

파밤나방 핵다각체병 바이러스의 다각체 단백질 유전자 구조

최재영 · 김우진 · 우수동 · 김혜성 · 설광열* · 강석권
서울대학교 농업생명과학대학, *농촌진흥청 잠사곤충연구소

Characterization of *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus Polyhedrin Gene Structure

Jae Young Choi, Woo Jin Kim, Soo Dong Woo, Hye Sung Kim, Kwang Youl Seol* and
Seok Kwon Kang

Department of Agricultural Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University,
Suwon, Korea.

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

Abstract

To develop the baculovirus expression vector system (BEVS) using *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus (SeNPV), we characterized the polyhedrin of SeNPV. The SeNPV polyhedra was irregular and composed of the major protein of molecular weight of 30 kDa determined by electronmicroscopy and SDS-PAGE analysis, respectively. The nucleotide sequences of 876 bases including the coding region of polyhedrin gene was determined and it was revealed that the polyhedrin gene is located within *Xho* I 3.0 Kb and *Nco* I 6.0 Kb by Southern blot analysis, respectively. Also, the *Xho* I 3.0 Kb and the *Nco* I 6.0Kb fragments were cloned and restriction enzyme map of these clones were determined.

Key words : SeNPV, expression vector, polyhedrin gene

서 론

파밤나방 (*Spodoptera exigua*)은 채소, 화훼 및 과수 등 가해하는 숙주 범위가 넓으며 파, 배추, 수박 등 시설 재배지에 대발생하여 전국적으로 극심한 피해를 주고 있는 주요 문제 해충이다 (고 등 1991). 이러한 파밤나방에 특이적인 병원성을 가지고 있는 파밤나방 핵다각체병 바이러스 (*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus; 이하 SeNPV라 약함)는 이 해충에 대한 미생물 살충제로 연구, 이용되고 있다 (Gelernter와 Federici 1986). 그러나, 핵다각체병 바이러스의 경우 유기합성 살충제에 비해 상대적으로 병원성이 느린 단점을 가지고 있는데, 최근에 baculovirus expression vector system (이하 BEVS라 약함)를 이용하여 핵다각체병 바이러스의 살충성을

향상시키려는 시도가 많이 이루어지고 있다 (Stewart 등 1991, Tomalski 와 Miller 1991, McCutchen 등 1991).

또한, 핵다각체병 바이러스는 살충제로서 뿐만 아니라 유용 물질을 생산하기 위한 발현벡터로도 이용되고 있으며, 이미 *Autographa californica* NPV (이하 AcNPV라 약함)와 *Bombyx mori* NPV (이하 BmNPV라 약함)를 이용한 BEVS가 제작되어져 여러가지 동·식물 및 박테리아로부터 유래한 다양한 외래 유전자의 발현이 보고되고 있다 (Smith 등 1983, Maeda 등 1985). 그러나 기타 다른 NPV를 이용한 발현벡터의 제작은 그에 따른 세포주가 수립되지 못하여 그 개발이 미비한 실정이나, 최근 SeNPV의 증식이 매우 잘 이루어지는 파밤나방 세포주가 확립됨으로써 벡터제작의 가능성을 보여 주었다 (Hara 등 1993).

따라서 본 연구에서는 SeNPV의 살충제로서의 병원성 향상과 더불어 유용 물질을 생산할 수 있는 새로운 발현벡터의 개발을 위해, 국내에서 분리된 SeNPV 다각체 단백질의 특성과 그 유전자의 구조 및 위치를 결정하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 곤충

파밤나방 핵다각체병 바이러스는 국내에서 분리하여 본 연구실에서 보관중이던 것을 이용하였다. 바이러스의 증식을 위한 파밤나방은 인공사료로 25°C에서 계대사육하면서 바이러스의 증식에 사용하였다.

2. 다각체 분리 및 외부형태 관찰

유충 생체에서 증식된 바이러스 다각체의 부분정제는, 사충에 증류수를 가하고 마쇄한 후, 이중 거즈로 여과하여, 여과액을 3,000 rpm으로 10분간 3~4회 원심을 반복 한 다음, 침전물을 채취하고 다시 증류수를 가하여 vortex mixer로 부유시켜 상기와 같은 원심분리를 2~3회 반복하여 유백색의 다각체 침전물을 얻었다. 부분 정제된 다각체 침전물은 ml 당 10⁸~10⁹ 다각체 농도가 되도록 0.01% SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액에 부유시킨 후, 50 ml 원심튜브에 40~65%(W/W) 과당 밀도구배 (sucrose density gradient)를 작성하고, 그 위에 4~5 ml의 다각체 부유액을 분주한 후 24,000 rpm (Hitachi, SRP-28SA)으로 4°C에서 1시간 원심분리하여 순수한 다각체 층을 얻었다. 이 층을 채취하여 0.1% SDS 용액으로 희석하고 3,000 rpm으로 10분간 2~3회 원심을 반복하여 과당을 제거한 후, -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

다각체의 외부형태 관찰은 정제된 바이러스 다각체를 알루미늄 원반 시료대 위에서 자연건조시키고 금으로 coating하여 주사전자현미경 (Philips)으로 관찰하였다.

3. 단백질 전기영동

생체 증식된 다각체 단백질의 전기영동은 다각체에 혼재되어 있는 alkaline protease를 불활화시키기 위하여 정제된 다각체를 100°C에서 20분간 가열한 후 (Wood, 1980), 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 다각체 침전물을 얻었다. 이 침전물을 알칼리용액(0.1M Na₂CO₃, 0.17M NaCl, 0.01M EDTA, pH 10.9)에 부유

시켜, 37°C에서 15분간 용해시킨 후, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 용해되지 않은 다각체를 제거한 다음, 다시 상청액을 55,000 rpm으로 40분간 원심분리하여 바이러스 입자를 제거하고 다각체 단백질 용액을 얻었다. 이 용액에 2배 농도의 단백질 시료 용액(0.0625M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 동량으로 혼합하고, 100°C에서 10분간 가열한 뒤, Laemmli의 방법 (1970)에 따라 12.5% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 수행한 후, Coomassie brilliant blue로 염색하여 관찰하였다.

4. 바이러스 DNA 분리

바이러스 DNA의 분리는 Smith와 Summers의 방법 (1982)에 따라서 정제된 다각체를 알칼리용액(0.1M Na₂CO₃, 0.17M NaCl, 0.01M EDTA (pH 10.9))에 부유시켜 37°C에서 1시간 처리한 후 원심분리하고, 상청액에 SDS가 1%, proteinase K가 0.5 mg/ml (Sigma)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 4시간 이상 처리한 후 페놀/클로로포름-이소아밀알콜(24:1) 방법으로 3회 정제하였다. 그 후 냉에탄올로 DNA 침전을 얻어 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)으로 녹여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. Primer 및 PCR

PCR을 위한 oligonucleotide primers는, SeNPV 다각체 단백질 유전자 부위만을 클로닝하기 위하여 -54~-36에 해당하는 5'-GGGAATTGTAAGTAATTTT-3'의 sense primer와 +803~+822에 해당하는 5'-AGACATTATGACITTTGTGAA-3'의 antisense primer를 이용하였다.

PCR은 PreMix™-Top (Bioneer)을 이용하여 50 ng의 SeNPV DNA와 100p mole의 sense 및 antisense primer를 각각 1 μl씩 더하고 최종 부피가 20 μl 되게 증류수로 맞춘 후, 94°C에서 5분, 55°C에서 2분, 72°C에서 2분씩 1 과정, 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 2분씩 33 과정과 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 7분씩 1 과정에 의해 Thermal Cycler (Perkin Elmer)로 반응을 수행하였다.

6. 염기서열 분석

Sequencing을 위한 단일가닥 DNA의 제조는 플라스미드 DNA 3 μg을 증류수 16 μl에 용해시키고, 10 mM EDTA가 함유된 1N NaOH 4 μl를 첨가한 후 37°C에서 30분간 처리하여 DNA를 변성시켰다. 반응

액을 중화시키기 위하여 2 μ l의 3M sodium acetate (pH 5.2) 용액을 첨가하고 50 μ l의 순수한 냉에탄올을 첨가하여 -70°C에서 15분간 정치한 후, 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 단일 가닥 DNA 침전을 회수하고 70% 에탄올로 2~3회 반복 세척한 후, 냉동 건조하여 7 μ l의 멸균 증류수에 녹여 sequencing 시료로 준비하였다.

DNA sequencing은 dideoxy chain termination 방법 (Sanger 등, 1977)으로 Sequenase[™] version 2.0 kit (United States Biochemical Co.)로 실시하였다. 단일가닥 DNA에 5 \times sequenase 반응 완충액 2 μ l, primer 1 μ l를 각각 첨가하고 65°C에서 2분간 처리한 후, 상온에서 30분간 DNA와 primer를 annealing시켰다. 여기에 0.1M DTT 1 μ l, 회색 labeling 혼합물 (1:4 증류수) 2 μ l, ³⁵[S]-dATP 0.5 μ l (10 μ Ci/ μ l), 회색 sequenase (1:7 효소 회색 완충액) 2 μ l를 첨가하여 상온에서 5분간 labeling 반응시킨 후, 각각의 ddGTP, ddATP, ddTTP 및 ddCTP 반응 종료 혼합물 2.5 μ l에 상기 시료를 3.5 μ l씩 분주하고 37°C에서 5분간 종료 (termination) 반응시켰다. 그 후, 반응 정지 완충액 4 μ l를 첨가하여 반응을 정지시키고, 75°C에서 2분간 가열하여 이중 결합의 DNA를 변성시켜 gel에 loading 하였다.

전기영동은 Sequencing용 유리판 (20 \times 40 cm)의 한 면을 siliconization 시키고, 6% buffer-gradient polyacrylamide gel을 작성하여 시료를 loading한 후에 1,700V로 2시간 이상 전기영동하였다. 영동이 끝난 gel은 3 M paper로 옮기고 gel 건조기에서 2시간 이상 건조시킨 후, 상온에서 48시간 동안 X-ray 필름으로 감광하였다.

7. 제한효소 분석 및 Southern blot 분석

제한효소 (POSCOCHEM) 처리는 플라스미드 DNA 용액에 10X 제한효소 반응액을 1/10 부피로 첨가하고 각 제한효소를 첨가한 후, 각 제한효소의 반응 온도에서 4시간 이상 처리하고 반응 정지 완충액 (0.1M EDTA, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 처리된 DNA는 agarose gel에서 전기영동을 행하고 EtBr (Ethidium bromide)로 염색하여 U. V. transilluminator로 관찰하였다.

Southern hybridization (1975)에 사용된 탐침 (probe)은, 목적 DNA 절편을 DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim)를 사용하여 제조 회사의 방법에 따라 labeling 하여 이용하였다. Southern blot

은 바이러스의 DNA에 여러 가지 제한효소를 처리하고 전기영동한 gel을, 상온에서 변성 (denaturation) 용액 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl)으로 15분간 침지하여 DNA를 변성시킨 후, 중화 (neutralization) 용액 (1M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5M NaCl)으로 15분간 중화시켰다. 중화시킨 gel은 20 \times SSC 용액 (3M NaCl, 0.3M sodium citrate)으로 나일론 막 (nylon membrane) 위로 capillary 전이시킨 후, 120°C에서 10분간 처리하여 DNA를 고정시켰다. 이와 같이 처리된 막을 DIG labeling된 탐침으로 hybridization 반응시킨 후, DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 X-ray 필름에 현상하여 그 결과를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 파밤나방 핵다각체병 바이러스의 다각체 특성

SeNPV 다각체의 외부 형태를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, SeNPV의 다각체는 부정형으로 이루어져 있으며 그 지름은 약 1.5 μ m 정도였다 (그림 1).

이러한 국내 분리주 SeNPV 다각체의 외부형태 관찰 결과와 이미 진 등 (1991)이 보고한 내부형태의 관찰 결과는, Gelernter와 Federici (1986)가 SeNPV는 대체적으로 한 envelope당 2~4개의 nucleocapsid를 함유하고 있는 MNPV이며 다각체는 부정형으로 지름이 약 1.52 \pm 0.11 μ m라는 보고와 유사한 결과로 국내 분리주 SeNPV 다각체의 물리적 특성은 외국에서

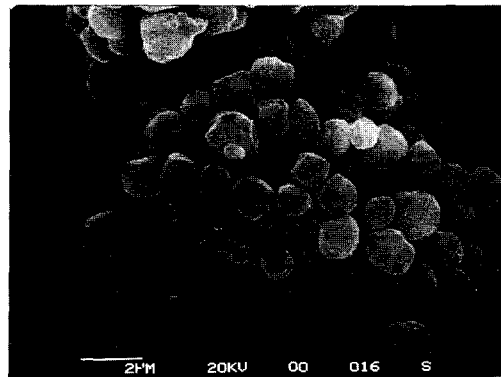


Fig. 1. Scanning electron micrograph of polyhedra of *Spodoptera exigua* NPV. The polyhedra were purified by ultracentrifugation using linear 40% to 65% sucrose density gradients.

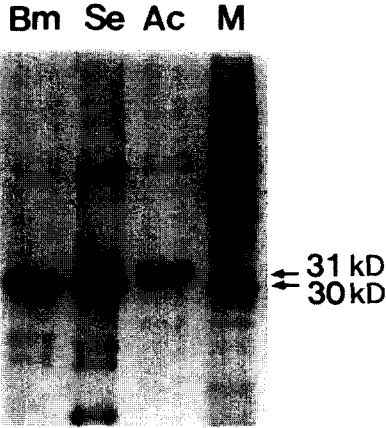


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of polyhedral proteins of *Spodoptera exigua* (Se), *Bombyx mori* (Bm) and *Autographa californica* (Ac) NPVs.

The alkaline protease contaminated polyhedra were inactivated by boiling at 100°C for 20 min. Lane : Bm, *Bombyx mori* NPV; Se, *Spodoptera exigua* NPV; Ac, *Autographa californica* NPV; M, protein size marker.

분리·보고된 SeNPV와 차이가 거의 없음을 보여주었다.

또한, SeNPV와 BmNPV 및 AcNPV들의 다각체 단백질 전기영동상을 비교하기 위하여 alkaline protease를 열처리에 의해 불활화 시킨 후, 다각체 단백질을 분리하여 SDS-PAGE로 분석한 결과, SeNPV의 다각체 단백질은 BmNPV의 다각체 단백질과 비슷한 분자량인 30kD의 주단백질 (polyhedrin) 밴드와 그 중합체로 생각되는 밴드를 보임을 확인할 수 있었다 (그림 2).

다각체 단백질은 일반적으로 전기영동상에서 28~33kD의 주단백질과 그 외 다각체 단백질의 중합체 (polymer), 그리고 alkaline protease에 의해 저분자화된 단백질들로 나타나는데 (Summers & Smith 1978), 본 실험에서는 열처리에 의해 alkaline protease를 대부분 불활화 시켰으나 일부 불활화되지 않은 결과에 의해 저분자화된 단백질 밴드도 일부 관찰되었다.

2. 다각체 단백질 유전자 구조

SeNPV 다각체 단백질 유전자의 구조 분석을 위한 sequencing을 수행하기 위하여, 기존에 Elisabeth 등 (1992)이 보고한 SeNPV의 다각체 단백질 유전자의 염

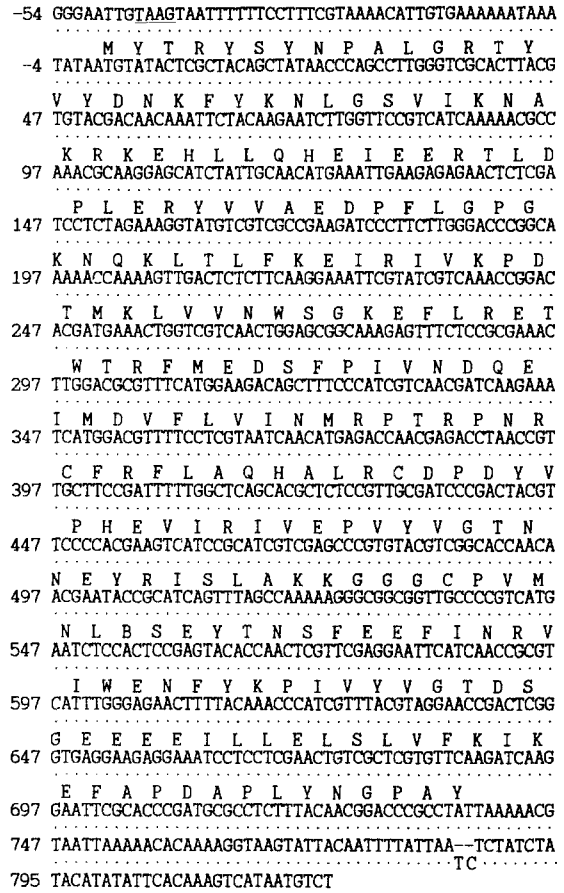


Fig. 3. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene and its flanking region of *Spodoptera exigua* NPV isolated in Korea.

The nucleotide sequence of polyhedrin gene of *Spodoptera exigua* NPV (upper line) was compared with that of *Spodoptera exigua* NPV previously reported by Elisabeth et al.(1992). Dots indicate the same nucleotide sequence. The predicted amino acids are indicated with one-letter code designations. Putative transcription initiation signal is underlined.

기서열을 기초로하여 -54~36에 해당하는 5'-GGGAAT-TGTAAGTAATTTTT-3'의 sense primer와 +803~+822에 해당하는 5'-AGACATTATGACTTTGTGAA-3'의 antisense primer를 합성하고 이를 이용하여 SeNPV의 다각체 단백질 유전자 부위만을 PCR 합성하였다. 합성된 다각체 단백질 유전자는 pGemT 벡터에 클로닝하여 pGTSeP라 명명하고 그 염기서열을 분석하여, 구

조 유전자를 포함한 876 bp의 염기서열을 결정하였다 (그림 3). 이렇게 결정된 염기서열과 추정된 아미노산 서열을 다각체 단백질의 구조 유전자 부위에 대해 Elisabeth 등 (1992)이 보고한 기존의 SeNPV 다각체 단백질 유전자와 비교한 결과 차이를 보인 염기서열이 없었으며 100%의 상동성이 있음을 확인하였고, 아미노산 서열 역시 100%의 상동성을 가졌다 (그림 3). 그러나 Elisabeth 등 (1992)의 보고와 비교할 때 poly (A) signal 내의 +787~+788에 해당하는 "TC" 염기서열은 존재하지 않아 국내 분리주의 SeNPV가 기존에 보고된 것과는 다른 바이러스주임을 시사하여 주었다 (그림 3).

3. 다각체 단백질 유전자 위치 구명

다각체 단백질의 유전자를 가진 DNA 단편을 탐색하기 위해 SeNPV genomic DNA에 수종의 제한효소를 처리하고, PCR로 합성된 SeNPV의 다각체 단백질 유전자를 탐침으로하여 Southern hybridization을 수행하였다. 그 결과 *Cla* I 2.1 Kb, *Nco* I 6.0 Kb, *Sph* I 11.4 Kb 및 *Xho* I 3.0 Kb 단편에 각각 단일 밴드로 hybridization 됨으로써 다각체 단백질 유전자의 위치를 확인 할 수 있었다 (그림 4).

Southern hybridization에 의해 탐색되어진 다각체 단백질 유전자를 포함하고 있는 *Nco* I 6.0 Kb와 *Xho* I 3.0 Kb 단편을 각각 pGem5zf(-) 벡터와 pBluescript II KS(+) 벡터에 클로닝하고 각각 pGSeN과 pBSeX로 명명하였다. 클로닝된 DNA에 대해 여러 가지 제한효소를 처리한 후, 전기영동하여 제한효소 지도를

작성하였다 (그림 5).

이상의 결과에 따라 차후 SeNPV를 이용한 발현 벡터가 완성되면 살충제로서 뿐만 아니라 유용 물질을 생산할 수 있는 발현벡터로서 그 유용성이 기대 된다.

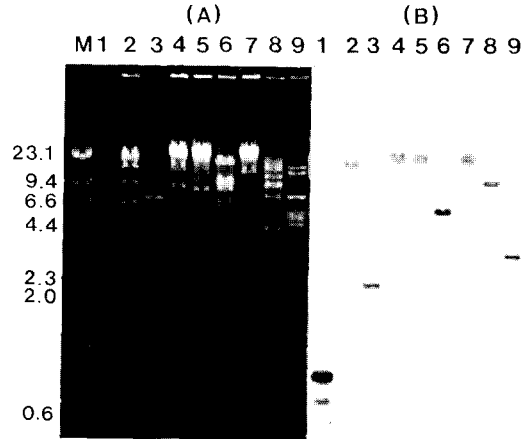


Fig. 4. Southern blot analysis of polyhedrin gene of *Spodoptera exigua* NPV.

The *Spodoptera exigua* NPV DNA was completely digested with various restriction endonucleases and electrophoresed on a 0.8% agarose gel (A). The DNAs were hybridized with labeled PCR amplified polyhedrin coding gene (B). Lane : M, Lambda DNA digested with *Hind* III; 1, probe; 2, *Bgl* II; 3, *Cla* I; 4, *Hind* III; 5, *Kpn* I; 6, *Nco* I; 7, *Sac* I; 8, *Sph* I; 9, *Xho* I.

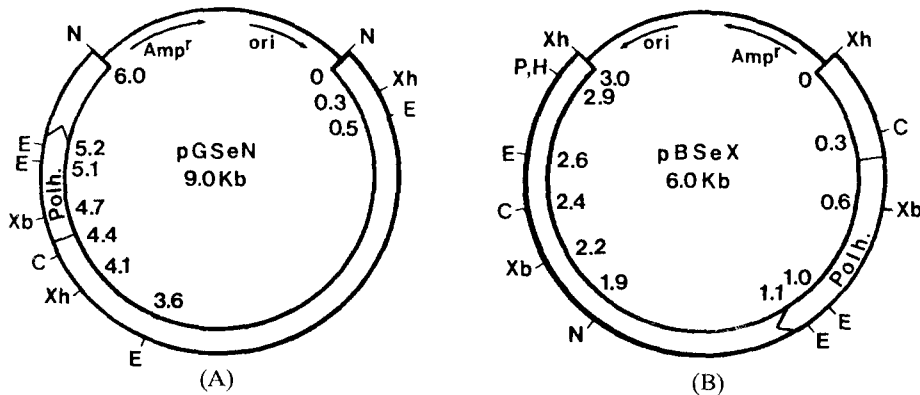


Fig. 5. Cloning and restriction endonuclease map of pGSeN (A) and pBSeX (B).

The *Nco* I 6.0Kb and the *Xho* I 3.0Kb fragments which contain the entire polyhedrin gene of *Spodoptera exigua* NPV were ligated to pGem5zf(-) and pBluescript IIKS(+) to obtain the plasmid pGSeN and pBSeX, respectively. Restriction endonuclease sites : C, *Cla* I; E, *Eco*RI; H, *Hind* III; N, *Nco* I; P, *Pst* I; Xb, *Xba* I; Xh, *Xho* I.

적 요

곤충 바이러스인 *Baculoviridae*의 subgroup A에 속하는 핵다각체병 바이러스는 미생물 살충제로서, 또는 유용물질의 생산을 위한 발현벡터로서 현재 널리 연구·이용되고 있다. 본 연구에서는 이러한 NPV중 국내에서 분리된 SeNPV의 다각체 단백질 유전자의 구조적 특성을 구명함으로써 새로운 발현벡터를 제작하고자 하였다. 이를 위해 SeNPV의 다각체 모양을 전자현미경으로 관찰하고, 다각체 단백질의 분자량과 그 유전자의 구조를 각각 SDS-PAGE 및 염기서열 결정법에 의해 결정하였다. 그 결과, SeNPV의 다각체는 분자량 30 kDa의 단일 단백질로 이루어진 부정형의 구조였으며, 다각체 단백질 유전자의 염기서열을 포함한 876 염기의 서열을 결정하였다. 또한, SeNPV 전체 DNA상에서 다각체 단백질 유전자는 *Xho* I 3.0 Kb와 *Nco* I 6.0 Kb에 각각 존재함을 확인하고, 각각 cloning하여 제한효소 지도를 작성하였다.

사 사

본 연구는 1995년도 농림수산 특정연구과제 (첨단 농림수산 기술개발과제)와 서울대학교 농업생물 신소재 연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

인용문헌

Elisabeth A. S., D. Zuidema, R. W. Goldbach and J. M. Vlak. (1992) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the polyhedrin gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **73** : 2813-2821.

Gelernter W. D. and B. A. Federici. (1986) Isolation, identification and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* **15** : 240-245.

Hara K., M. Funakoshi, K. Tsuda and T. Kawarabata. (1993) New *Spodoptera exigua* cell lines susceptible to *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A** : 904-907.

진병래, 박범석, 제연호, 강석권. (1991) 파밤나방 핵다각체병 바이러스의 생화학적 특성. *한국응용곤충학회지* **30** : 144-149.

고현관, 박종대, 최용문, 최귀문, 박인선. (1991) 파밤나방의 기주 및 피해조사. *한국응용곤충학회지* **30** : 111-116.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685.

Maeda S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato and M. Furusawa. (1985) Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* **315** : 592-594.

McCutchen B. F., P. V. Choudary, R. Crenshaw, D. Maddox, S. G. Kamita, S. Volrath, E. Fowler, B. D. Hammock and S. Maeda. (1991) Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin-Potential for pest control. *Bio/Technology* **9** : 848-852.

Sanger F., S. Nicklen and A. R. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74** : 5463-5467.

Smith G. E. and M. D. Summers. (1982) DNA homology among subgroup A, B and C baculoviruses. *Virology* **123** : 393-406.

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.

Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** : 503-517.

Stewart L. M. D., M. Hirst, M. L. Ferber, A. T. Merriweather, P. J. Calay and R. D. Possee. (1991) Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* **352** : 85-88.

Summers M. D. and G. E. Smith. (1978) Baculovirus structural polypeptides. *Virology* **84** : 390-402.

Tomalski M. D. and L. K. Miller. (1991) Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* **352** : 82-85.

Wood H. A. (1980) Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus protein. *Virology* **103** : 392-399.