

누에 核多角體病 바이러스에 의한 發現 벡터 시스템 開發

陳炳來

서울대학교 農業生命科學大學

緒 論

養蠶産業의 生産性 提高를 위해 꾸준히 연구되어 온 昆蟲 生理·生化學, 遺傳·育種 및 昆蟲病理學 분야는 최근들어 遺傳子 조작 기술의 발전으로 누에 그 자체와 누에에 濃病을 일으키는 누에 核多角體病 바이러스(BmNPV)를 Biotechnology의 좋은 재료로 하여 人체에 유용한 물질 생산을 위한 연구에 관심을 집중시키게 하였다. 특히 BmNPV는 누에세포와 누에 유충에서 有用遺傳子 發現을 위한 高等 眞核 DNA 바이러스 발현 벡터(eucaryotic DNA viral vector)로 연구 개발되었다.

BmNPV를 포함하는 baculovirus의 宿主細胞에서 유전자 발현은 複製 과정에서 일어나는 바이러스 DNA와 蛋白質의 合成 및 시기에 따라 α , β , γ , δ 의 4단계로 구분되며(Kelly, 1982; Blissard and Rohmann, 1990), 이는 immediate early, delayed early, late, very late로 구분되기도 한다. α 단계의 단백질은 감염 후 2~3시간, β 는 6~7시간, γ 는 10~12시간, 마지막 단계인 δ 는 대개 15시간 후 부터 합성되는데 이 시기에 多角體 蛋白質과 p10 단백질이 대량 합성된다.

α 遺傳子の 發現은 바이러스 蛋白質의 合成이 없어도 일어나지만, β 유전자의 발현은 α 유전자의 발현이 선행되어야 한다. 즉 β 유전자에 속하는 39K 단백질의 발현을 조절하는 trans-acting regulatory gene(IE1)은 α 유전자에 속한다. γ 유전자의 발현은 바이러스 DNA의 합성과 거의 비슷한 시기에 일어나며, 이 시기 동안에 major capsid, core protein, envelope glycoprotein 등 구조단백질이 만들어 지고 바이러스 입자(non-occluded virus: NOV)가 생성되는 시기이기도 하다. δ 유전자의 발현은 NOV가 遊離되면서 증가하고, α , β , γ 유전자의 발현은 억제된다. 이 시기에 합성되는 대표적인 단백질은 다각체 단백질과 p10 단백질로, 다각체 단백질은 바이러스 입자를 둘러싸 단지 활성화 보호 역할을 하는 것으로 알려져 있는 다각체의 주성분이며, p10 단백질은 다각체의 형태와 다각체 유리를 위한 宿主細胞의 崩壞에 관련

하는 것으로 알려져 있다. 이들은 감염 후 18~72 시간에 걸쳐 다량합성되는데 다각체 단백질의 경우 발현이 극대화 되었을 때 세포내 전체 단백질의 약 20~50%까지 달한다고 하며, 총 poly A tailed mRNA의 약 20%가 다각체 단백질의 mRNA로 구성되어 있음이 밝혀져, 이는 강력한 promoter 조절에 의한 것으로 연구되었다. 또 이들 유전자의 발현은 일시적으로 조절되어 δ 단계, 즉 very late 시기에 多量合成되는데 이 시기는 NOV 합성이 중단되므로, 바이러스 增殖 즉 NOV 합성과 무관한 非必須 遺傳子임이 확인되었다(Smith *et al.*, 1983; Pennock *et al.*, 1984; Miyamoto *et al.*, 1985). 이러한 사실은 바이러스의 增殖과 複製에는 무관하며, 강력한 promoter 조절에 의한 대량발현이라는 발현벡터로서의 중요한 조건 때문에 多角體 蛋白質 遺傳子에 대한 연구가 집중되고 있다.

다각체 단백질은 29 KDa의 分子量을 가지며, intron을 갖지 않는 single copy 유전자에 의해 coding 되며(Rohmann *et al.*, 1982), RNA 轉寫 수준은 p10 mRNA보다 1.5~2배 정도 더 많이 합성되는 것으로 보고되었다(Min and Bishop, 1991). 따라서 다각체 단백질 유전자의 구조유전자를 발현코자 하는 外來 遺傳子の coding sequence와 교체하여 강력한 다각체 단백질 유전자의 promoter 조절에 의해 有用物質을 다량합성할 수 있는 발현 벡터로서 개발되었다. Baculovirus 발현벡터 시스템(Baculovirus expression vector system)은 1983년 미국 Texas A & M 대학의 Summers 팀에 의해서 최초로 개발되었는데, 이는 AcNPV(*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus)의 다각체 단백질 유전자의 promoter를 이용한 전이벡터 제작과 *St(Spodoptera frugiperda)* 昆蟲細胞株에서 대량발현하는 발현 시스템으로 조작의 용이함, 안전성 및 안정적인 발현수준으로 상당한 주목을 받았다(Smith *et al.*, 1983). 또 1985년 日本 Tottori 대학의 Maeda 등에 의해 BmNPV와 누에 배양세포주 및 누에 유충을 조합한 발현벡터 시스템은 곤충 개체를 異種 蛋白質 生産을 위한 宿主로 이용한 최초의 시도로서, 누에 5령 유충을 이용함으로써 발현 수율을

극대화시킬 수 있는 방법을 가능케 하여 대단한 관심을 집중시켰다(Maeda *et al.*, 1985).

Baculovirus 발현 벡터 시스템은 有用遺傳子를 대량발현 시킬 수 있다는 큰 장점 외에도 비교적 큰 크기의 外來遺傳子를 插入하여도 nucleoprotein이 capsid에 package 될 때 문제점이 없어 外來유전자의 크기에 제한이 적다는 점과 高等 眞核細胞인 昆蟲細胞를 이용하기에 轉移 後 變形 過程(post translational processing)이 일어나 발현된 異種 蛋白質의 生物學的 및 免疫學的 活性이 원래의 단백질과 같은 효과를 나타낸다는 중요한 장점을 지니고 있다(O'Reilly *et al.*, 1992).

또한 多角體 蛋白質 遺傳子와 마찬가지로 감염 말기에 다량합성 되어지며 바이러스 複製와 病原性에 무관한 p10 蛋白質 遺傳子를 이용한 발현 벡터가 개발되었다. 이 p10 단백질 유전자 발현 벡터는 여러가지 목적으로 응용되었는데, 특히 p10 단백질 유전자 promoter를 다각체 단백질 유전자 promoter와 같이 발현 벡터에 이용함으로써 두가지 이상의 유전자를 동시에 발현할 수 있는 二重 遺傳子 發現 시스템(dual gene expression system)이 개발되었다(Weyer *et al.*, 1990). 이는 發現效率 면에서 baculovirus 발현 벡터 시스템을 이용하는 또 다른 장점으로, H鎖와 L鎖로 구성된 抗體 遺傳子를 한 세포내에서 H쇄와 L쇄 각각을 다량발현 시킬수 있으며, 또 이들은 H2 + L2의 완전한 항체 형태로 조합되어 post translational processing에 의해 세포밖으로 分泌 되어짐이 확인되었다. 이처럼 각각의 서로 다른 유전자를 한 세포에서 다량발현 시킬 수 있고, 발현된 異種蛋白質은 각각 세포밖으로 분비되기에 동시에 두 유전자를 발현 할수 있어 효율적인 것으로 보고되고 있다.

한편 최근들어서는 감염 초기 단계의 유전자 발현에 관여하는 IE1 유전자를 이용하여 바이러스 감염 없이 昆蟲細胞株에서 有用遺傳子를 계속 발현할 수 있는 즉 昆蟲細胞를 죽이지 않고 有用유전자를 발현코자 하는 시도가 이루어지고 있다(Jarvis *et al.*, 1990).

따라서 현재 baculovirus 발현 벡터 시스템은 多角體 蛋白質 遺傳子 promoter를 이용한 발현벡터와 p10 유전자 promoter를 이용한 발현벡터 및 IE1 유전자를 이용한 발현벡터로 크게 세분할 수 있으며, 다각체 단백질유전자 promoter를 이용한 baculovirus 발현 벡터 시스템이 대표적이라 할 수 있다.

本 論

1. 多角體 蛋白質의 遺傳子 promoter를 이용한 發現 벡터



Fig. 1. Sequence comparison between the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (Bm) and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (Ac) polyhedrin genes and their surrounding sequences.

Baculovirus는 宿主細胞에 감염한 후 약 12시간이 지나면서 多角體 蛋白質이 合成되기 시작하고, 24시간이 지나면 다각체 형성이 시작된다. 다각체 단백질 합성이 감염말기에 극대화 되었을 때 合成量은 총 세포단백질의 20%에서 50%까지 달하며, 합성된 mRNA의 20%를 차지한다고 보고되고 있다(Smith *et al.*, 1983; Pennock *et al.*, 1984; Miyamoto *et al.*, 1985). 이러한 다각체 단백질은 바이러스의 病原性과 複製에는 무관하며, 일시적으로 강력한 promoter 조절에 의해 다량합성 되기에 다각체 단백질의 構造分析에 관한 연구가 집중되어, 현재 AcNPV, BmNPV, OpNPV(*Origia pseudotsugata* NPV), SeNPV(*Spodoptera exigua* NPV) 등 여러종의 다각체 단백질 유전자가 클로닝되고 鹽基序列이 밝혀졌으며, 이들 간에는 높은 相同性을 보이고 있다(Iatrou *et al.*, 1985; Hoof van Iddekinge *et al.*, 1983; Zanotto *et al.*, 1993)(Fig. 1).

다각체 단백질의 mRNA는 intron이 없어 splicing이 일어나지 않고, nocoding 5' flanking 序列은 약 50~60 염기(nucleotides) 정도이며, AcNPV의 경우 cap site는 -58 上流 부위이다. 5' flanking 부위 중에서 cap site와 AUG codon사이 AT 풍부한 부위가 있는데, 이는 ribosome 결합부위 이거나 RNA polymerase 결합부위로 알려지고 있다. 5' flanking 서열중 약 -60 base 까지는 염기서열이 保存되어 있지만 cap site로부터 상류 염기서열은 각 바이러스 마다 조금씩 염기서열이 다르다. AUG initiation codon의 flanking 서열은 효율적인 轉移 開始에 필요한 Kojak's 법칙에 consensus한 염기서열(GANNATGG)과 비슷한 염기서열을 갖는다. 또 RNA polymerase 認識 부위인 TATA box 類似序列이 cap 부위로부터 -20~-50 상류 위치에 있다. -100 상류 부위에는 두개의 直接 反復 序列(direct repeat sequence)이 있고, CAAT box도 TATA box의 상류지역에 있다. 다각체 단백질 유전자의 3' flanking 부위는 baculovirus의 다각체 단백질 유전자간에 그 길이 및 염기서열에 차이가 있다. OpNPV에서는 TAATAA-like termination signal이 있다. 이러한 다각체 단백질 유전자의 5' flanking 염기서열은 眞核細胞의 promoter 중 가장 강력한 promoter 중의 하나로 관심을 끌고 있다 (Blissard *et al.*, 1989; Theim and Miller, 1989; Rohmann, 1986).

따라서 다각체 단백질 유전자의 構造遺傳子 부위 (structural gene region)를 제거하고, 外來遺傳子를 插入할 수 있는 클로닝 부위를 제작함으로써 발현벡터의 구성요건인 promoter, ribosome 결합부위, signal peptide, poly A signal을 갖추게 된다. 즉, 외래 유용유전자를 강력한 다각체 단백질 유전자 promoter의 조절하에 둠으로서 발현수준과 高等 眞核 細胞를 이용함으로써 Endoplasmic reticulum(ER)과 golgi를 통한 post translational processing에 의해 세포밖으로 分泌됨과 아울러 生物學的 및 免疫學的 活性도가 높은 異種 蛋白質을 효율적으로 대량 생산할 수 있다는 것이다(O'Reilly *et al.*, 1992).

發現水準에 미치는 promoter 부위의 염기序列에 관한 많은 연구결과, 효율적인 발현수준을 위해서는 다각체 단백질 유전자의 轉寫 開始 부위 전의 20 bp로부터 轉移 開始 부위의 서열 전부를 포함하는 non-coding 염기서열이 요구되는 것으로 알려졌다 (Min and Bishop, 1991; Matsuura *et al.*, 1987). 이러한 결과들로 다각체 단백질 유전자의 上流와 下流 遺傳子들을 그대로 둠으로서 발현수준과 재조합 바이러스 제작시 homologous recombination의 효율성

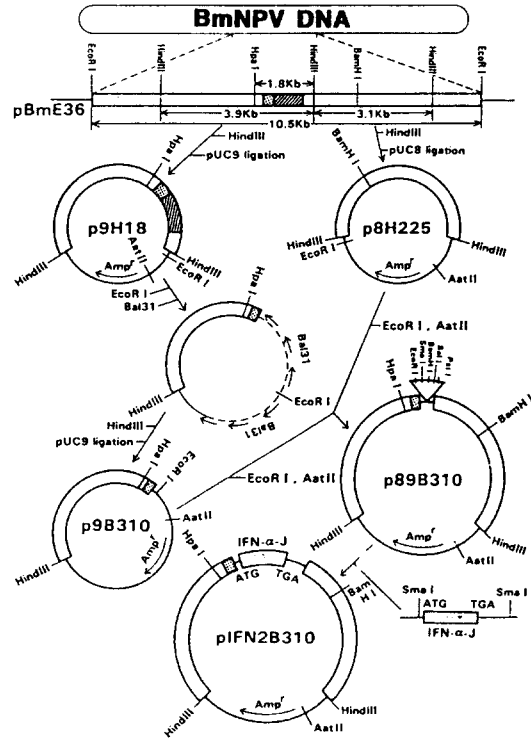


Fig. 2. Construction of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus expression vector (Maeda *et al.*, 1985).

을 증가시켰다. 즉 다각체 단백질 유전자의 구조유전자 부위만을 제거하고, 대신 강력한 다각체 단백질 유전자의 promoter 조절하에 직접 외래 有用遺傳子를 삽입할 수 있는 클로닝 부위를 제작한 발현벡터가 개발되었다(Fig. 2).

따라서 이러한 발현벡터에 발현코자 하는 외래 유전자를 삽입하고 野生株 NPV genome과 섞어 昆蟲 細胞株에 갈습 침전법 등으로 cotransfection 시키면 homologous recombination에 의해 野生株 NPV의 다각체 단백질 유전자포함 절편에 외래 유전자가 포함된 발현벡터의 절편이 대체되어, 그럼으로써 다각체가 형성되지 않는(OCC-) 재조합 바이러스가 0.5~1%의 비율정도로 제작된다. 이 재조합 바이러스를 plaque 檢定法 등으로 光學顯微鏡 하에서 다각체가 형성되지 않은 plaque는 다각체가 형성되는 plaque와 구분이 비교적 용이하기에 쉽게 선별된다. 이렇게 선별된 재조합 바이러스를 곤충 세포주에 감염시키거나 누에 등 곤충 유충 개체에 經皮感染 시킴으로서 宿主細胞에서 바이러스의 增殖에 의해 外來 有用 遺傳子가 다량발현 된다(Summers and Smith, 1987).

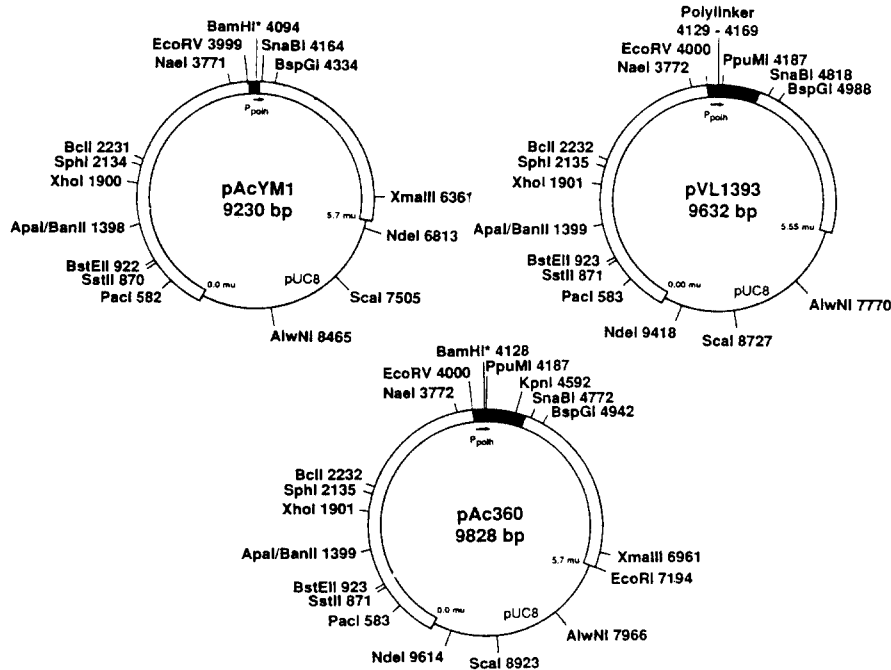


Fig. 3. Baculovirus expression vectors using polyhedrin promoter.

Baculovirus 발현 벡터 시스템은 박테리아(*E. coli*) 발현 벡터 시스템의 결정적인 단점인 post translational modification의 결핍을 해결할 수 있고, 哺乳動物 細胞 發現 벡터 시스템의 독성이 높은 selection drug의 문제, 클론선별에 요구되는 시간 및 발현수준과 아울러 安定性등의 문제점을 극복할 수 있어 현재 특히 醫藥 분야의 연구 등에서 상당히 많이 응용되고 있다. 이러한 점에서 baculovirus 발현 벡터 시스템은 두가지 이상의 유전자를 동시에 발현할 수 있는 발현 벡터 제작, 外來 遺傳子의 轉移 開始點(ATG)이 없어도 다각체 단백질 유전자의 ATG에 의해 발현할 수 있도록 클로닝 부위를 조절한 발현 벡터 및 곤충개체를 이용한 발현 수준의 극대화를 위한 OCC + 발현벡터를 제작함으로써 용이한 經口接種으로 곤충을 이용한 有用物質의 대량생산을 가능케 하였다. 또한 plaque 검정의 번거러움을 제거한 새로운 발현벡터의 제작으로 生物, 醫學 및 農業 研究 분야 등 전반에 걸쳐 이 baculovirus 발현 벡터의 이용도가 상당히 증가되고 있다(O'Reilly *et al.*, 1992)(Fig. 3).

한편, 국내에서도 이미 Iatrou 등(1985)과 Maeda 등(1985)에 의해 발표된 BmNPV와 genome의 制限 酵素 패턴과 多角體 蛋白質 遺傳子의 鹽基序列이 다소 상이한 국내 분리 BmNPV를 이용하여 발현벡터를

제작하고, Lac Z 유전자를 누에세포주와 누에 5령 유충에서 발현하였다는 보고와 함께 새로운 시도로 숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스와 조합하여 발현 효율성 증대 실험을 수행하고 있는 것으로 알려지고 있다(Woo *et al.*, 1995)(Fig. 4).

2. p10 蛋白質 遺傳子의 promoter를 이용한 發現 벡터

p10 단백질 역시 다각체 단백질과 마찬가지로 感染 末期에 다량합성되며, 바이러스의 病原性과 複製에는 무관하며 다각체의 형성과 감염말기 세포의 崩壞에 관련하는 것으로 알려져 있다(Williams *et al.*, 1989; van Oers *et al.*, 1992). 발현 수준에 있어서 mRNA의 合成量으로 비교할 때 다각체 단백질의 mRNA에 비해서는 약 1.5-2배 정도 약하지만, 강력한 promoter 조절에 의한 발현량으로 연구의 관심이 집중되었다 (Min and Bishop, 1991)(Fig. 5).

p10 단백질의 유전자 promoter는 多角體 蛋白質 遺傳子의 promoter와 유사한 양식으로 調節되며, promoter의 강도 역시 유사하다고 할 수 있다. 이 p10 단백질 유전자의 promoter는 轉寫開始點에 필수적인 TAAG 서열을 갖고 있다. p10 단백질 유전자의 鹽基序列은 AcMNPV와 OpMNPV는 크기에 있어서는

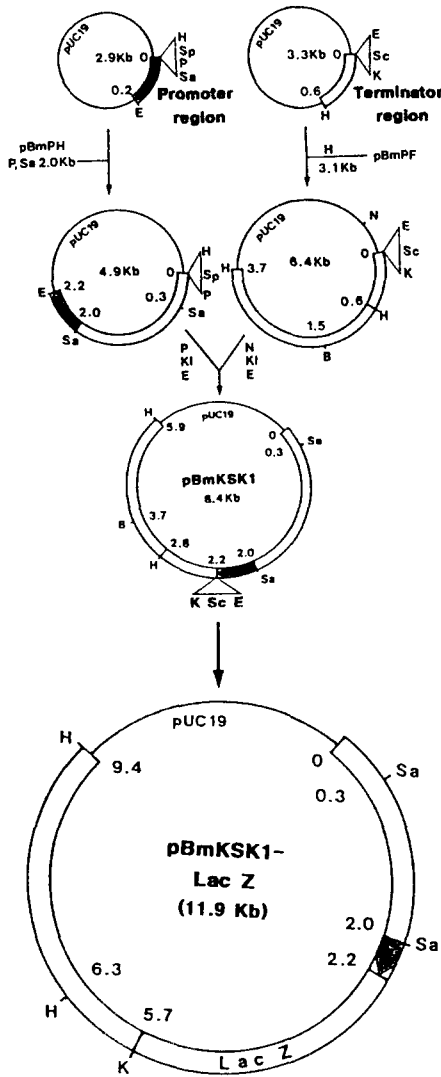


Fig. 4. Schematic diagram of construction of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus expression vector using the polyhedrin gene of *B. mori* nuclear polyhedrosis virus-Korea isolate.

282와 276 nucleotide로 유사하다(Kuzio *et al.*, 1984; Leisy *et al.*, 1986)(그림 6). 多角體 蛋白質 遺傳子의 鹽基序列은 상당히 保存되어 있어 염기서열에 있어서는 약 80%, 아미노산 서열에 있어서는 90%의 相同性を 보이고 있다. 반면 p10 단백질 유전자들 간에는 단지 염기서열에 있어서 54%, 아미노산 서열에 있어서는 41%의 비교적 낮은 相同性を 보이고 있다. SeMNPV는 264 nucleotide, 88 아미노산으로 구성되어 있으며 分子量은 9,607 Da으로 아미노산 상동

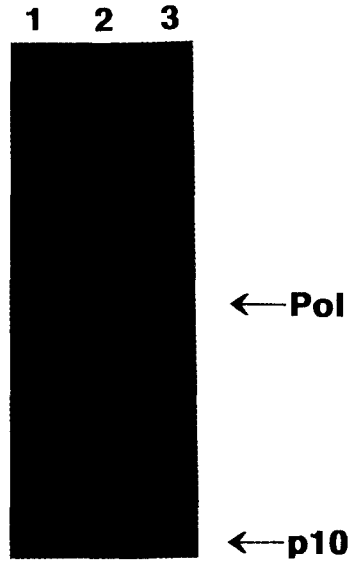


Fig. 5. Expression of polyhedrin and p10 proteins by nuclear polyhedrosis virus. Lane 1, Protein size marker; Lane 2, Mock infected insect cells; Lane 3, Insect cells infected with nuclear polyhedrosis virus.

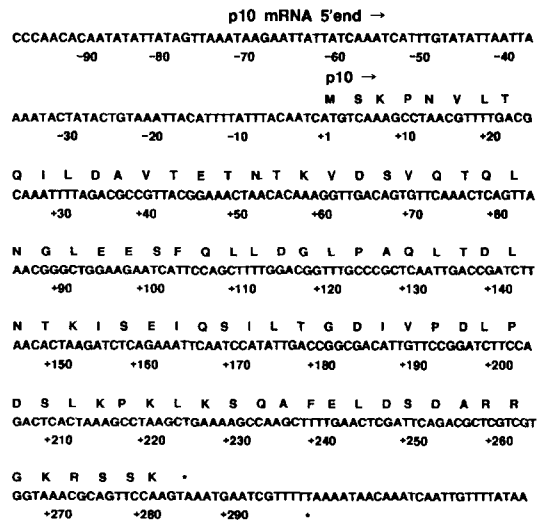


Fig. 6. Nucleotide sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene and flanking 5' and 3' noncoding regions.

성은 OpMNPV와 39%, AcMNPV와는 26%의 상동성을 보이고 있는 것으로 알려 졌다(Zuidema *et al.*, 1993). SeMNPV의 p10 유전자는 baculovirus의 상당히 보존된 감염말기의 유전자 promoter motif

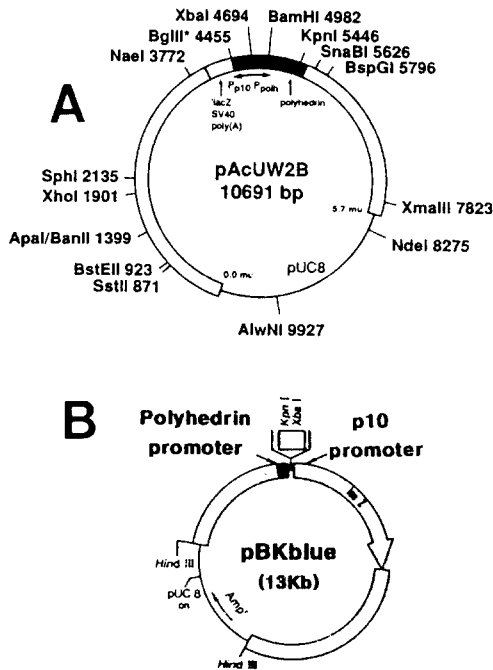


Fig. 7. Dual expression vectors of *Autographa californica* (A) and *Bombyx mori* (B) nuclear polyhedrosis virus using polyhedrin and p10 genes.

TAAG에서 開始되는 약 450 nucleotide의 transcript에 의하여 발현된다. p10 유전자의 높은 발현 수준은 다각체 단백질 유전자 promoter와 유사한 구조로 강력한 promoter 조절에 기인하며, promoter 부위에서 -60 위치에 있는 TAAG motif와 轉移開始点 사이의 서열들은 p10 단백질 유전자의 最適 發現에 필수적임이 밝혀졌다(Weyer and Possee, 1988; 1989).

최근에 이러한 p10 단백질 유전자를 이용하여 다각체 단백질 유전자를 이용한 발현 벡터 제작과 마찬가지로 발현 벡터가 제작되었는데(Fig. 7), 이 p10 단백질유전자 이용은 한 발현 벡터에 의한 두가지 이상의 외래 유전자를 발현하는데 응용되었다(Emery and Bishop, 1987; Weywe and Possee, 1991). 즉, 각각의 외래 유전자를 다각체 단백질 유전자의 promoter와 p10 단백질 유전자의 promoter 조절하에서 발현시킴으로서 두 유전자는 promoter 強度의 분산 없이 각각의 promoter에 의해 大量發現될 수 있는 dual expression vector가 개발됨으로서 H鎖와 L鎖로 구분되어 있는 抗體 遺傳子의 용이한 발현은 물론 두 가지 유전자에 대한 각각의 재조합 바이러스 제작과

동일한 MOI 값으로 조절하여 각각의 재조합 바이러스를 동시감염 시켜야 하는 번거러움을 들 수 있다. 또한 dual expression vector는 단백질과 단백질의 相互作用에 관한 연구에 응용될 수 있고, 항체 유전자의 각각 발현 후 H쇄 L쇄의 조합 등 단백질 상호작용의 결과로 유도되는 바이러스 유사 입자의 형성 등으로 免疫性이 좋은 재조합 백신 생산에 응용되고 있다. 또한 최근에는 p10 단백질 유전자를 이용한 dual expression vector를 응용하여 p10 단백질 유전자 부위에 Lac Z 유전자를 도입함으로써 재조합 바이러스의 선별이 용이한 발현 벡터가 개발되었다(Vlak *et al.*, 1990).

한편, 국내에서도 BmNPV p10 단백질 유전자의 promoter를 다각체 단백질 유전자 promoter를 이용하여 제작된 발현 벡터(Woo *et al.*, 1995)와 조합하여 발현 효율성 증대 실험을 수행하고 있다.

3. IE1 遺傳子의 promoter를 이용한 發現 벡터

Promoter의 強度에 의한 發現 水準에 있어서는 다각체 단백질 유전자나 p10 단백질 유전자를 이용한 발현 벡터에 비교될 수는 없지만, 바이러스 感染없이 昆蟲細胞株에서 계속적으로 외래 유전자를 발현코자 하는 새로운 발현 벡터로서의 응용 가능성에 대한 연구가 최근들어 바이러스 유전자의 초기 발현 메카니즘 연구와 함께 관심이 집중되고 있다.

바이러스 감염기 동안에 IE1유전자는 67 KDa 단백질을 encode하고 있는 ORF로 unspliced 1.9 Kb RNA 로서 轉寫된다(Guarino and Summers, 1987). IE1 ORF는 또한 spliced 유전자 IE0의 한 부분으로 발현된다. IE0는 아미노산 말단에 融合되어 있는 54 아미노산의 부가를 제외하고는 IE1과 동일하다. IE0는 上流 promoter로부터 개시되는 spliced mRNA로부터 轉移된다(Chisholm and Henner, 1988). IE0는 일시적으로 감염 후 즉시와 말기에 걸쳐 발현된다. 반면 IE1은 전 감염기 동안에 발현된다(Kovacs *et al.*, 1991). 또한 IE1은 바이러스 유전자의 발현조절에 있어서 중심 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, IE1은 그 자신의 promoter 뿐만아니라 early promoter로 알려진 모든 promoter의 발현을 조절한다. 이러한 감염 초기에 있어서 IE1의 필수적인 역할은 최근에 두 아미노산이 대체된 溫度感受性 AcNPV 變異의 轉寫 實驗에서 밝혀졌다(Ribeiro *et al.*, 1994). IE1은 또한 두 다른 transregulatory factors, IE2와 IE0의 발현을 조절하며, 감염 말기 유전자들의 발현을 위해 적, 간접적으로 요구된다(Passzrelli and Miller, 1993). 이러한 IE1이 transactivation 기능을 위해서는 이

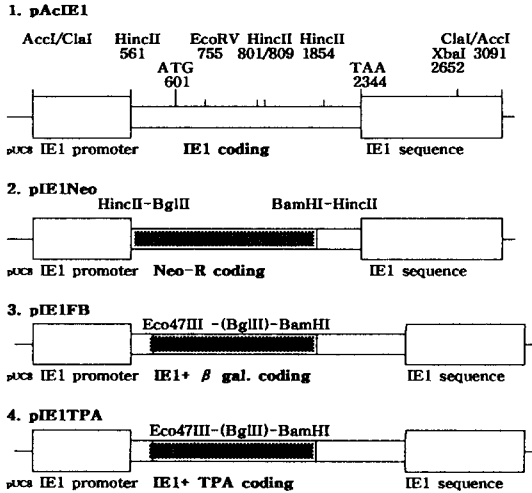


Fig. 8. Diagrams of expression vectors using *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* IE1 gene.

단백질의 N 말단에 풍부한 acidic 아미노산 잔기가 중요한 역할을 하며, C 말단의 약 70 아미노산은 IE0와 IE2 promoter로부터 발현의 trans 억제와 DNA 결합을 위해 요구되는 것으로 알려 졌다. IE0와 IE2는 IE1의 발현을 증가시키는데 모든 유전자들의 간접적인 activating 발현은 높은 발현 수율을 위해 IE1에 의존된다(Kovacs *et al.*, 1991; Yoo and Guarino, 1994). OpNPV의 IE1유전자는 AcNPV의 IE1 유전자와의 相同性에 의해 밝혀 졌는데, 이들 유전자 간의 아미노산 상동성은 약 63%로 C 말단의 acidic 아미노산 잔기는 保存되어 있다(Theilmann and Stewart, 1991).

AcMNPV는 바이러스 genome에 散在되어 있는 76에서 800 bp의 5개의 큰 homologous DNA region(hr1에서 hr5) 들은 early 39K promoter의 cis-activate 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다(Guarino *et al.*, 1986). 484 bp의 hr5 enhancer의 鹽基序列은 60 bp의 direct repeat(DR60) 내에 24 bp의 inverted repeat(IR 24)의 6 copy와 30 bp direct repeat(DR30)의 3 copy로 나타난다. hr들은 위치와 방향에 무관한 양식의 轉寫 促進 能力을 가지고 있는 enhancer elements의 일반적인 특징들을 보이고 있다. 이러한 hr5는 바이러스 genome 내의 transcriptional enhancer로서 기능을 가진다. IE1은 delayed early 유전자들과 적어도 하나의 감염 말기 유전자를 transactivating 하는 다중기능의 轉寫調節 蛋白質으로 특이한 hr5 결합활성을 포함하는 것 뿐만아니라 DNA 결합 단백질로서의

기능도 가지고 있다(Guarino and Summers, 1986). 이러한 IE1 유전자의 promoter를 이용하여 外來 遺傳子를 插入시켜 곤충 宿主 細胞에 形質轉換 시킴으로 숙주세포의 chromosome에 끼어 들어 바이러스 감염 없이 즉 숙주세포를 죽이지 않고 연속적으로 안정되게 外來 유전자를 발현시킬 수 있다고 보고되었다(Jaris *et al.*, 1990)(Fig. 8).

IE1유전자 promoter를 이용한 外來 遺傳子 發現은 기존의 다각체 단백질 유전자나 p10 단백질 유전자 promoter를 이용한 발현 벡터와는 다른 새로운 시도로 發現 水準에 있어서 해결되어야 할 문제점들이 있지만 바이러스 감염이 없기에 숙주세포를 죽이지 않고 연속적으로 안정되게 外來 유전자를 발현한다는 점에서 효율적이라 할 수 있겠다. 그러나 이 IE1 유전자 promoter를 이용한 발현 벡터를 개발하기에는 발현수준 등 아직 해결되어야 할 연구과제가 많다고 할 수 있겠다.

結 論

Baculovirus 발현 벡터 시스템은 안정적인 높은 발현 수율 뿐만아니라 高等 眞核細胞를 이용한다는 점에서 상당한 관심과 실제 醫藥研究 분야 등에서 효율적으로 응용되고 있다. 이러한 점에서 baculovirus 발현 벡터 시스템의 效率性 提高에 관한 연구 역시 그 동안 많이 진척되어 발현코자 하는 外來 유전자의 용이한 插入을 위한 轉移開始點 조절 벡터 및 다중 클로닝 부위가 첨가된 발현 벡터, 두가지 이상의 外來 유전자를 동시에 발현할 수 있는 벡터 및 재조합 바이러스 선별의 번거러움을 없앤 즉 宿主細胞에 transfection 후 재조합 바이러스만 생길 수 있도록 만든 발현 벡터 등 다양한 baculovirus 발현 벡터가 개발되었다. Baculovirus 발현 벡터 시스템의 이러한 진전은 生物, 醫藥 분야 뿐만아니라 農業 분야 등 전반에 걸쳐 응용되는 결과를 가져왔다.

또한, 微生物 殺蟲劑 開發 분야에도 응용되어 baculovirus 발현 벡터를 이용, scorpion toxin 및 neurotoxin 遺傳子 등을 삽입하여 바이러스 살충체의 단점인 遲效性과 비교적 낮은 病原性을 극복코자 하는 시도가 보고되고 있다. 또 多角體가 형성되면서 外來 유전자를 발현할 수 있는 OCC+ 벡터의 개발로 누에 등 昆蟲 個體 이용시 효율적이고, 바이러스 살충체 응용시 실제 야외 살포가 가능하여 유리하도록하였다.

한편, baculovirus 발현 벡터 시스템의 높은 효율성의 장점에 반해 糖鎖附加(glycosylation)가 哺乳動物 細胞에서와 다소 다르다는 앞으로 연구되어야 할 점도

있으나 眞核 및 原核細胞의 다양한 유전자들의 발현에서 곤충세포에서의 post translational processing이 動物細胞에서 일어나는 것과 유사하여 生物學的 및 免疫學的 活性도가 거의 동일한 것으로 알려지고 있다. 또한 연구되어야 할 과제 중의 하나로 發現水準에 있어서도 곤충 숙주세포에서 바이러스 감염시 발현되는 원래의 多角體 蛋白質의 수준에는 훨씬 못 미치고 있으며, 발현코자 하는 外來 遺傳子에 따라 발현의 수준이 다르게 나타나고 있다는 것이다. 이러한 점은 baculovirus의 遺傳子 調節 및 昆蟲細胞에 대한 細胞生物學 및 分子生物學的인 研究와 더불어 baculovirus 발현 벡터의 효율성 증대에 관한 연구로 극복되리라 기대되며, 아울러 baculovirus 발현 벡터 시스템은 biotechnology의 좋은 재료로서 醫藥 분야 뿐만 아니라 農業 분야 등에서도 產業的인 應用이 계속 증대되리라 기대된다.

引用 文 獻

- Blissard, G. W. and Rohrmann, G. F. (1990) *Ann. Rev. Entomol.* **35**: 127-155.
- Blissard, G. W., Quant-Russel, R. L., Rohrmann, G. F. and Beaudreau, G. S. (1989) *Virology* **168**: 354-362.
- Chisholm, G. E. and Henner, D. J. (1988) *J. Virol.* **62**: 3193-3200.
- Emery, V. C. and Bishop, D. H. L. (1987) *Protein Engin.* **1**: 359-366.
- Guarino, L. A., Gonzalez, M. A. and Summers, M. D. (1986) *J. Virol.* **60**: 224-229.
- Guarino, L. A. and Summers, M. D. (1986) *J. Virol.* **60**: 215-223.
- Guarino, L. A. and Summers, M. D. (1987) *J. Virol.* **61**: 2091-2099.
- Hooft van Iddekinge, B. J. L., Smith, G. E. and Summers, M. D. (1983) *Virology* **131**: 556-565.
- Iatrou, K., Ito, K. and Witkiewicz, H. (1985) *J. Virol.* **54**: 436-445.
- Jaris, D. L., Fleming, J. A. G. W., Kovacs, G. R., Summers, M. D. and Guarino, L. A. (1990) *Bio/Technology* **8**: 950-955.
- Kelly, D. C. (1982) *J. Gen. Virol.* **63**: 1-13.
- Kovacs, G. R., Guarino, L. A., Graham, B. L. and Summers, M. D. (1991) *Virology* **185**: 633-643.
- Kovacs, G. R., Guarino, L. A. and Summers, M. D. (1991) *J. Virol.* **65**: 5281-5288.
- Kuzio, J., Rohl, D. Z., Curry, C. J., Krebs, A., Carstens, E. B. and Faulker, P. (1984) *Virology* **139**: 414-418.
- Leisy, D. J., Rohrmann, G. F., Nessen, M. and Beaudreau, G. S. (1986) *Virology* **153**: 157-167.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa, M. (1985) *Nature* **315**: 592-594.
- Matsuura, Y., Possee, R. D., Overton, H. A. and Bishop, D. H. L. (1987) *J. Gen. Virol.* **68**: 1233-1250.
- Min, M. K. and Bishop, D. H. L. (1991) *J. Gen. Virol.* **72**: 2551-2556.
- Miyamoto, C., Smith, G. E., Farrell-Towt, J., Chizovite, R., Summers, M. D. and Ju, G. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**: 2860-2865.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. and Luckow, V. A. (1992) *Baculovirus expression vectors*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Passarelli, A. L. and Miller, L. K. (1993) *J. Virol.* **67**: 2149-2158.
- Pennock, G. D., Shoemaker, C. and Miller, L. K. (1984) *Mol. Cell Biol.* **4**: 399-406.
- Ribeiro, B. M., Hutchinson, K. and Miller, L. K. (1994) *J. Virol.* **68**: 1075-1084.
- Rohrmann, G. F. (1986) *J. Gen. Virol.* **67**: 1499-1513.
- Rohrmann, G. F., Martignoni, M. E. and Beaudreau, G. S. (1982) *J. Gen. Virol.* **62**: 137-143.
- Smith, G. E., Fraser, M. J. and Summers, M. D. (1983) *J. Virol.* **46**: 584-593.
- Smith, G. E., Summers, M. D. and Fraser, M. J. (1983) *Mol. Cell Biol.* **3**: 183-192.
- Summers, M. D. and Smith, G. E. (1987) *Texas Agric. Exp. Station Bull.* **1555**: 1-56.
- Theim, S. M. and Miller, L. K. (1989) *J. Virol.* **63**: 2008-2018.
- Theilmann, D. A. and Stewart, S. (1991) *Virology* **180**: 492-508.
- van Oers, M. M., Malarme, D., Jore, J. M. and Vlask, J. M. (1992) *Arch. Virol.* **123**: 1-9.
- Vlask, J. M., Schouten, A., Usmany, M., Belsham, G. J., Klinge-Roode, E. C., Maule, A. J., Van Lent, J. W. and Zuidema, D. (1990) *Virology* **179**: 312-320.
- Weyer, U., Knight, S. and Possee, R. D. (1990) *J. Gen. Virol.* **71**: 1525-1534.
- Weyer, U. and Possee, R. D. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**: 3635-3653.
- Weyer, U. and Possee, R. D. (1989) *J. Gen. Virol.* **70**: 203-208.
- Weyer, U. and Possee, R. D. (1991) *J. Gen. Virol.* **72**: 2967-2974.
- Williams, G. V., Rohel, D. Z., Kuzio, J. and Faulkner, P. (1989) *J. Gen. Virol.* **70**: 187-202.
- Woo, S. D., Kim, W. J., Jin, B. R. and Kang, S. K. (1995) *Korean J. Seric. Sci.* **37**: 46-51.
- Yoo, S. and Guarino, L. A. (1994) *Virology* **202**: 746-753.
- Zanotto, P. M. A., Kessing, B. D. and Maruniak, J. E. (1993) *J. Invert. Pathol.* **62**: 147-164.
- Zuidema, D., van Oers, M. M., van Strien, E. A., Caballero, P. C., Klok, E. J., Goldbach, R. W. and Vlask, J. M. (1993) *J. Gen. Virol.* **74**: 1017-1024.