

숙주범위가 넓어진 유전자 재조합 핵다각체병 바이러스의 분자생물학적 특성

김우진 · 우수동 · 김혜성 · 진병래 · 김근영* · 강석권

서울대학교 농업생명과학대학, *잠사곤충연구소

Molecular Biological Characterization of Recombinant Baculovirus with an Expanded Host Range

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

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

*National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea

Abstract

To investigate the host range determining factors of nuclear polyhedrosis virus (NPV), *Autographa californica* NPV and *Bombyx mori* NPV were coinfecting into the two different cell lines, BmN-4 and Sf-9. The recombinant baculoviruses, RecS-A6 and RecB-727 which have an expanded host range, were isolated from Sf-9 and BmN-4 cell lines, respectively. The molecular biological characteristics of the recombinant baculoviruses were investigated. The pathogenicity of RecB-727 was similar to that of wild type BmNPV, while the pathogenicity of RecS-A6 was relatively lower than that of wild type BmNPV. The restriction enzyme digestion patterns of parental viruses and recombinant viruses showed that the recombinant virus has an expanded host range by genetic recombination. Southern blot analysis revealed that the p10 gene of RecB-727 was derived from AcNPV genomic DNA, while RecS-A6 has p10 gene of BmNPV in a viral genome. To investigate the host range expansion mechanism of recombinant baculovirus, *HindIII-SacI* 0.6 kb DNA fragments of RecS-A6 and RecB-727 were cloned and sequenced. The results showed that nucleotide sequence in 0.6 kb fragment of recombinant baculoviruses were identical to that of wild type BmNPV helicase gene, suggesting that the expanded host range of recombinant baculoviruses was due to the insertion of BmNPV helicase gene into AcNPV viral genome.

Key words : recombinant virus, host range, BmNPV, AcNPV, helicase

서 론

곤충바이러스인 Baculoviridae에 속하는 핵다각체병 바이러스(nuclear polyhedrosis virus : NPV)는 현재 약 400종 이상의 곤충에서 분리되고 있으며(Martignoni와 Iwai 1986) 곤충 이외의 척추동물에는 전혀 병원성이 없어 안전할 뿐만 아니라 다각체 단백질(polyhedrin)이라는 구조 단백질내에 병원성을 가지는 바이러스 입자가 매립되어 있는 특이한 형태를 하고 있기 때문에

(Rohrmann 1992, Kelly 1985) 야외환경에 노출되었을 경우, 자외선에 대하여 보호 받을 수 있는 잇점이 있으므로 선진국에서는 농작물 해충은 물론 산림해충방제 등에 응용하고 있다. 그러나 바이러스 제제는 화학살충제에 비해서 대상숙주의 살충범위가 극히 제한되어 있다는 문제점이 지적되어, 최근에는 유전자 조작에 의한 재조합 바이러스의 제작을 통하여 바이러스의 숙주범위 결정에 관여하는 인자를 구명하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Blissard와 Rohrman 1990.

Kondo와 Maeda 1991).

본 연구에서는 이미 본 연구실에서 확보하고 있는 (우 등 1994), 서로 다른 숙주범위를 갖는 *Autographa californica* 핵다각체병 바이러스(AcNPV)와 누에 핵다각체병 바이러스(BmNPV)를 BmN-4 및 Sf-9 곤충세포주에 동시감염시켜 얻어진 수종의 숙주범위가 넓어진 유전자 재조합 바이러스중에서, RecB-727과 RecS-A6로 명명된 두 종류의 재조합 바이러스를 배양세포주를 이용하여 증식시키면서 누에를 이용한 병원성 검정, 바이러스 DNA의 제한효소 패턴 분석, Southern blot 분석 및 helicase 유전자의 염기서열 분석등 재조합 바이러스의 분자생물학적 특성을 조사하고 재조합 바이러스의 숙주범위가 넓어지게된 기작을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 곤충세포주

공시 바이러스는 국내에서 분리한 BmNPV와 미국 도입종인 AcNPV를 각 숙주곤충 또는 숙주세포주에서 증식시켜 이용하였고, 유전자 재조합 바이러스인 RecB-727과 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 것으로 일본 잠사곤충농업기술연구소의 Kobayashi 박사로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

2. 병원성 검정

BmNPV, AcNPV와 재조합 바이러스인 RecB-727, RecS-A6를 배양세포에 감염시켜 이 곤충세포의 배양액을 회수하고 바이러스의 농도를 5×10^5 PFU/ml가 되도록 배양액을 적절히 희석하였다. 이 배양액을 접종액으로 하여 4령 누에에 10 μ l씩 체강주사한 후 probit analysis system (Finney 1971)으로 LT_{50} 을 조사하여 병원성을 조사하였다. 병원성 검정은 각 처리구마다 20-22 마리의 누에를 사용하여 3반복한 결과를 평균하여 계산하였다.

3. 바이러스 DNA 분리

Summers와 Smith의 (1987)의 방법에 따라서 정제된 다각체를 0.1 M Na_2CO_3 에 부유시켜 37°C에서 1 시간 동안 처리하여 다각체 단백질을 용해시킨 후 원심분리한 상청액을 수거하여 SDS를 1%, Proteinase

K를 0.5 mg/ml (Sigma) 농도가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 4 시간 이상 처리하였다. 그후 동량의 phenol/chloroform-isoamylalcohol(24:1)을 가하여 교반한 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상청액을 수거하였다. 여기에 2배의 ethanol을 더하고 15,000 rpm으로 15분간 원심하여 DNA를 침전시키고 70% ethanol로 세척하고 냉동건조하여 3차 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

4. 바이러스 DNA의 제한효소 분석 및 전기영동

100 μ g/ml 농도의 DNA 용액 9 μ l에 10x reaction buffer 1 μ l를 더하고 10-20U의 제한효소를 첨가한 후 4시간 이상 처리하여 DNA loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 15% Ficoll) 2 μ l를 첨가하여 전기영동 하였다. 전기영동 buffer는 10.8 g Tris, 5.5 g boric acid, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml을 증류수 1l에 용해시켜 준비하였으며 이 buffer로 ethidium bromide를 첨가한 0.8% agarose gel을 준비하고 제한효소를 처리한 DNA 시료를 loading하여 100V의 전류를 공급하며 1-2 시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 UV transilluminator를 사용하여 관찰하였다.

5. Southern hybridization

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 $20 \times \text{SSC}$ 용액 (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)으로 나일론막 위로 전이시킨 후, 5분간 UV crosslinking하여 DNA를 고정시켰다. 이와 같이 처리된 막을 DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Germany)로 labeling된 probe를 hybridization시킨 후, DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 X-ray 필름에 현상하여 그 결과를 분석하였다.

6. Polymerase chain reaction

목적 DNA 절편의 PCR은 PreMix™-Top (Korea Biotech)을 이용하여 50 ng의 재조합 바이러스 DNA와 100 pmole의 sense 및 antisense primer를 각각 1 μ l씩 더하고 증류수를 더하여 20 μ l로 하여 0.5 ml원심 tube에서 PCR용 시약 혼합액과 섞은 후 광유를 더하여 PCR에 사용하였다. 94°C에서 5 분, 50°C에서 2 분,

72°C에서 1 분씩 1 과정, 94°C에서 2 분, 50°C에서 2 분, 72°C에서 1 분씩 33 과정과 94°C에서 2 분, 50°C에서 2 분, 72°C에서 7 분씩 1 과정에 의해 Thermocycler (Perkin Elmer)로 PCR을 수행하였다.

7. PCR 생성물의 클로닝 및 형질전환

PCR 생성물의 cloning은 pGEM-T vector (Promega)에 T4 DNA ligase를 처리하여 15°C에서 2시간 동안 ligation하여 *E. coli* 숙주를 CaCl₂ 처리 방법 (Maniatis 등 1989)에 의해 만든 competent 세포내로 형질전환 (transformation)시켰다. 형질전환 후 ampicilline과 X-gal이 처리된 LB 배지에서 무색의 *E. coli* colony를 선발하고 플라스미드를 추출하여 제한 효소 처리로 클로닝을 확인하였다.

8. DNA 염기서열 분석

DNA sequencing은 dideoxy chain termination 방법 (Sanger 등 1977)으로 Sequenase[®] version 2.0 kit (United States Biochemical Co.)로 실시하였다. 단일 가닥 DNA에 5×sequenase 반응 완충액 2 µl, primer 1 µl를 각각 첨가하고 65°C에서 2분간 처리한 후, 상온에서 30 분간 DNA와 primer를 annealing 시키고, 0.1 M DTT 1 µl, 희석 labeling 혼합물 (1 : 4 중류수) 2 µl, [³⁵S]-dATP 0.5 µl (10 Ci/µl), 희석시킨 Sequenase (1 : 7 효소 희석 완충액) 2 µl를 첨가하여 상온에서 5 분간 labeling 반응 시킨 후, 각각의 ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP 반응종료 혼합물 2.5 µl에 상기시료를 3.5 µl씩 분주하고 37°C에서 5 분간 종료반응 시켰다. 그 후, 반응 정지 완충액 4 µl를 첨가하여 반응을 정지 시키고 75°C에서 2 분간 가열하여 이중 결합의 DNA를 변성시켜 gel에 loading 하였다. 전기영동은 sequencing용 유리판 (20×40 cm)의 한면을 siliconization 시키고 6% 완충액-gradient polyacrylamide 겔을 작성하여 시료를 loading한 후에 1,700 V로 전기영동 하였다. 영동이 끝난 gel은 3 M 지로 옮기고 겔 건조기에서 2시간 이상 건조시킨 후, 상온에서 48 시간 동안 X-ray 필름으로 감광하였다.

결과 및 고찰

1. 병원성 검증

숙주 범위가 확장된 재조합 바이러스와 모바이러스인 BmNPV와의 병원성을 비교하기 위하여, 누에 4령 유충에 budded virus를 체강주사하여 probit 분석으로 LT₅₀을 조사하였다 (그림 1). LT₅₀을 조사한 결

과 BmNPV는 4.8 일로 나타난 반면, RecS-A6의 LT₅₀은 5.5 일로서 모바이러스보다 재조합 바이러스의 병원성이 다소 낮은 것으로 나타났다. 그러나 RecB-727의 LT₅₀은 4.9 일로서 모바이러스인 BmNPV의 병원성과 거의 비슷한 높은 수준의 병원성을 나타내었

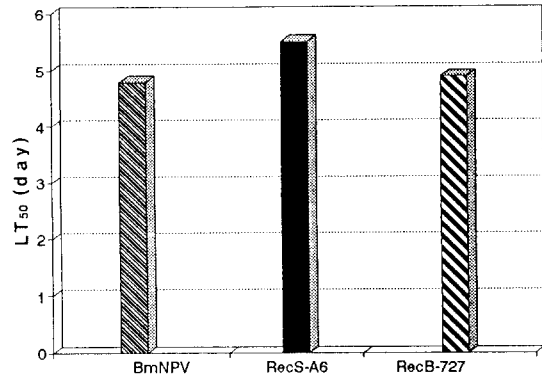


Fig. 1. Pathogenicity of BmNPV, recombinant viruses RecS-A6 and RecB-727 to the silkworm larvae.

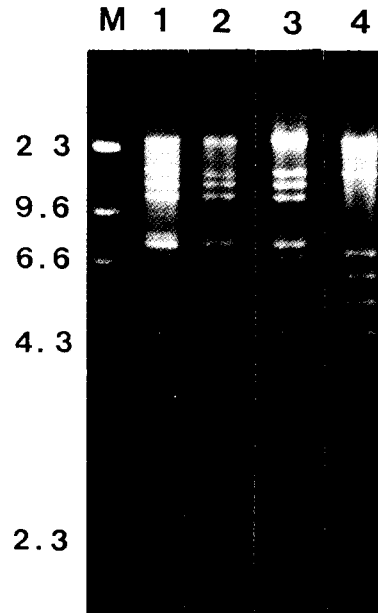


Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of NPV DNAs digested with *Bgl* II. Lane 1 ; AcNPV, Lane 2 ; RecS-A6, Lane 3 ; RecB-727 Lane 4 ; BmNPV, M ; Lambda DNA digested with *Hind* III



Fig. 3. Southern blot analysis of p10 gene of NPV DNAs digested with *Sal* I. AcNPV *Eco*RI 1.98kb fragment containing p10 gene was used as hybridization probe.
Lane 1 ; AcNPV, Lane 2 ; RecS-A6 Lane 3 ; RecB-727, Lane 4 ; BmNPV

다. 이러한 병원성의 차이는 유전자 재조합의 결과에 의해 바이러스의 유전자들이 일부 치환되거나 재조합된 결과, 모바이러스와는 달리 각 바이러스 유전자들의 발현과 그 조절작용이 정상적으로 이루어지지 못하여 숙주내에서 바이러스의 증식속도에 차이가 생겼기 때문인 것으로 여겨진다.

2. 재조합 바이러스 DNA의 제한효소 분석

분리한 재조합 바이러스 DNA에 제한효소 *Bgl*III 를 처리하고 DNA 제한효소 패턴을 모바이러스와 비교한 결과, 재조합 바이러스의 제한효소 패턴이 모바이러스와 상이하게 나타나 DNA 수준에서의 유전자 재조합이 일어났음을 확인할 수 있었다 (그림 2). 재조합 바이러스의 전반적인 전기영동 패턴은 AcNPV와 유사하게 나타났으며 두 재조합 바이러스가 상당히 비슷한 패턴을 나타내었으나, 낮은 분자량의 DNA 절편들은 BmNPV의 특이적인 패턴이 나타나, 이들 DNA에 해당하는 위치에서 재조합이 일어난 것으로 추정된다. 특히 AcNPV DNA 절편중 13.2 kb 위치의 *Bgl*III-C 절편에 해당하는 RecS-A6 (그림 2, Lane 2)의 DNA 절편의 크기가 작아진 것을 확인할 수 있었으

며, 이러한 결과는 AcNPV *Bgl*III-C 절편부위에서 BmNPV DNA와의 재조합이 일어난 결과로 예상할 수 있는데, AcNPV *Bgl*III-C 절편내에는 다각체 단백질 유전자가 위치하고 있으므로 (Ayres 등 1994) RecS-A6는 다각체 단백질 유전자 부위에서 어떠한 변화가 일어났을 것으로 추정된다.

3. p10 유전자의 Southern blot 분석

모바이러스와 재조합 바이러스를 제한효소 *Sal*I으로 처리하고 여기에 p10 유전자를 포함하는 AcNPV의 *Eco*RI 1.98 kb 단편을 probe로 Southern blot을 수행한 결과, AcNPV의 경우 두 밴드에서 반응이 일어났으며, BmNPV는 하나의 밴드에서만 반응이 일어났다. RecB-727의 경우에는 두 밴드에서 반응이 일어났으나, 반응이 일어난 밴드의 크기가 AcNPV의 경우와 약간의 차이가 있었다. 반면, RecS-A6의 경우에는 반응이 일어난 위치가 BmNPV의 경우와 약간의 차이가 있었으나 하나의 밴드에서만 반응이 일어났다 (그림 3). AcNPV의 경우 probe로 사용된 *Eco*RI 1.98 kb 내에 p10 유전자의 5'쪽 상류부분에 *Sal*I으로 절단되는 염기서열을 갖고 있으므로 두개의 밴드에서 반응이 일어났다. RecB-727의 경우에는 두개의 밴드에서 반응이 일어났으며 반응이 일어난 밴드의 크기가 AcNPV의 경우와 약간의 차이가 있었으나, p10 유전자 부근에 존재하는 *Sal*I서열이 보존된 결과 두개의 밴드에서 반응이 일어난 것으로 추정되어 RecB-727은 AcNPV의 p10 유전자를 갖고 있는 것으로 여겨지며, RecS-A6의 경우에는 하나의 밴드에서만 반응이 일어난 점으로 보아 BmNPV의 p10 유전자를 가지고 있는 것으로 추정된다.

4. 재조합 바이러스의 helicase 유전자 염기서열분석

PCR을 위한 primer는 AcNPV와 BmNPV에 공통적으로 존재하는 *Hind*III 부위와 *Sac*I 부위의 염기서열을 기초로 sense primer (5'-AAGCTTTGAAACGA-TG-3')와 antisense primer (5'-GAGCTCGTCGGT-GCTAG-3')를 합성하여 0.6 kb의 helicase 유전자 일부를 PCR하였다. 이 0.6 kb DNA 절편을 pGEM-T vector에 cloning하여 pGEM-727 및 pGEM-A6으로 명명하였다. 이 두 plasmid를 *Sac*I, *Hind*III 및 *Spe*I으로 처리하여 cloning된 방향을 확인하고 (그림 4), 그 염기서열을 결정하였다 (그림 5). RecS-A6와 RecB-727의 염기서열을 분석 결과, 숙주범위를 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 *Hind*III-*Sac*I 0.6 kb DNA 절편내의 79 염기쌍(Croizier *et. al.* 1994)의

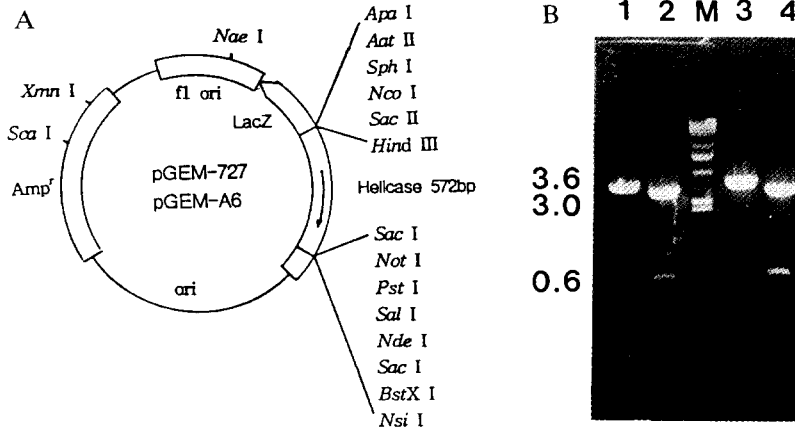


Fig. 4. Construction (A) and restriction endonuclease patterns (B) of plasmid, pGEM-727 and pGEM-A6. Lane 1 : pGEM-A6 digested with *SacI*. Lane 2 : pGEM-A6 digested with *HindIII* and *SpeI*. Lane 3 : pGEM-727 digested with *SacI*. Lane 4 : pGEM-A6 digested with *HindIII* and *SpeI*. M : Lambda DNA digested with *HindIII*.

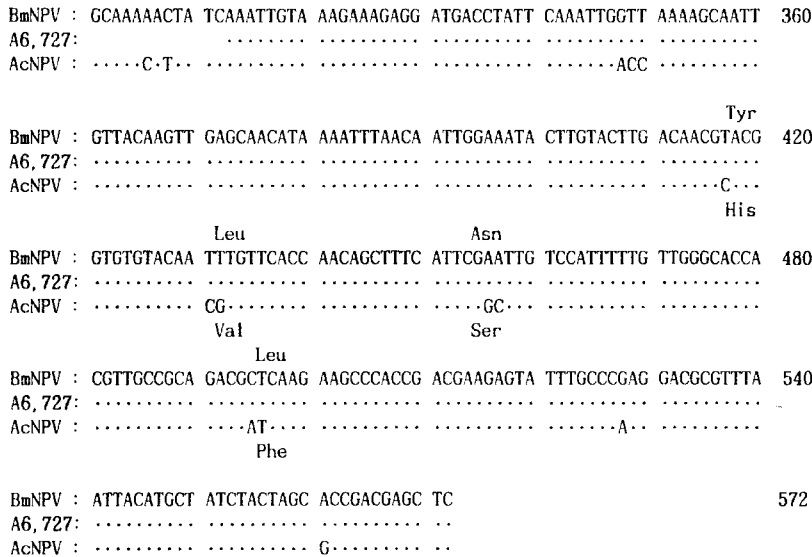


Fig. 5 Nucleotide sequence analysis of determination region of host range in the 572 bp *HindIII-SacI* fragment of helicase gene.

서열이 BmNPV helicase의 것과 동일하였으며, 이것은 AcNPV에서 유래된 숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스의 경우 AcNPV의 helicase내에 BmNPV helicase 유전자의 일부 염기서열이 도입되어 AcNPV의 숙주범위가 넓어진다는 Maeda (1993)의 연구결과와 일치하였다. 그러나 재조합 바이러스의 helicase 유전자내의 0.6 kb DNA 절편의 3' 말단으로부터 259 bp까지의 염

기서열을 분석한 결과 BmNPV helicase 유전자의 염기서열과 동일하였으며, AcNPV의 helicase *HindIII-SacI* 0.6 kb DNA 절편의 5' 방향으로부터 170 bp 위치에만 존재하는 *Sau3AI* 절단부위를 이용하여 확인한 결과, RecS-A6와 RecB-727 모두 0.6 kb DNA가 *Sau3AI*에 절단되지 않으므로 0.6 kb DNA 절편의 3' 말단으로부터 400 bp 이상이 BmNPV helicase 유전자의

염기서열과 동일한 것으로 추측된다. 이러한 결과는 이들 재조합 바이러스들이 BmNPV의 helicase를 그대로 갖고 있을 가능성이 높은 것으로 추정되어, 기존에 알려진 helicase 유전자의 재조합에 의한 숙주범위 확장과는 다른 기작에 의해 숙주범위가 넓어졌을 가능성이 높은 것으로 추정된다.

적 요

AcNPV와 BmNPV를 배양세포주에서 동시감염시켜 선발한 숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스인 RecB-727과 RecS-A6의 분자생물학적인 특성들을 조사하였다. 재조합 바이러스의 LT50 값을 조사한 결과, RecS-A6는 모바이러스인 BmNPV 보다 비교적 낮은 병원성을 보였으나 RecB-727은 거의 비슷한 수준의 높은 병원성을 나타내었다. 재조합 바이러스 DNA를 분리하여 모바이러스 DNA와 함께 제한효소 패턴을 비교한 결과 DNA 수준에서 재조합이 일어났음을 확인할 수 있었으며, 일부 유전자의 재조합을 예측할 수 있었다. 또한 p10 유전자에 대한 Southern blot 분석 결과 RecB-727의 p10 유전자는 AcNPV에서 유래되었으며, RecS-A6는 BmNPV의 p10 유전자를 갖고 있는 것으로 추정된다. 재조합 바이러스의 숙주범위 확장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 DNA helicase 유전자 내의 HindIII-SacI 0.6 kb 부위에 대하여 약 250 bp의 염기서열을 조사한 결과, 이 부위의 염기서열은 BmNPV helicase의 염기서열과 동일하였다.

사 사

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

인 용 문 헌

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.
- Croizier, G., L. Croizier, O. Argaud and D. Poudevigne. (1994) Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 48 - 52.
- Finney, D. J. (1971) Probit analysis. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kelly, D. C. (1985) The structure and physical characteristics of baculoviruses. In viral insecticide for biological control. Edited by K. E. Shermann & K. Maramorosch, Academic Press, pp. 469-488
- Maeda, S., S. G. Kamita and A. Kondo. (1993) Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *J. Virol.* 67 : 6234 - 6238.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. (1989) Molecular Clonings ; A Laboratory manuals. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 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
- Rohrmann., G. F. (1992) Baculovirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 73 : 749 - 761
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 74 : 5463 - 5467.
- 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.
- 우수동, 박범석, 박지현, 정인식, 양재영, 강석권 (1993) 누에 및 *Autographa californica* 핵다각체병 바이러스에 대한 유전자 재조합. *한국응용곤충학회지* 32(4): 407-413.