-	+	+	+
Amidation	-	-	+	+
Yield (%) <sup>a</sup>	1-5	1	30	<1

<sup>a</sup>On the basis of dry weight.

한편, 昆蟲病原 바이러스 殺蟲劑의 살충효율 증대를 위해 baculovirus 발현벡터 시스템을 이용하여 Juvenile hormone esterase, insect neurotoxin 등의 유전자를 도입한 재조합 바이러스로 病原性を 높이고 致死時間을 단축시켰다는 보고와 같이 baculovirus 발현 벡터 시스템은 효율적인 바이러스 殺蟲劑 開發에도 應用되고 있다(Hammock *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 1991; Tomalski and Miller, 1991).

이상 몇가지 예들 외에 수 많은 遺傳子들의 發現으로 baculovirus 발현벡터 시스템은 有用物質 生産을 위한 biotechnology의 좋은 재료로서 各광을 받고 있으며 앞으로도 계속 進行되리라 생각된다.

## 結 論

현재 baculovirus 발현벡터 시스템의 發現 效率提高를 위해 많은 연구와 더불어 두가지 蛋白質을 동시에 발현시킬 수 있는 二重 發現 벡터의 개발과 발현코자하는 外來遺傳子가 삽입된 재조합 바이러스의 용이한 선별을 위한 致死遺傳子 이용 발현벡터의 개발 등 다양한 발현벡터가 보고되고 있고, 상품으로 시판되고 있다. 한편 昆蟲이 갖고 있는 生體 防禦 關聯物質 등과 같은 人類에 유용한 物質 生産 遺傳子를 효율적으로 探索할 수 있는 유전자 조작 기술이 급속히 발전되고 있어 누에를 비롯한 곤충에서 다양하고 수많은 特異 遺傳子들이 探索되고 있다.

昆蟲細胞와 個體에서 누에를 비롯한 곤충으로 부터 탐색된 유용 특이 유전자를 유일한 高等 眞核 DNA 바이러스 벡터(eucaryotic DNA viral vector)인 baculovirus 발현 벡터로 발현 시키는 有用物質 生産 體系는 生理活性이 높은 異種蛋白質의 효율적인 大量 生産 수단으로 그 적용범위가 급속히 넓어 지고 있다. 따라서 지속적인 발현벡터의 效率性 提高를 위한 연구 개발로 얻어진 벡터를 이용하여 探索된 곤충이 가진 特異 遺傳子를 효율적으로 발현시킬 수 있는 체계를 확립함으로써, 醫學 및 農學 분야에서 산업적으로 유용물질을 생산하여 누에 核多角體病 바이러스를 이용한 有用物質 生産 體系의 인류를 위한 그 활용도는 계속 增大될 것으로 믿어 의심치 않는다.

## 引 用 文 獻

Craford, S. E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M.

- H., Zhou, Y. J. and Estes, M. K. (1994) *J. Virol.* **68**: 5945-5952.
- Fargnoli, J. (1990) *Anal. Biochem.* **187**: 364-373.
- Gretch, D. G., Sturley, S. L., Frisen, P. D., Beckage, N. E. and Attie, A. D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 8530-8533.
- Gupta, (1991) *Immunology of insect and other arthropods*, CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida.
- Hammock, B. D., Bonning, B. C., Posse, R. D., Hanzlik, T. N. and Maeda, S. (1990) *Nature* **344**: 458-461.
- Harrap, K. A. and Payne, C. C. (1979) *Adv. Virus Res.* **34**: 110-117.
- Jin, B. R., Park, B. S., Ryu, K. S., Je, Y. H. and Kang, S. K. (1991) *Korean J. Seric. Sci.* **33**: 21-26.
- Jin, B. R., Ryu, C. J., Kang, S. K., Han, M. H. and Hong, H. J. (1995) *Virus Res.* **38**: 269-277.
- Jin, B. R., Ryu, C. J., Park, S. S. Namgung, U., Hong, H. J. and Han, M. H. (1993) *Molec. Immunol.* **30**: 1647-1654.
- Kang, C. Y., Bishop, D. H. L., Seo, J. S., Matsuura, Y. and Choe, M. (1987) *J. Gen. Virol.* **68**: 2607-2614.
- Luckow, V. A. and Summers, M. D. (1988) *Bio/Technology* **6**: 47-55.
- Maeda, S. (1994) In: *Insect cell biotechnology*. Maramorosch, K. and McIntosh, A. H. (eds.) 1-31. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa, M. (1985) *Nature* **315**: 592-594.
- Matthew, R. E. F. (1982) *Intervirolology* **17**: 1-13.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. and Luckow, V. A. (1992) *Baculovirus expression vectors*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Peng Liang *et al.*, (1992) *Science* **257**: 967-971.
- Reis, U., Blum, B., von Specht, B. U., Domdey, H. and Collins, J. (1992) *Bio/Technology* **10**: 910-912.
- Smith, G. E., Summers, M. D. and Fraser, M. J. (1983) *Mol. Cell Biol.* **3**: 183-192.
- Stewart, L. M., Hirst, M. Lopez Ferber, M., Merryweather, A. T., Laylet, P. J. and Posse, R. D. (1991) *Nature* **352**: 85-88.
- Summers, M. D. and Smith, G. (1987) *Texas Agric. Exp. Station Bull.* **1555**: 1-56.
- Tomalski, M. D. and Miller, L. K. (1991) *Nature* **352**: 82-85.
- Tweeten, K. A., Bullo, L. A. and Consigli, R. A. (1981) *Microbiol. Rev.* **45**: 379-408.