

누에 핵다각체 바이러스의 세포증식에 대한 누에 체액의 영향

禹秀東 · 金宇鎮 · 陳炳來 · 姜錫權

서울대학교 農業生命科學大學

Effect of Hemolymph of Silkworm Larvae on the Multiplication of *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus in BmN-4 Cells

Soo Dong Woo, Woo Jin Kim, Byung Rae Jin and Seok Kwon Kang

College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

To investigate the effect of hemolymph of silkworm larvae on the multiplication of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) in BmN-4 cells, BmN-4 cells were infected with BmNPV, which were sequentially treated with the hemolymph extracted from *B. mori* larvae. When the culture media TC-100 containing 3% fetal bovine serum was mixed with 10% hemolymph heated at 65°C for 30 minutes, the released polyhedra by multiplication of BmNPV in BmN-4 cells were increased more than those of non-treated. However, multiplication of BmNPV in BmN-4 cells treated with non-heated hemolymph was not effective, since non-heated hemolymph was toxic for the cell growth. The result of plaque assay showed that plaque forming units in BmN-4 cells treated with heated hemolymph are significantly increased, suggesting that efficiency of multiplication of BmNPV in BmN-4 cells is due to increase not of cell growth but of infectivity of BmNPV.

Key words : Hemolymph, multiplication, BmNPV, BmN-4 cell

緒 論

Baculovirus의 subgroup A에 속하는 핵다각체 바이러스 (nuclear polyhedrosis virus : 以下 NPV로 略함)는 DNA 바이러스로 感染末期에 多角體 蛋白質을 多量 合成하며 多角體를 형성하는 特性으로 인해, 바이러스 複製와 病原성에 무관한 多角體 蛋白質 遺傳子를 外來 遺傳子로 代替함으로써 有用物質을 多量 合成 할 수 있는 baculovirus 發現系로 이용되고 있다 (Hooft van Iddenkinge *et al.*, 1983; Smith *et al.* 1983; Maeda *et al.* 1985). 이 發現系를 이용하여 생산된 物質은 그 活性 및 免疫學的 特性이 원래의 物質과 類似하며 또한, 發現效率도 酵母나 動物細胞 등을 이용한 다른 發現系에 比하여 높음으로써 다양

한 外來 遺傳子의 發現이 보고되고 있다 (Pennock *et al.*, 1984; Luckow and Summers, 1988; O'Reilly *et al.* 1992). Baculovirus 發現系는 현재, *Autographa californica* NPV (以下 AcNPV로 略함)와 *Bombyx mori* NPV (以下 BmNPV로 略함)를 이용한 두종류가 개발되어 있으나, 培養細胞 이용이 容易한 AcNPV 發現系에 대하여 주로 연구가 이루어지고 있다 (Blissard and Rohrmann 1990; Luckow and Summers, 1988). 그에 비하여 BmNPV 發現系는 누에 幼蟲 生體를 이용함으로써 外來 遺傳子의 發現量을 더욱 높일 수 있는 長點을 가지고 있으나, 培養細胞에서의 바이러스 增殖效率이 낮아 物質生産이라는 産業化에서의 短點때문에 그 연구 개발이 未盡한 상태이다. 따라서, 본 연구는 baculovirus 發現系로서 BmNPV

를 利用할 時 그 短點인 낮은 바이러스 增殖效率을 향상시킬 수 있는 방안으로, 細胞培養液에 누에 幼蟲體液을 添加하여 그에 따른 BmNPV의 感染 및 增殖效果를 연구 조사하였다.

材料 및 方法

1. 供試昆蟲 및 바이러스

體液 採取를 위해 農村振興廳 蠶業試驗場에서 分讓받은 4齡의 白玉蠶을 室內溫度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相對濕度 $70 \pm 5\%$ 조건에서 동방유량(주)의 애누에 人工飼料로 飼育하였다. 바이러스는 國內의 養蠶農家에서 收集, 分離한 누에 핵다각체 바이러스를 누에 幼蟲 및 細胞株에서 增殖시켜 實驗에 이용하였다.

2. 昆蟲細胞株 培養 및 바이러스 接種

누에의 卵巢에서 由來된 *B. mori* 細胞株인 BmN-4를 日本 蠶絲·昆蟲農業技術研究所의 Kobayashi 博士로부터 分讓받아, Summers 등 (1987)의 方法에 따라 fetal bovine serum (以下 FBS로 略함)이 10% 添加된 TC-100 (Sigma Co.) 細胞培養液으로 1주일에 2회 繼代培養하였다. 昆蟲細胞株에 대한 바이러스의 接種은 細胞培養用 플라스크 (25 cm^2)당 3.0 ± 10^6 濃度로 monolayer가 형성된 細胞에 1×10^5 PFU 濃度の 바이러스 NOV (non-occluded virus)를 接種하였다. 接種 1시간 후 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위하여 새 培養液으로 2~3회 洗滌하고, 培養液 5 ml을 보충하여 27°C 항온기에서 배양하였다.

3. 누에 幼蟲 體液의 採取, 熱處理 및 使用

누에 5齡 3일째 幼蟲의 腹股를 잘라 얼음위에서 냉각된 튜브에 體液을 採取하고, 熱處理 溫度는 無處理를 포함하여 65, 70, 80, 90°C 로 각각 30분간씩 처리한 후, 4°C 에서 5,000 rpm으로 10분간 원심하여 上清液을 취하고 0.2 μm millipore filter로 濾過하였다. 이렇게 준비된 각 體液 10%와 FBS 3%를 바이러스가 接種된 BmN-4의 培養液에 添加하고, 시간별로 각각의 培養液을 수거한 뒤, 放出된 多角體 수를 hemocytometer로 조사하여 効果적인 熱處理 溫度를 決定하였다. 또한 熱處理 實驗에서 결정된 온도로 熱處理한 體液과 FBS의 첨가량을 조사하기 위해 FBS 10%와 體液 0%, FBS 3%와 體液 0%, FBS 0%와

體液 10% 그리고 FBS 3%와 體液 10%의 농도로 바이러스가 接種된 BmN-4의 培養液에 각각 添加하고 放出된 多角體 수를 조사하였다.

4. Plaque assay

$60 \times 15\text{ mm}$ 배양 접시에 2.0×10^6 농도로 細胞를 분주하고 1시간 동안 정치한 후 培養液을 제거하고, FBS가 함유되지 않은 培養液 1 ml를 添加하여 바이러스를 1시간 동안 接種하였다. 그 후, 接種液을 제거하고 새 培養液으로 2회 세척하여 感染되지 않은 바이러스를 제거하고, Sea Plaque Agarose (Sigma Co.)가 1.5% 함유된 培養液 3 ml를 보충하여 27°C 에서 배양하였다. 接種 3일 후 plaque 形成 有無를 倒立顯微鏡으로 관찰하고 그 수를 조사하였다.

結果 및 考察

1. 누에 體液의 熱處理 效果

5齡 3일째의 누에 幼蟲 體液이 細胞 增殖에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 열처리하지 않은 體液 10%를 BmN-4 培養液에 添加한 결과, 24시간 경과 후 細胞의 증식양상은 細胞들간에 凝集現象이 일어나고 細胞가 小形化되는 등 全般的으로 증식상태가 惡化되는 결과를 보였다 (그림 1). 이러한 결과는 細胞培養에 필수적인 FBS의 경우, polyamine oxidase나 抗體 등으로 推定되는 細胞增殖 阻害物質에 의한 것 (Harrington and Godman, 1980)과 같은 現象으로 推定된다. 따라서 細胞培養液에 體液을 添加하기 위해서 누에 幼蟲으로 부터 抽出한 體液을 65, 70, 80, 90°C 에서 30분간씩 각각 처리하고, BmN-4 培養液에 각각 同一한 量으로 FBS와 함께 添加한 후 바이러스를 接種하여 放出된 多角體 數를 조사하였다. 接種 후 96시간에 放出된 多角體의 數를 體液이 添加되지 않은 대조구와 비교하였을 때, 누에 體液이 添加된 모든 처리구에서 높게 나타났으며 특히, 65°C 에서 30분간 처리한 경우 대조구에 비해 약 10배정도로 가장 높게 나타났다 (그림 2). 그러나 體液이 添加된 처리구에서도 처리온도가 높아질수록 방출된 多角體의 수가 감소하는 결과를 보였는데, 이는 열처리를 통해 細胞를 손상시키는 要因은 제거되나 바이러스의 증식에 영향을 주는 要因은 온도가 높아지므로써 그 活性이 낮아진 결과로 推定된다.

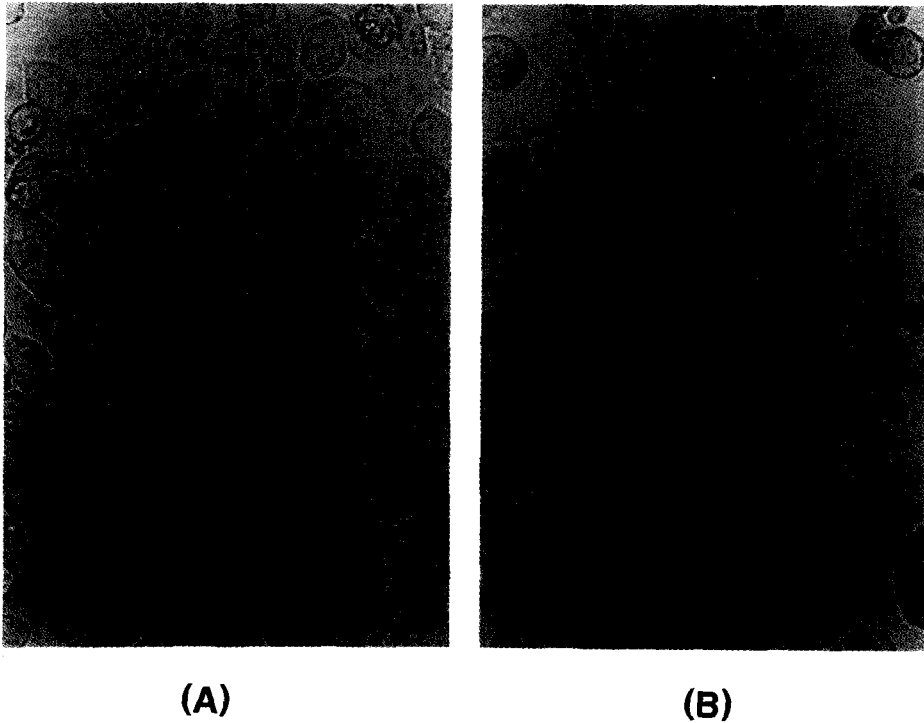


Fig. 1. Effect of non-heated hemolymph on the multiplication of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *BmN-4* cells infected with *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus were cultured in TC-100 media containing 10% FBS (A) or 3% FBS and 10% hemolymph (B), respectively.

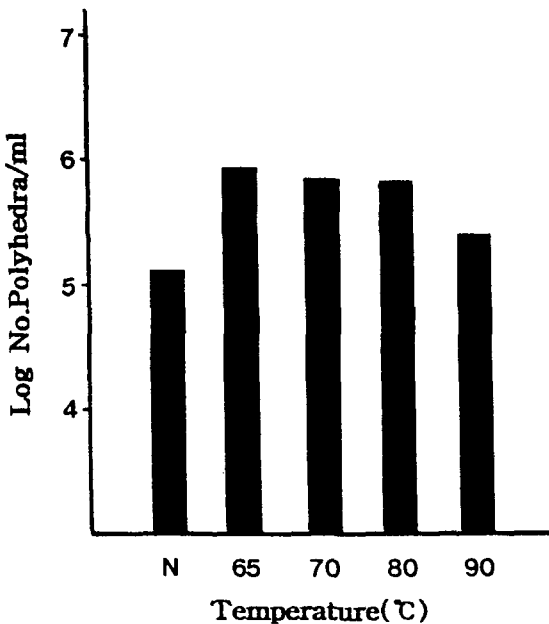


Fig. 2. Effect of hemolymph treated with various temperature on the number of released polyhedra in *BmN-4* cells infected with *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus at 96 hrs post infection.

2. 누에 體液의 添加量에 따른 效果

65°C에서 30분간 熱處理한 體液 0%와 10% 그리고 FBS 0%, 3% 및 10%를 각각 組合하여 細胞培養液에 添加하고, 바이러스를 接種한 후 60시간 부터 방출된 多角體 수를 조사하였다. 그 결과 FBS 3%와 體液 10%를 添加하였을 때 방출된 多角體의 수가 가장 많은 결과를 보여 가장 效果적임을 확인하였다 (그림 3). 이러한 결과는 바이러스 接種時 FBS가 들어있지 않은 培養液을 接種液으로 이용하므로써 細胞株에서의 바이러스 初期 感染率을 높혀주는것 (Summers and Smith 1987)과 FBS의 양을 줄이는것이 바이러스 증식에는 效果적이라는 보고 (今西重雄 等, 1991)와 일치한다. 또한 體液 10%에 FBS 3%가 添加되었을 때 가장 效果적인 결과는 體液만으로는 細胞增殖이 충분하지 않으므로 최소한의 FBS 添加가 필요한 것으로 여겨진다.

3. 누에 體液 添加에 의한 plaque 形成率

處理溫度와 添加量 決定 實驗 結果에 따라 65°C로 30분간 처리한 體液 10%와 FBS 3%를 細胞培養液에

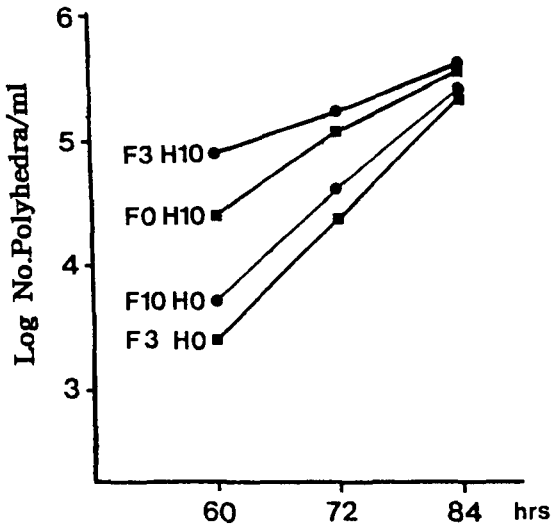


Fig. 3. The number of released polyhedra according to addition of hemolymph in BmN-4 cells. The hemolymph was heated at 65°C for 30 minutes. F, H and number represent FBS, hemolymph and percentage of hemolymph or FBS, respectively.

添加하고 바이러스를 接種한 결과, 接種 72시간에 體液이 添加되지 않은 것에 비하여 보다 높은 多角

體의 放出을 확인할 수 있었다 (그림 4).

이와 같은 결과에 대해서 그 原因이 細胞 增殖率의 向上에 의한 것인지 또는 바이러스 增殖率의 向上에 의한 것인지 與否를 조사하기 위하여, FBS를 3% 또는 10%만 細胞培養液에 添加한 경우와 FBS 3%와 體液 10%을 細胞培養液에 添加한 경우, BmNPV에 의한 plaque 形成率을 비교하였다. 接種 72시간에 형성된 plaque의 수는 體液이 添加되지 않은 것에 비하여 體液이 添加된 培養細胞에서 BmNPV의 감염에 의한 plaque 形成率이 3배 이상 높게 나타났다 (그림 5). 이러한 결과는 Imanishi 등 (1993)의 BmNPV를 接種하여도 感染되지 않는 MM 培養液으로 배양한 細胞에 누에 體液의 첨가시 BmNPV가 증식되었다는 보고를 참고할 때, 바이러스 增殖率의 증가는 細胞의 增殖에 의한 것보다 바이러스 感染性的 증가에 의한 결과로 보여진다.

따라서 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 幼蟲形質의 변화없이 量的確保가 가장 容易한 누에 5齡 3일째의 유충을 이용하여 65°C에서 30분간 처리한 누에 體液 10%와 FBS 3%를 BmNPV가 接種된 BmN-4 培養液에 첨가하였을 때 바이러스 感染性的의 증가로 인해

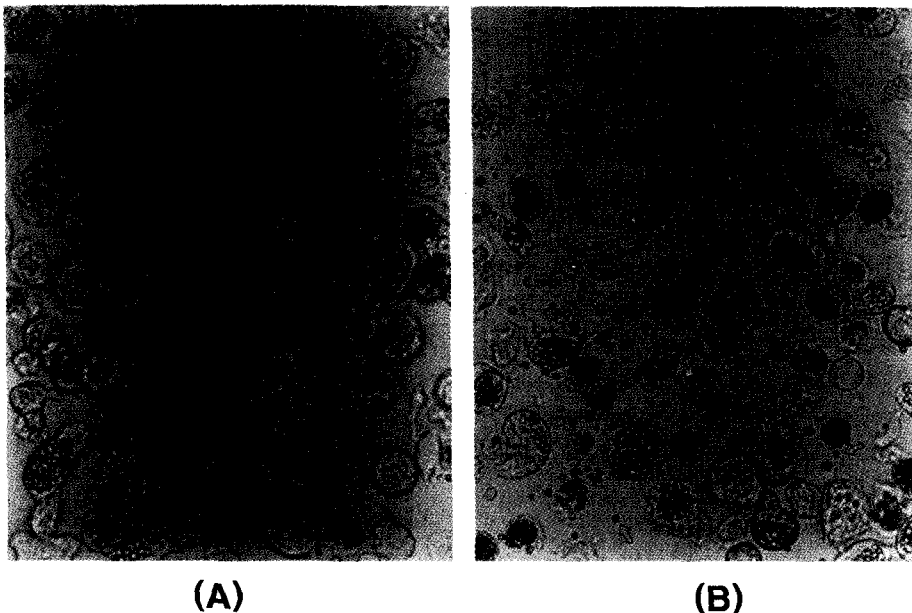


Fig. 4. Micrographs of BmN-4 cell infected with *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus at 72 hrs post infection. BmN-4 cells infected with *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus were cultured in TC-100 containing 10% FBS (A) or 3% FBS and 10% hemolymph (B), respectively. The hemolymph was heated at 65°C for 30 minutes. Arrows indicate released polyhedra.

No.Plaque

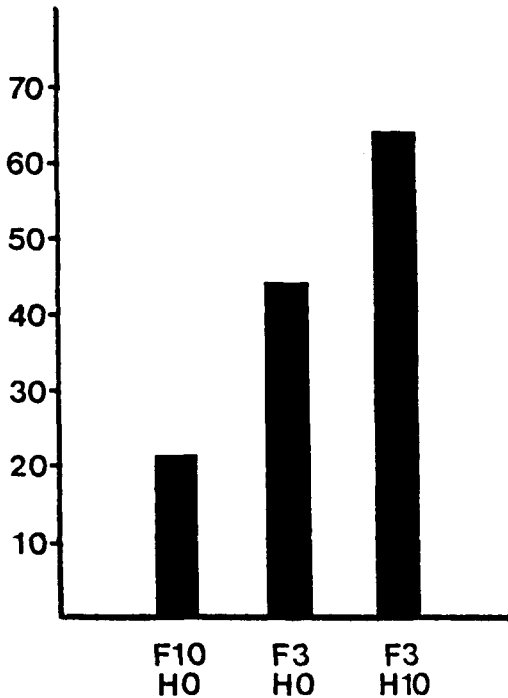


Fig. 5. The number of plaques in BmN-4 cells infected with *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus at 72 hrs post infection. F, H and number represent FBS, hemolymph and percentage of hemolymph or FBS, respectively.

바이러스 증식이 효과적으로 나타났다. 이러한 결과를 기초로 누에 幼蟲 體液內的 바이러스 增殖 向上 要因을 物質水準 및 遺傳子 水準에서 究明하게 된다 면, BmNPV를 이용한 baculovirus 發現系를 보다 效率的으로 活用할 수 있는 계기가 마련될 것으로 기대된다.

摘 要

Baculovirus 發現系에서 BmNPV의 增殖效率을 向上시키기 위하여, 누에 幼蟲 體液의 BmN-4 細胞 株에서 BmNPV 增殖에 미치는 影響을 조사하였다. 5齡 3일째의 누에 幼蟲으로 부터 體液을 抽出하여 BmN-4 培養液에 添加한 결과, 熱處理하지 않은 누에 體液의 添加는 細胞의 凝集과 小形化 현상으로 인해 細胞의 增殖을 阻害한 반면, 65°C에서 30분간 熱處理한 體液 10%와 FBS 3%를 細胞培養液에 添加한 것이 바이러스 感染에 의해 放出된 多角體의 數가

가장 많은 것으로 나타나 바이러스 增殖에 가장 效 果적이었다. 또한 plaque assay 결과, 體液의 添加에 의한 바이러스 增殖效率의 증가는 細胞의 增殖에 의 한 것이라기 보다 바이러스 感染性的 증가에 起因하 는 것으로 보여진다.

謝 辭

本 研究는 農村振興廳 特定課題(蠶業試驗場) 및 SRC 研究費 支援에 의하여 遂行되었음.

引用文獻

- Blissard, G.W. and G.F. Rohmann (1990) Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 127-155.
- Harrington, W.N. and G.C. Godman (1980) A selective inhibitor of cell proliferation from normal serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 423-427.
- Hooft van Iddekinge, B.J. L., G.E. Smith and M.D. Summers (1983) Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 131: 5561-5565.
- Imanishi, S., H. Inoue, J. Kobayashi, K.O. Kadono, H. Kawamoto, S. Belloncik, N. Kuwabara, H. Sakamoto and S. Tomita (1993) In vitro multiplication of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.* No. 7: p.928.
- 今西重雄 · 門野敬子 · 小林淳 (1991) 低血清培地における多角體形成: カイコ體液中の促進因子および培地による差異. *日蠶講要*. 61: p.77
- Luckow, V.A. and M.D. Summers (1989) High level expression nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*. 170: 31-39.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto and M. Furusawa (1985) Production of human β -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315: 592-594.
- O'Reilly, D.R., L.K. Miller and V.A. Luckow (1992) Baculovirus expression vectors. W. H. Freeman and Company, New York.
- Pennock, G.D., C. Shoemaker and 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.
- Smith, G.E., M.D. Summers and M.J. Fraser (1983) Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165.
- Summers, M.D. and G.E. Smith (1987) A methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* No. 1555.