

두 종류의 다각체 단백질 유전자를 발현하는 유전자 재조합 핵다각체병 바이러스의 특성

김우진 · 우수동 · 김혜성 · 진병래 · 강석권

서울대학교 농업생명과학대학

Characterization of Recombinant Baculovirus Expressing Polyhedrin Gene of *Bombyx mori* and *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus

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

College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Recombinant baculoviruses having expanded host range were selected by coinfection of *Autographa californica* NPV and *Bombyx mori* NPV into Sf-9 and BmN-4 insect cell lines. In order to determine the polyhedra morphology of RecS-A6, one of a recombinant baculovirus, polyhedra of RecS-A6 produced in insect cells were observed by phase contrast microscope and scanning electron microscope. The results revealed that the recombinant baculovirus had a various polyhedra morphology which was different from its parental viruses, suggesting that the various morphology of recombinant baculovirus with an expanded host range was due to the genetic recombination of viral genome. To analyze the genomic recombination of the recombinant baculoviruses, genomic DNAs of two parent viruses and RecS-A6 were digested with restriction endonuclease and subjected to agarose gel electrophoresis. Southern blot analysis revealed that RecS-A6 has two polyhedrin gene of AcNPV and BmNPV in a viral genome. Polyhedral protein of recombinant baculovirus was analysed by SDS-PAGE. The result showed that molecular weight of polyhedral protein of RecS-A6 containing two polyhedrin gene of AcNPV and BmNPV was as the 31 kDa band of AcNPV and 30 kDa band of BmNPV.

Key word : recombinant virus, polyhedrin, BmNPV, AcNPV, polyhedra morphology

서 론

핵다각체병 바이러스는 baculovirus subgroup A에 속하는 곤충 병원성 바이러스로 130 kb의 이중나선형의 DNA를 함유하고 있다 (Burgess 1977, Schafer 1979). 바이러스 입자는 직경 40-50 nm, 길이 200-400 nm의 원통형 nucleocapsid가 envelope에 의해 둘러싸여진 형태로 이루어져 있으며, 다각체 단백질이라는 단일단백질로 구성된 다각체에 의하여 야외환경에서 보호받고 있다 (Harrap 1972). 핵다각체병 바이러스는 특히 나비목 곤충의 유충에서 강한 병원성

을 보여서 (Martigoni와 Iwai 1986), 수종의 NPV가 바이러스 살충제로서 개발, 시판되고 있다. 한편, 핵다각체병 바이러스의 살충제로서의 효과를 증진시키고자 그 병원성, 복제과정, 바이러스 생산성 및 분자생물학적 성장 등에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다 (Granados와 Federici 1986, Blissard와 Rohrman 1990, Lenz 1990, Volkman 1984). 또한, 핵다각체병 바이러스의 높은 숙주특이성에서 비롯되는 좁은 살충범위에 따른 미생물 살충제로서의 핵다각체병 바이러스 제제의 개발과 생산 및 적용에 따르는 비경제성 및 대량증식을 위한 숙주선택의 제한 등의 단점을

극복하고자 숙주범위가 넓어진 유전자 재조합 핵다각체병 바이러스도 보고되었다 (Kondo와 Maeda 1991).

본 실험에서는 이미 본 연구실에서 확보하고 있는 숙주범위가 넓어진 유전자 재조합 바이러스 중 모바이러스와는 상이한 형태의 다각체를 형성하는 RecS-A6 유전자 재조합 바이러스를 선발하여 다각체 형태 형성과 관련된 다각체 단백질을 유전자를 중심으로 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 곤충세포주

국내의 양잠농가에서 분리한 누에 핵다각체병 바이러스와 미국 도입종인 AcNPV를 각 숙주곤충 또는 숙주세포주에서 증식시켜 이용하였고, 유전자 재조합 바이러스인 RecS-A6는 곤충세포주에서 증식시켜 실험에 이용하였다.

곤충세포주는 미국 Idaho 대학의 Miller 박사로부터 *Spodoptera frugiperda*의 난소에서 유래된 Sf-9 세포주를 분양 받았으며, BmN-4 세포주는 누에의 난소에서 유래된 것으로서 일본잠사곤충농업기술연구소의 Kobayashi 박사로부터 분양받아, 10% FBS가 함유된 곤충 세포주 배양용 Grace's 배양액과 TC-100 배양액으로 Summers와 Smith의 방법 (1987)에 따라 27°C항온기에서 계대배양하며 실험에 이용하였다. 계대배양은 초기분주농도를 플라스크(25 cm²)당 2×10⁶ 세포로 하여 Sf-9 세포의 경우 3-4 일 마다 재분주하고, BmN-4 세포의 경우 4-5 일 마다 재분주하였다.

2. 바이러스의 정제

감염세포를 수거하고 원심분리하여 배양세포를 침전시키고 상층의 배양액을 제거하였다. 이 침전물에 증류수와 lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.4% SDS, 10 mM EDTA, 5% β-mercaptoethanol]를 가하여 용해하고 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 다시 다각체를 침전시키는 과정을 2-3회 반복하여 다각체 침전을 얻었다. 이러한 방법으로 정제한 다각체를 -20°C에서 보관하면서 주사전자현미경 관찰 및 바이러스 DNA의 분리에 사용하였다.

3. 바이러스 다각체의 주사전자현미경 관찰

정제된 바이러스 다각체를 알루미늄 원반 시료대에 떨어뜨린 후 자연건조시키고 금으로 coating하여 주사전자현미경(Philips)으로 다각체의 외부형태를

관찰하였다.

4. 바이러스 DNA 분리

바이러스 DNA의 분리는 Smith와 Summers (1982)의 방법에 따라서 정제된 다각체를 알칼리용액 [0.1 M Na₂CO₃, 0.17 M NaCl, 0.01 M EDTA (pH10.9)]에 부유시켜 37°C에서 1 시간 처리하여 다각체 단백질을 용해시킨 후 원심하고 상청액을 수거한 후 1% SDS, proteinase K 0.5 mg/ml(Sigma)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 4 시간 이상 처리하였다. 동량의 phenol/chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)을 가하여 교반한 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상청액을 수거하고, 이와 같은 phenol/chloroform-isoamylalcohol 방법으로 3 회 정제하여 2배의 냉 ethanol을 더하고 15,000 rpm으로 15분간 원심하여 DNA를 침전시키고 70% ethanol로 세척하고 냉동 건조하여 3차 증류수에 녹여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. Southern hybridization

Southern hybridization (1975)에 사용된 probe는 목적 DNA 절편을 DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 labeling 하여 이용하였다. Southern blot은 바이러스의 DNA에 제한효소를 처리하고 전기영동한 agarose gel을 상온에서 변성용액 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)으로 15 분간 침지하여 DNA를 변성시킨 후, 중화용액 [1 M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl]으로 15 분간 중화시켰다. 중화시킨 agarose gel은 20×SSC 용액 (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)으로 나일론막 위로 전이시킨 후, 5분간 UV crosslinking하고 120°C에서 30 분간 처리하여 DNA를 고정시켰다. 이와 같이 처리된 막을 DIG labeling된 probe로 hybridization시킨 후, DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 X-ray 필름에 인화하여 분석하였다.

6. 단백질 전기영동

정제한 다각체를 소량의 증류수에 부유시키고 알칼리용액 (0.1 M Na₂CO₃, 0.17 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 10.0)에 부유시켜, 37°C에서 15 분간 처리하여 다각체를 용해시킨 후 2배 농도의 sample buffer를 더하여 100°C에서 10 분간 가열하여 전기영동 시료를 준비하였다.

전기영동은 Laemmli 방법 (1970)에 따라 12-15% 농

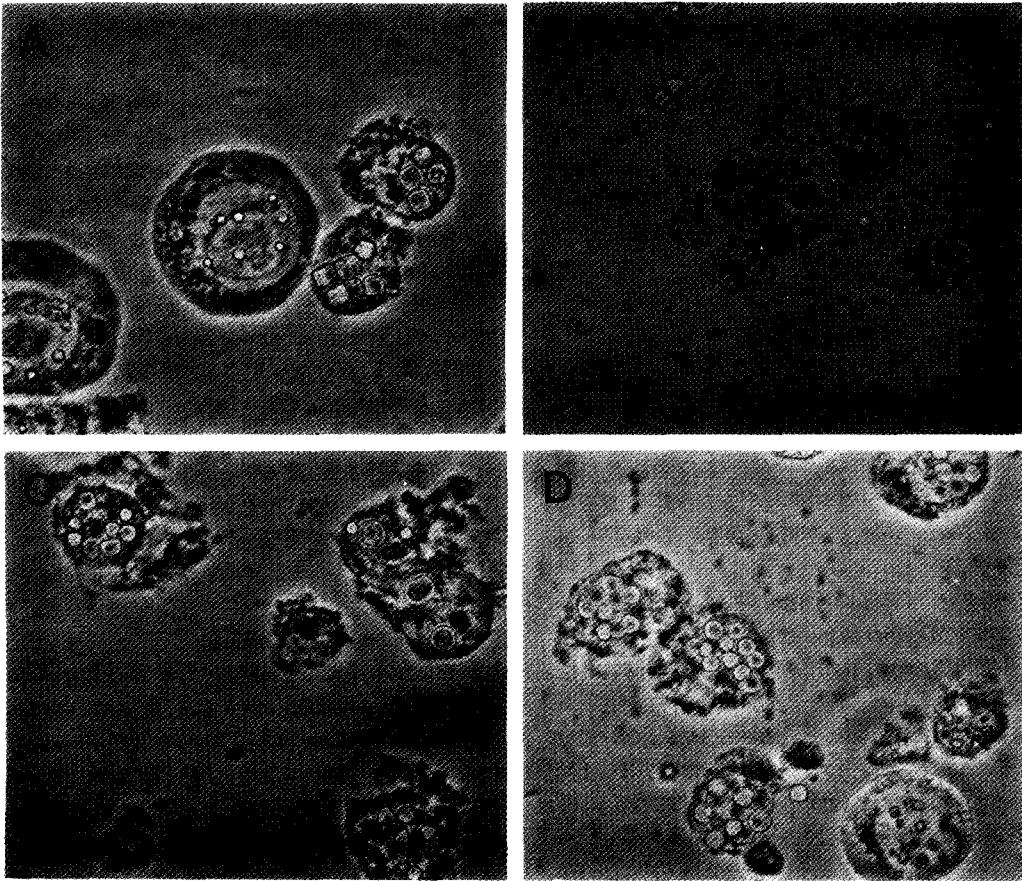


Fig. 1. Micrographs of insect cells infected with wild type NPV and recombinant baculovirus.
 A. Sf-9 cells infected with AcNPV B. BmN-4 cells infected with BmNPV C. Sf-9 cells infected with RecS-A6
 D. BmN-4 cells infected with RecS-A6

도의 SDS-polyacrylamide gel에서 수행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하고 탈색액(10% methanol, 10% acetic acid)으로 탈색한 후 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 다각체의 외부형태 관찰

AcNPV, BmNPV와 재조합 바이러스 RecS-A6의 세포내 증식양상을 위상차 현미경으로 관찰하였다(그림 1). AcNPV는 사각형으로 보이는 다각체를 형성하며, BmNPV는 거의 구형에 가까운 다각체를 형성하는 반면에 재조합 바이러스인 RecS-A6를 Sf-9 세포주에서 증식시킨 경우에는 다소 불균일한 형태의 다각체가 관찰되었다. 또한 BmN-4 세포주에서 증

식시킨 경우에는 육각형의 다각체가 관찰되어, 숙주 세포에 따라 다각체의 형태에 차이를 보였다.

BmNPV는 구형에 가까운 18면체의 형태이며, AcNPV는 정육면체의 형태로 알려져 있는데, 주사전 자현미경 관찰 결과(그림 2), RecS-A6의 다각체의 전반적인 크기는 모바이러스와 대체로 비슷하여 다각체의 지름은 대략 3 μm 내외이며, 외부형태는 숙주 세포에 따라 차이가 있었다. Sf-9 세포주에서 증식시킨 경우에는 불규칙한 다각체 형태를 갖고 있는 경우가 대부분이었으며, BmN-4 세포주에서 증식시킨 경우에는 지금까지 보고되지 않은 특이한 형태인 정 12면체와 정사면체의 다각체가 주로 관찰되었다. 또한 일부 다각체의 표면에 미세한 구멍들이 많이 존재하는 것을 볼 수 있는데, 이것은 바이러스 입자들이

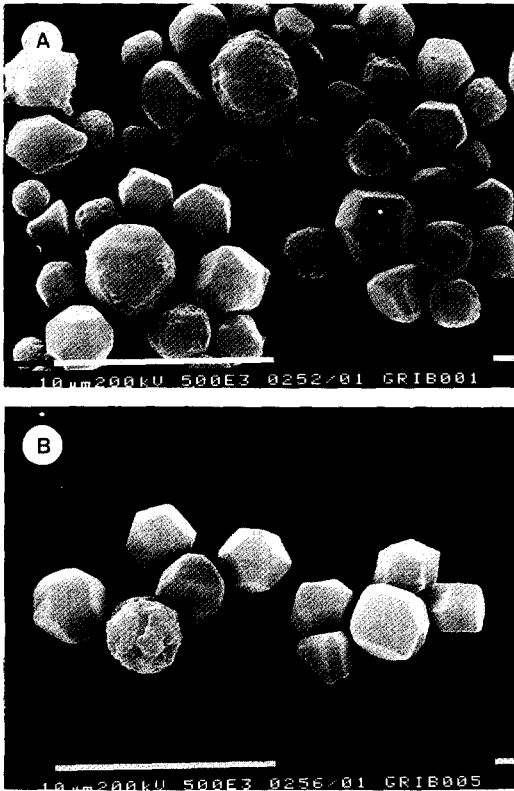


Fig. 2. Scanning electron micrographs of polyhedra of RecS-A6.
 A. RecS-A6 polyhedra produced from Sf-9 cell line
 B. RecS-A6 polyhedra produced from BmN-4 cell line.

이탈한 흔적(Adams 1982)으로 보인다.

2. 바이러스 DNA의 제한효소 분석

재조합 바이러스의 DNA를 제한효소인 *EcoRI* 으로 처리하고 그 DNA 제한효소 패턴을 모바이러스의 DNA 제한효소 패턴과 비교하였다 (그림 3). 재조합 바이러스의 제한효소 패턴은 모바이러스와 상이하게 나타나 DNA 수준에서의 유전자 재조합이 일어났음을 확인할 수 있었다. 특히 RecS-A6의 패턴을 이미 제한효소지도가 작성되어 있는 (Ayres 등, 1994) AcNPV를 중심으로 분석하여 보면, AcNPV DNA 절편중 7.3 kb 위치의 *EcoRI*-I 절편과, 6.5 kb 위치의 *EcoRI*-J 절편에 해당되는 RecS-A6 (Lane 2)의 DNA 절편이 나타나지 않는 것을 볼 수 있는데, 이러한 결과는 AcNPV의 *EcoRI*-I 절편과 *EcoRI*-J 절편을 중심으로 BmNPV의 DNA와 재

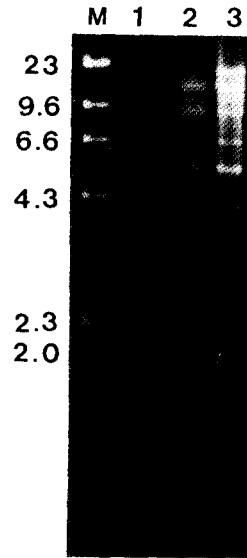


Fig. 3. Restriction endonuclease analysis of NPV DNAs digested with *EcoRI*. Lane 1 ; AcNPV, Lane 2 ; RecS-A6, Lane 3 ; BmNPV, M ; Lambda DNA digested with *HindIII*

조합이 일어난 결과, 이 부위의 *EcoRI* 부위가 소실되었기 때문인 것으로 추정된다. 또한 AcNPV *EcoRI*-I 절편에는 다각체 단백질 유전자가 존재하는데, 이러한 유전자 재조합 결과 BmNPV의 다각체 단백질 유전자와 치환되거나, 유전자 배열의 변화가 일어났음을 예상할 수 있었다.

3. Southern blot 분석

재조합 바이러스의 특이한 다각체 형태가 다각체 단백질 유전자의 변화에 의한 결과인가를 확인하기 위하여 AcNPV, BmNPV와 RecS-A6의 DNA를 제한효소 *SalI*으로 처리하고, AcNPV의 다각체 단백질 유전자를 포함하는 *EcoRI*-I 단편내의 *HindIII* 0.93 kb를 digoxigenine으로 표지하여 이를 탐침자로 사용하여 Southern hybridization을 실시하였다. 실험 결과 RecS-A6는 AcNPV와 BmNPV의 다각체 단백질 유전자와 같은 위치에서 모두 hybridization 반응이 일어났는데 (그림 4), 이것은 RecS-A6가 AcNPV와 BmNPV의 다각체 단백질 유전자를 각각 가지고 있기 때문인 것으로 추정된다.

4. 다각체 단백질의 전기영동

AcNPV와 모바이러스 및 재조합 바이러스를 감염

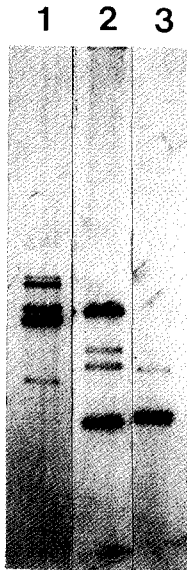


Fig. 4. Southern blot analysis of polyhedrin gene of NPV DNAs digested with *Sal* I. Lane 1 ; AcNPV, Lane 2 ; RecS-A6, Lane 3 ; BmNPV. AcNPV *Eco*RI-I fragment containing polyhedrin gene was used as hybridization probe.

시킨 배양세포를 접종 후 48-60 시간 경과한 뒤 수거하여 시료를 만들고 15% acrylamide gel에서 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과 AcNPV의 다각체 단백질은 약 31 kDa (Hoofit van Iddekinge 등 1983), BmNPV의 다각체 단백질은 약 30 kDa (Iatrou 등 1985)의 분자량을 보였다. 반면 RecS-A6은 Sf-9세포주와 BmN-4 세포주에서 증식된 경우 모두 31 kDa 과 30 kDa 위치에서 동시에 다각체 단백질이 나타났으나 31 kDa의 밴드가 30 kDa의 밴드보다 다소 약하게 나타났다 (그림 5). 이러한 결과는 RecS-A6의 Southern blotting 결과에서와 같이 AcNPV와 BmNPV 다각체 단백질 유전자를 동시에 갖고 있다는 결과와 일치하였다. 또한 이 두 다각체 단백질 유전자가 발현량에 차이는 있지만 모두 상당한 양으로 감염 세포 내에서 발현되어 다각체 형성에 이용되고 있다는 것을 확인할 수 있었으며, RecS-A6의 특이한 다각체 형태는 두 종류의 다각체 단백질이 합성되는 것과 관계가 있는 것으로 추정된다.

적 요

AcNPV와 BmNPV의 배양세포주에서의 동시감염

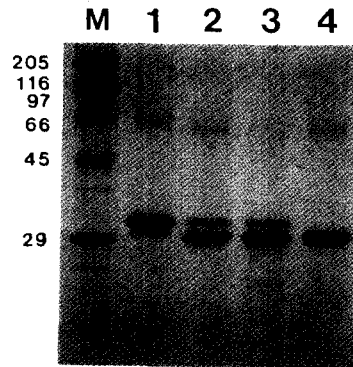


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of polyhedral protein of nuclear polyhedrosis viruses in insect cells. Sf-9 cells were infected with AcNPV (Lane 1) and RecS-A6 (Lane 2), respectively. BmN-4 cells were infected with RecS-A6 (Lane 3) and BmNPV (Lane 4), respectively. The cell lysates were harvested at 72hr postinfection and analysed by 15% SDS-PAGE.

에 의해 선발된 재조합 바이러스 RecS-A6는 그 다각체 외부 형태가 모바이러스와 다를뿐만 아니라 배양 세포주에 따라서도 그 형태에 차이가 있었다. 이러한 다각체의 특징적인 형태가 나타나는 요인을 다각체 단백질 유전자를 중심으로 조사한 결과 RecS-A6는 AcNPV와 BmNPV의 다각체 단백질 유전자를 모두 갖고 있는 것이 확인되었으며, 또한 RecS-A6의 다각체를 단백질 전기영동하여 분석한 결과 AcNPV와 BmNPV의 다각체 단백질이 모두 다각체 형성에 이용되었음을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 교육부 학술연구조성비 (유전공학)와 서울대학교 농업생명 신소재 연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- Adams, J. R., and T. A. Willcox (1982) Scanning electron microscopical comparison of insectvirus occlusion bodies prepared by several techniques. *J. Invertbr. Pathol.* 40 : 12 - 20.
- Ayres, M. D., S. C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber, and R. D. Possee. (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 202 : 586-605.
- Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann (1990)

- Baculovirus diversity and molecular biology. Annu. Rev. Entomol. 35 : 127 -155.
- Burgess, S. (1987) Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNAs : derivation by electron microscopy. J. Gen. Virol. 37 : 501 - 510.
- Granados, R. R., and B. A. Federici. (1986) The Biology of Baculoviruses. Boca. Raton. Fla : CRC.
- Harrap K. A. (1972) The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusionbody. Virology 50 : 114 - 123.
- 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 - 565.
- Iatrou, K., K. Ito, and H. Witkiewicz. (1985) Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 54 : 436 - 445.
- Kondo, A., and 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.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227 : 680 - 685
- Lenz, T. L. (1990) The recongnition event of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680 - 685
- Martigoni, M. E., and P. J. Iwai. (1986) A catalog of Viral Disease of Insects, Mites and Ticks. USDA Forest Service PNW-195. Washington, DC : USGPO
- Schafer, M. P., G. Rohrmann, U. Heine, and G. S. Beaudreau. (1979) DNA from two *Orygyia pseudosugata* baculovirus : Molecular weight determination by means of electron microscopy and restriction endonuclease analysis. Virology 95 : 176 - 184.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517
- 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.
- Volkman, L. E., P. A. Goldsmith, R. T. Hess, and P. Faulkner. (1984) Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody : identification of the target antigen. Virology 133 : 354 - 362