

## 숙주범위가 넓어진 재조합 Baculoviruses의 특성 및 병원성 검정

김혜성 · 우수동 · 김우진 · 최재영 · 진병래 · 오현우<sup>1</sup> · 이윤형 · 강석권\*

서울대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부, <sup>1</sup>KIST 생명공학연구소

**Characterization and Pathogenicity against Insect Larvae of Host Range Expanded Baculoviruses.** Hye-Sung Kim, Soo-Dong Woo, Woo-Jin Kim, Jae-Young Choi, Byung-Rae Jin, Hyun-Woo Oh<sup>1</sup>, Youn-Hyung Lee and Seok-Kwon Kang. Division of Applied Biology & Chemistry, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, <sup>1</sup>Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejon 305-606, Korea - The usefulness of host range expanded recombinant viruses for economical viral insecticide and expression vector system has been studied. Host range expanded recombinant viruses, RecS-B6 and RecB-8, constructed by cotransfection of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) and *Autographa californica* NPV (AcNPV), and a host range expanded AcNPV recombinant, Ac-BH, constructed by substitution of the 0.6Kb fragment of the BmNPV helicase gene were compared. The restriction enzyme digestion patterns showed that RecS-B6 and RecB-8 had expanded host ranges by genomic recombination and were more similar to genome of AcNPV than that of BmNPV. SDS-PAGE and PCR analysis showed that the polyhedrin gene of RecS-B6 and RecB-8 was derived from BmNPV genomic DNA. The morphology of polyhedra of recombinant viruses showed a slight difference between the two host cells, Sf and BmN cells, indicating that the morphology of polyhedra was influenced by host cells. The bioassay data for insect larvae showed that Ac-BH, compared to wild type viruses, had superior pathogenicity against *Bombyx mori* larvae but inferior pathogenicity against *Spodoptera exigua* larvae. Although the pathogenicity was lower than that of wild type viruses in both larvae, RecS-B6 showed the pathogenicity in both larvae. These results suggested that Ac-BH was a less useful economical insecticide than random genomic recombinant virus RecS-B6.

곤충병을 유발하는 곤충 바이러스는 약 20개 그룹 이상인 것으로 알려져 있으며, 이들은 12과로 분류되어 있는 하나, 아직 많은 바이러스가 분류되고 있지 못한 실정이다. Baculoviridae, Entomopoxviridae, Reoviridae의 3과는 봉입체(occlusion body)를 형성하는 바이러스들로, 이 중 Baculoviridae과의 baculovirus 그룹은 약 600여종의 곤충에서 분리 보고되고 있는 매우 보편적인 곤충 바이러스로서 가장 많은 연구가 이루어지고 있다(1).

Baculovirus에 속하는 핵다각체병 바이러스(Nuclear Polyhedrosis Virus: NPV)는 곤충 이외의 척추동물에는 전혀 병원성이 없어 안전하고, 다각체 단백질(polyhedrin)이라는 구조 단백질 내에 바이러스 입자가 매립된 특이한 봉입체 형태로 존재함으로써 야외 환경에서 바이러스의 활성을 장기간 유지할 수 있는 장점이 있다. 따라서, 미국, 소련, 일본 등의 일부 선진국에서는 20여종의 바이러스를 살충제로 상품화하여 사용하고 있다(2, 3).

그러나, NPV는 높은 숙주특이성에 따른 좁은 숙주범

위에 의해, 동일한 작물에 동시에 발생하는 해충을 방제하기 위해서는 각각의 해충에 병원성을 갖는 각각의 바이러스 제제를 사용해야하므로 비경제적이며, 발현백터로써 외래 유전자를 발현하는 경우에도 숙주세포 및 곤충에 제약을 받게 된다. 따라서, 최근에는 이러한 단점을 개선하고자, 유전자 조작에 의한 재조합 바이러스의 제작을 통하여 좁은 숙주범위를 해결하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다(1, 4).

NPV의 숙주특이성에 관한 분자생물학적인 연구는 아직 그 명확한 기작을 밝혀내지 못하고 있으나, 척추동물 바이러스에서 많이 연구되고 있는 숙주세포 수용기와의 관계보다는 NPV의 유전적 특성과 더 많은 상관 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(4). 최근 연구에 의하면, 누에 핵다각체병 바이러스(*Bombyx mori* NPV: BmNPV)의 helicase 유전자내 0.6 Kb 단편이 *Autographa californica* NPV(AcNPV)에 치환된 재조합 바이러스는 숙주범위가 넓어져 누에 세포주 및 유충에서 감염, 증식됨이 보고되어졌으며(5), 특히 helicase 유전자의 0.6 Kb 내의 79개의 염기쌍이 숙주범위 확장에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(6).

따라서, 본 연구는 이러한 숙주범위가 넓어진 재조합

\*Corresponding author

Tel. 82-331-290-2481, Fax. 82-331-296-0926

E-mail: kskipl@plaza.sun.ac.kr

Key words: Host range expanded baculovirus, Recombinant virus, Pathogenicity, Helicase gene

바이러스의 살충제로써의 유용성을 조사하기 위하여, 이미 보고(7)한 바 있는 AcNPV와 BmNPV의 유전자 재조합에 의해 선발된 숙주범위가 넓어진 12종의 재조합 바이러스 중 그 유전적 양상이 매우 유사한 재조합 바이러스 RecS-B6와 RecB-8 그리고 helicase 유전자만 일부 치환되어 제작된 재조합 바이러스에 대해 그 유전적 특성과 각 곤충에 대한 병원성 검정을 통해 살충제로써의 이용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 곤충 및 바이러스

실험 곤충은 잠사곤충연구소에서 분양 받은 3령의 누에(*Bombyx mori*)를 잠사곤충연구소의 표준사육관리법에 따라 사육하였으며, 파밤나방 유충은 고 등(8)의 방법에 따른 인공사료를 이용하여 실내사육하며 본 실험에 이용하였다. 바이러스는 국내의 양잠농가에서 분리한 누에 핵다각체병 바이러스(BmNPV-K1)와 미국 도입종인 AcNPV 및 이미 보고한 바 있는 숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스를 각 숙주곤충의 유충 및 세포주에서 증식시켜 실험에 이용하였다(7).

### 곤충 세포주

곤충 세포주는 미국 Idaho 대학의 Miller 박사로부터 *Spodoptera frugiperda*(Sf)의 난소에서 유래된 Sf-21 세포주를 분양 받았으며, BmN-4 세포주 역시 누에의 난소에서 유래된 것으로 일본잠사 곤충농업기술연구소의 Kobayashi 박사로부터 분양 받아, 곤충 세포용 Grace 배지(Gibco)와 TC-100 배지(Sigma)에 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco)가 함유된 배양액을 만들어 Summers와 Smith의 방법(9)에 따라 27°C 항온기에서 계대 배양하여 이용하였다.

### 세포주에 대한 DNA 전이 및 End-point 희석법

배양세포주에 대한 DNA 상태의 바이러스 접종은 liposome 전이시료인 N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate(DOTAP)(Boehringer Mannheim)을 이용하여 제조 회사의 방법에 따라 바이러스 DNA 1 µg과 플라스미드 DNA 5 µg의 비율로 섞고 20 mM HEPES 완충액으로 최종 부피를 50 µl로 한 후, DOTAP 30 µl를 역시 HEPES 완충액 70 µl로 희석하여 상온에서 15 분간 반응시킨 후, 세포 배양액과 섞어서 세포주에 접종하여 6 시간 동안 처리하고 새 배양액으로 교체하여 접종하였다. 접종 4-5일 후부터 세포 내 다각체 형성 또는 바이러스 병징에 의하여 감염 유무를 확인하였다.

순수한 바이러스의 선발 및 농도측정은 O'Reilly 등

(10)의 방법에 따라 End-point 희석법에 의해 재조합 바이러스를 선발하고 바이러스의 PFU(plaque forming unit)를 결정하였다.

### 바이러스 다각체 분리 및 SDS-PAGE

곤충 유충 및 배양세포에서 증식된 바이러스 다각체의 분리는 우 등(7)의 방법에 따라 순수한 다각체를 정제하여 단백질 전기영동 및 바이러스 DNA 분리에 이용하였다. 다각체 단백질의 SDS-PAGE 분석은 정제된 다각체 침전물을 알칼리용액(0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.17 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 10.0)에 부유시켜 37°C에서 15 분간 처리한 후, 15,000 rpm에서 5 분간 원심하여 용해되지 않은 다각체를 제거하고, 다시 상청액을 55,000 rpm에서 40 분간 원심하여 바이러스 입자를 제거하여 다각체 단백질 용액을 얻었다. 이 다각체 단백질 용액에 2 배 농도의 단백질 시료 용액(0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 혼합하고, 100°C에서 10 분간 가열하여 전기영동 시료를 준비하였다. 전기영동은 Laemmli 방법(11)에 따라 10% SDS-polyacrylamide 겔에서 수행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하여 관찰하였다.

### 전자현미경 관찰

다각체의 외부 형태 관찰은 순수하게 정제된 바이러스의 다각체를 알루미늄 원반 시료대 위에서 자연 건조시킨 후, 탄소와 금으로 coating하여 주사전자현미경(scanning electron microscope: SEM-515)으로 관찰하였다. 투과전자현미경(transmission electron microscope)상의 관찰은 접종 후 72시간이 경과된 세포를 수거하고 3,000 rpm에서 15 분간 원심하여 얻은 침전물을 3% glutaraldehyde로 1차 고정하고 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 충분히 씻은 후, 1% OsO<sub>4</sub>를 함유한 동 완충액에서 2차 고정하였다. 그 후 50, 70, 90, 100% 에탄올 및 100% 아세톤으로 탈수하고 EPON 수지(EPON812)에 포매한 뒤, LKB-Ultratome(MT-5000)으로 초박절편을 작성하여 현미경(CM-20)으로 관찰하였다.

### 바이러스 DNA 분리 및 PCR

바이러스 DNA의 분리는 Smith와 Summers(12)의 방법에 따라서 정제하였으며, 플라스미드 DNA의 분리 및 기타 조작은 일반적인 플라스미드 조작 방법에 따랐다(13). PCR을 위한 oligonucleotide primers는 다각체 단백질 유전자의 구조 유전자를 클로닝하기 위하여 -51~-32에 해당하는 5'-TAAGTATTTTACTGTTTTCG-3'의 sense primer와 +742~+759에 해당하는 5'-CTA-TATAAATGTATAGTG-3'의 antisense primer를 이용하였다. PCR은 PreMix™-Top(Korea Biotech)을 이

용하여 50 ng의 바이러스 DNA와 sense 및 antisense primer를 각각 100 pmole씩 첨가하고 PCR용 시약 혼합액과 섞어 증류수로 최종 부피를 20  $\mu$ l로 하여 Thermocycler(Perkin Elmer)로 다음 조건에 따라 PCR을 수행하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C 5분, 50 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 2분으로 1과정, 94 $^{\circ}$ C 2분, 50 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 2분으로 33과정을 수행하였다.

**병원성 검정**

누에 및 파밤나방 3령 유충을 이용한 병원성 검정은 각 바이러스의 다각체를 농도별로 희석하고 농도구당 30~40 마리의 각 유충을 사용하여 24 시간마다 사충수를 조사하여, probit 분석프로그램(14)으로 LT<sub>50</sub>과 LC<sub>50</sub> 수치를 결정하여 병원성을 결정하였다.

**결과 및 고찰**

**숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스의 제작 및 유전적 특성**

AcNPV와 BmNPV간의 유전자 재조합에 의해 숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스 RecS-B6와 RecB-8의 DNA를 분리하여 모바이러스와 제한 효소 패턴을 비교

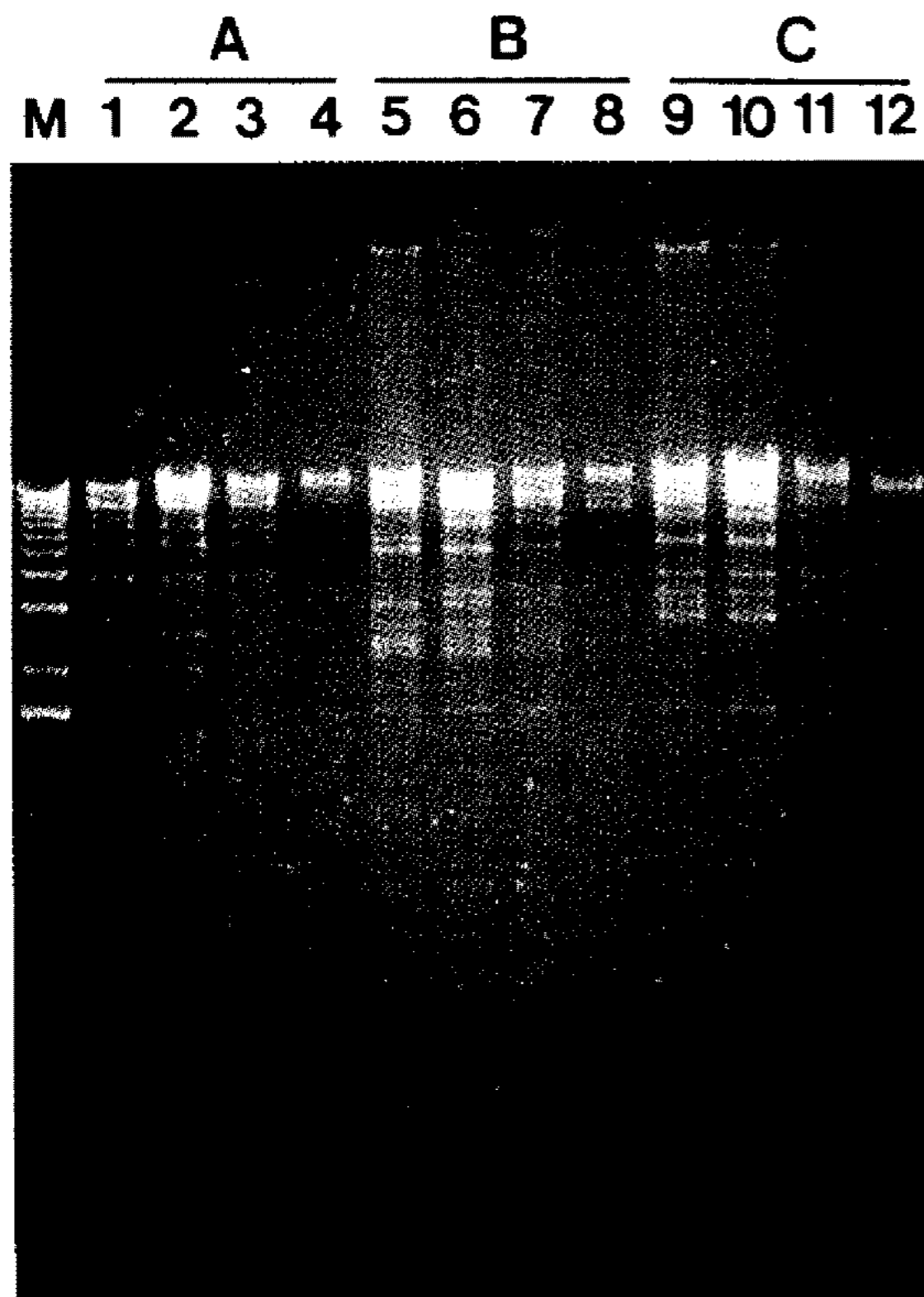


Fig. 1. Restriction endonuclease analysis of parent and recombinant virus genomic DNAs. A, *Eco*RI; B, *Hind*III; C, *Pst*I; M, 1 Kb ladder marker; lane 1, 5 and 9, AcNPV; lane 2, 6 and 10, RecS-B6; lane 3, 7 and 11, RecB-8; lane 4, 8 and 12, BmNPV.

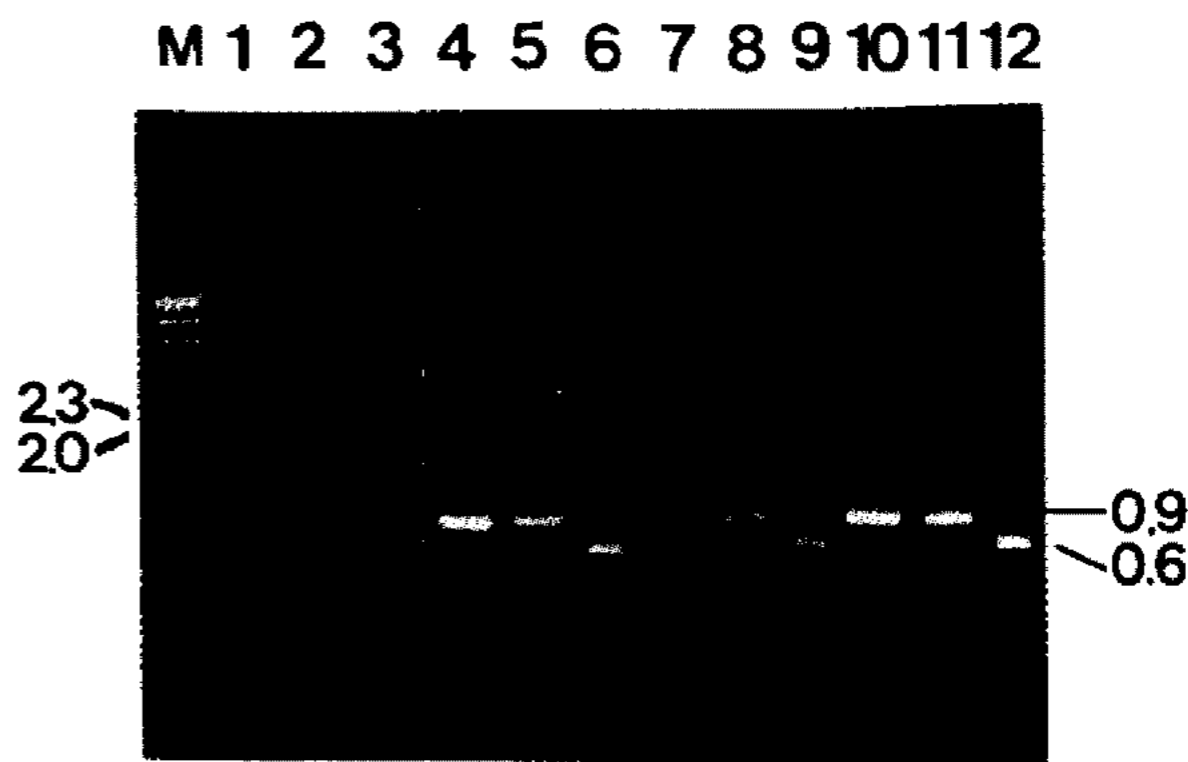


Fig. 2. PCR products and its restriction endonuclease digestion patterns for the NPV polyhedrin gene of AcNPV(lane 1, 2 and 3), BmNPV(lane 4, 5 and 6), RecS-B6(lane 7, 8 and 9) and RecB-8(lane 10, 11 and 12). lane 1, 4, 7 and 10, PCR products; lane 2, 5, 8 and 11, *Kpn*I; lane 3, 6, 9 and 12, *Xba*I; M, Lambda DNA digested with *Hind*III.

하였다. 그 결과 RecS-B6와 RecB-8은 모바이러스와는 상이한 패턴을 보였으며, 전체적인 DNA 패턴은 AcNPV에 더욱 유사하게 나타나고 BmNPV와는 다른 것으로 보아 이들 재조합 바이러스가 AcNPV를 모체로 하여 BmNPV DNA가 부분적으로 재조합된 것으로 추정되었다(Fig. 1).

이들 재조합 바이러스의 대표적 유전자인 다각체 단백질 유전자의 유래를 조사하기 위해 PCR 분석을 실시한 결과, AcNPV 다각체 단백질 유전자에만 존재하는 *Kpn*I 제한 효소에는 처리되지 않고, BmNPV의 다각체 단백질 유전자에만 존재하는 *Xba*I제한 효소에만 처리됨으로써

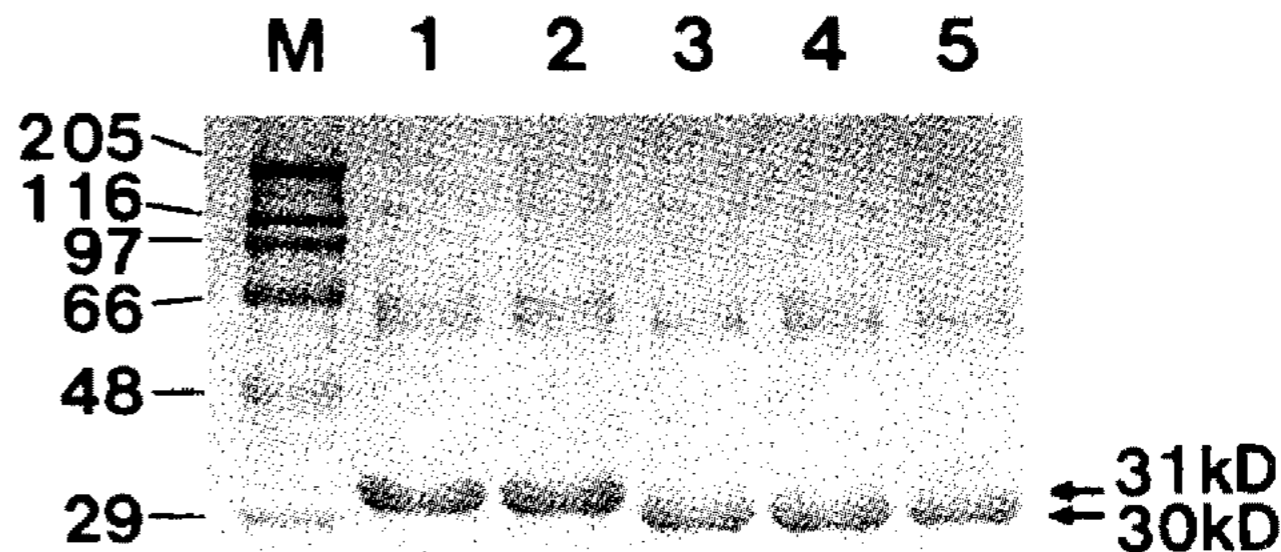
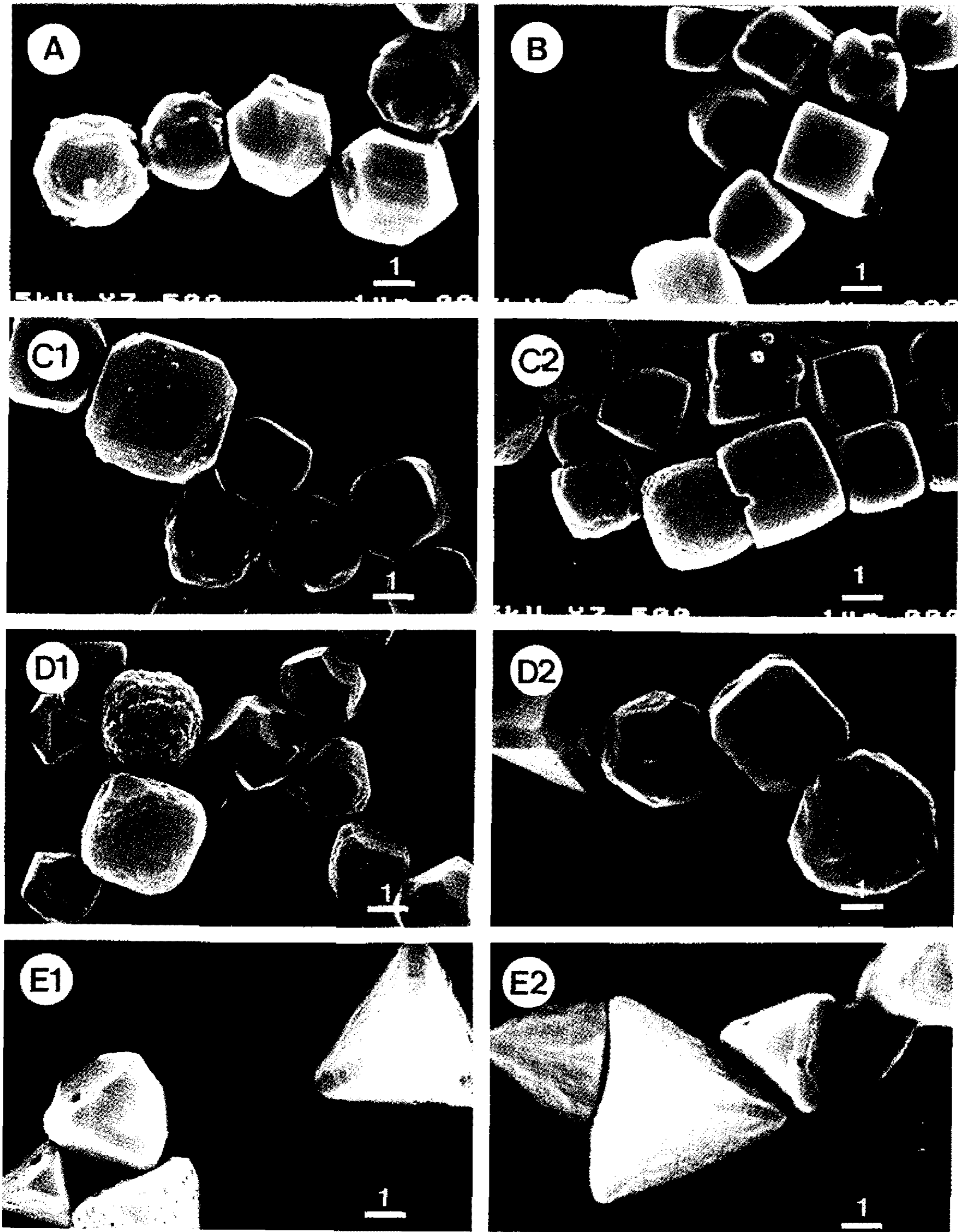


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel analysis of NPV polyhedral protein. M, marker proteins; lane 1, AcNPV; lane 2, Ac-BH; lane 3, BmNPV; lane 4, RecS-B6; lane 5, RecB-8.

두 바이러스의 다각체 단백질 유전자는 전체 DNA 패턴 분석결과와는 달리 BmNPV에서 유래되었음을 시사하였다(Fig. 2).

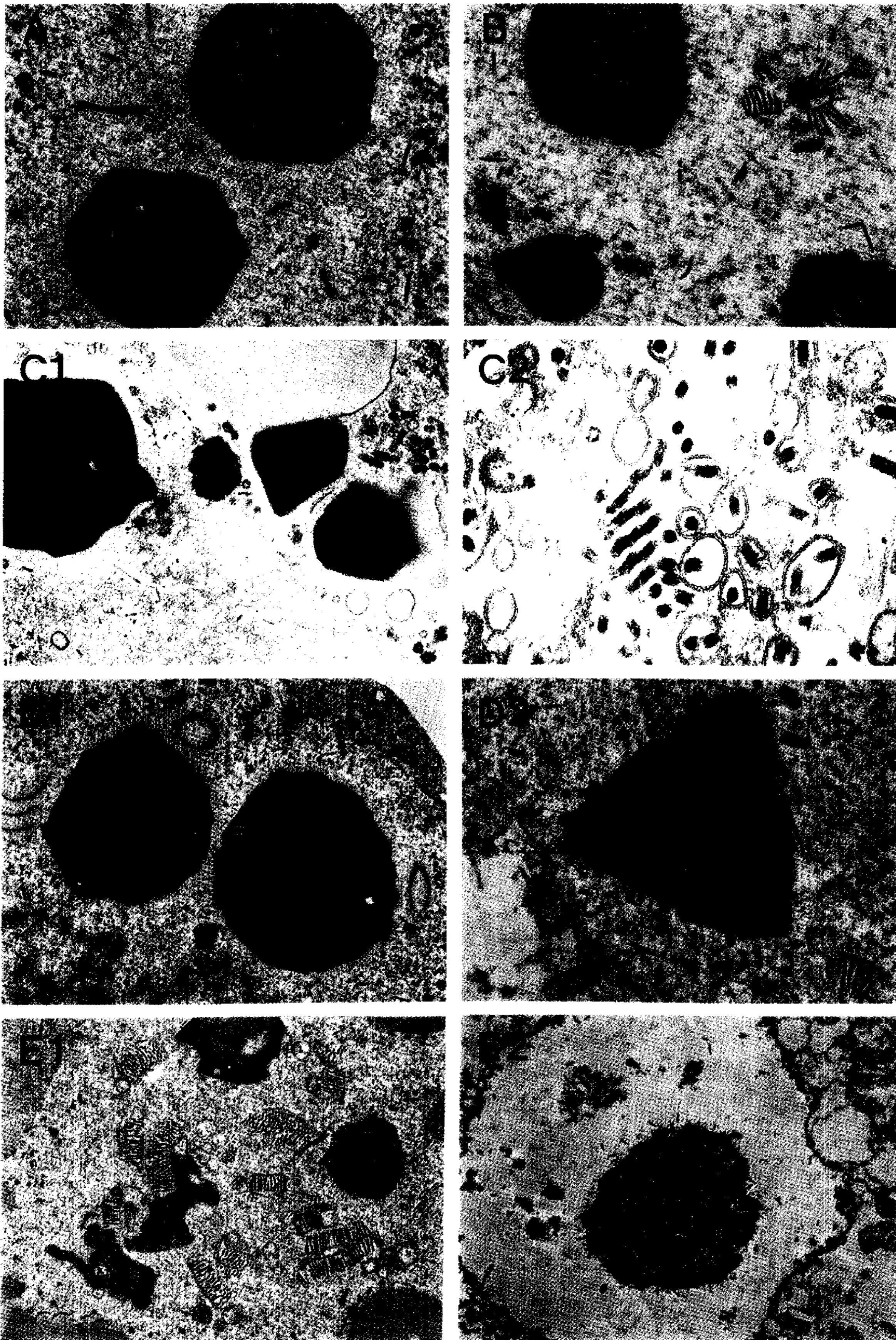
현재까지 숙주범위에 관련하는 유전자로 밝혀진 helicase 유전자 0.6Kb 단편을 BmNPV의 것으로 치환시켜 숙주범위가 넓혀진 재조합 바이러스인 Ac-BH를 제작하

고 RecS-B6, RecB-8의 비교 대상으로 이용하였다. Ac-BH의 제작은 BmNPV의 helicase 유전자 0.6 Kb 단편을 pGEM-T vector에 클로닝하여 AcNPV genomic DNA와 BmN-4 세포주에 동시 감염시켜 Sf-21 및 BmN-4 세포주를 이용하여 숙주범위가 넓혀진 재조합 바이러스를 선발하였다. 이렇게 제작된 Ac-BH의 helicase 일부가



**Fig. 4. Scanning electron micrographs of polyhedra of parent and recombinant viruses.**

A, BmNPV; B, AcNPV; C1, Ac-BH polyhedra produced from BmN-4 cells; C2, Ac-BH polyhedra produced from Sf-21 cells; D1, RecS-B6 polyhedra produced from BmN-4 cells; D2, RecS-B6 polyhedra produced from Sf-21 cells; E1, RecB-8 polyhedra produced from BmN-4 cells; E2, RecB-8 polyhedra produced from Sf-21 cells.



**Fig. 5. Transmission electron micrographs of infected cells with parent and recombinant viruses.**  
 A, Infected BmN-4 cells by BmNPV; B, Infected Sf-21 cells by AcNPV; C1, Infected BmN-4 cells by Ac-BH; C2, Infected Sf-21 cells by Ac-BH; D1, Infected BmN-4 cells by RecS-B6; D2, Infected Sf-21 cells by RecS-B6; E1, Infected BmN-4 cells by RecB-8; E2, Infected Sf-21 cells by RecB-8.

BmNPV의 것으로 치환되었는지 확인하기 위하여, helicase 유전자 0.6 Kb을 PCR하고, 이 PCR 산물을 pBluscriptII SK(+) vector에 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, BmNPV의 것으로 치환되었음을 확인하였다(자료 미제시).

**숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스의 특성**

서로 다른 방법에 의해 숙주범위가 확장된 RecS-B6, RecB-8 그리고 Ac-BH의 다각체 단백질에 대한 전기영동을 실시한 결과, 유전자 수준에서의 결과와 일치하여 RecS-B6, RecB-8의 다각체 단백질 크기는 BmNPV의 다각체 단백질 크기와 같은 30 kDa 이었으며, Ac-BH는 AcNPV의 것과 일치하는 31 kDa 이었다(Fig. 3).

이들 재조합 바이러스의 다각체 모양을 주사전자현미경에 의해 관찰한 결과, AcNPV는 정육면체 형태였고, BmNPV는 거의 구형에 가까운 18면체로 관찰된 반면(Fig. 4a, b), BmN-4 세포주에서 수거한 Ac-BH는 모서리가 각인 형태의 육면체, Sf-21 세포주에서 수거한 Ac-BH는 정육면체에 흡사한 형태의 다각체가 많이 보였다(Fig. 4c). 또한, RecS-B6의 다각체 형태는 매우 불규칙하여 둥근형태, 사면체, 육면체등의 모양을 갖는 다각체가 두 세포주 모두에서 나타났으며(Fig. 4d), RecB-8의 경우는 두 세포주 모두에서 사면체의 형태가 많았다(Fig. 4e). 이러한 결과는 재조합 바이러스의 다각체 형성이 세포주에 따라 조금씩 상이한 결과를 보임으로써 다각체의 모양형성에 세포주가 영향을 주는 것으로 추정되어지며, 또한 RecS-B6나 RecB-8의 경우 전체적인 바이러스 DNA 패턴은 AcNPV와 유사하나 다각체 단백질 유전자는 BmNPV에서 모두 유래된 것을 고려할 때, 세포주 뿐만 아니라 다각체 단백질 유전자를 포함한 다각체 형성에 관여하는 기타 유전자들이 다각체의 모양을 결정짓는데 영향을 줌을 보여주는 결과였다. 현재까지 다각체의 모양형성은 그 다각체 단백질 유전자에 의해 주로 결정된다고 보고되고 있으나, 본 연구결과는 다각체의 모양결정에는 다각체 단백질 유전자 외에도 다른 요인이 작용함을 시사한다(15, 16).

재조합 바이러스의 Sf-21과 BmN-4 세포주에서 감염상을 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 모바이러스인 BmNPV는 그 전형적인 형태인 SNP(single nucleocapsid NPV), AcNPV는 MNPV(multiple nucleocapsid NPV) 형태였다(Fig. 5a, b). Ac-BH의 경우, BmN-4 세포주에서는 단면이 사각형인 다각체내에 바이러스가 매립되어 있고 주위에 MNPV가 관찰되었으나, Sf-21 세포주에서는 다각체를 관찰하기 어려웠으며 바이러스입자 형태는 MNPV로 나타났다(Fig. 5c). 또한, RecS-B6와 RecB-8의 경우에도 바이러스 입자 형태는 MNPV로 나타났으며, 특이할 만한 것은 RecB-8의 경우에 다각체내에 매립되지 않은 바이러스 입자가 많이 관찰되고 많은 수의 바이러스 입자가 하나의 envelope내에 존재하는 형태를 보였다(Fig 5d, e).

**누에와 파밤나방 유충을 이용한 병원성 검정**

숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스의 다각체 상태의 병원성을 파밤나방 및 누에 3령 유충을 이용하여 조사하였다. 파밤나방에서의 병원성 검정 결과, 모바이러스인 AcNPV가 가장 높은 병원성을 보였으며 재조합 바이러스인 RecB-8, Ac-BH은 LC<sub>50</sub>값을 측정할 수 없을 정도로 병원성이 상당히 낮게 조사되었다(Table 1). 또한, LT<sub>50</sub>값은 다각체를 1×10<sup>7</sup> 다각체/유충으로 접종한 실험구에서 측정된 결과, LC<sub>50</sub>값의 결과와 유사하여, AcNPV가 가장 높은 병원성을 보였고, RecB-8, Ac-BH의 LT<sub>50</sub>값은 측정할 수 없었다(Table 2). 누에 3령 유충을 이용하여 동일한 방법으로 병원성을 검정한 결과, LC<sub>50</sub>값과 LT<sub>50</sub>값에서 Ac-BH가 파밤나방에서와 다르게 상당히 높은 병원성을 보여 모바이러스인 BmNPV보다도 높게 나타났다(Fig. 3, 4) 특히, 재조합 바이러스 Ac-BH의 경우 곤충에 따라 매우 상이한 결과를 보였는데, 이는 Kamita와 Maeda(17)가 세포주에서 helicase에 의해 숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스의 증식상을 조사했을 때 원래의 숙주세포에서는 병원성이 떨어지고, 감염성을 가지지 못했던 세포주에서 높은 병원

**Table 1. LC<sub>50</sub>s of wild type and recombinant viruses in *Spodoptera exigua* third instar larvae**

Viruses	LC <sub>50</sub> (PIBs/ml)	95% fiducial limits ( <sup>1</sup> PIBs/Larva)	
		Lower	Upper
AcNPV	74. × 10 <sup>5</sup>	3.8 × 10 <sup>5</sup>	1.1 × 10 <sup>6</sup>
RecS-B6	4.3 × 10 <sup>6</sup>	2.0 × 10 <sup>6</sup>	6.5 × 10 <sup>6</sup>
RecB-8		<sup>2</sup> ND	
Ac-BH		<sup>2</sup> ND	

<sup>1</sup>Polyhedra Inclusion Body. <sup>2</sup>Not Determined due to the lowest pathogenicity.

**Table 2. Time-mortality of *S. exigua* third instar larvae after inoculation of 1×10<sup>7</sup> <sup>1</sup>PIBs/larva with wild type and recombinant viruses**

Viruses	LT <sub>50</sub> (hours)	95% fiducial limits (hours)	
		Lower	Upper
AcNPV	160.7	154.6	166.8
RecS-B6	188.5	180.4	196.6
RecB-8		<sup>2</sup> ND	
Ac-BH		<sup>2</sup> ND	

<sup>1</sup>Polyhedra Inclusion Body. <sup>2</sup>Not Determined due to the lowest pathogenicity.

**Table 3. LC<sub>50</sub>s of wild type and recombinant viruses in *Bombyx mori* third instar larvae**

Viruses	LC <sub>50</sub> ( <sup>1</sup> PIBs/ml)	95% fiducial limits (PIBs/Larva)	
		Lower	Upper
BmNPV	2.9 × 10 <sup>5</sup>	7.2 × 10 <sup>4</sup>	5.0 × 10 <sup>5</sup>
ResC-B6	4.3 × 10 <sup>5</sup>	2.1 × 10 <sup>4</sup>	8.4 × 10 <sup>5</sup>
RecB-8	1.4 × 10 <sup>5</sup>	3.1 × 10 <sup>4</sup>	2.4 × 10 <sup>5</sup>
Ac-BH	3.4 × 10 <sup>5</sup>	2.1 × 10 <sup>4</sup>	5.6 × 10 <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Polyhedra Inclusion Body.**Table 4. Time-mortality of *B. mori* third instar larvae after inoculation of 1 × 10<sup>7</sup> <sup>1</sup>PIBs/larva with wild type and recombinant viruses**

Viruses	LT <sub>50</sub> (hours)	95% fiducial limits (hours)	
		Lower	Upper
BmNPV	156.1	148.5	163.6
RecS-B6	166.8	159.3	174.2
RecB-8	171.1	165.4	176.8
Ac-BH	141.7	138.8	144.6

<sup>1</sup>Polyhedra Inclusion Body

성을 보인다는 결과와 일치하는 것이었다. 그러나 helicase 유전자 뿐 만 아니라 기타 유전자의 재조합도 일어나 제작된 재조합 바이러스인 RecS-B6의 경우 양쪽 유충 모두에서 다소 낮지만 고른 병원성을 보임으로써, 살충제로서 이용측면에는 오히려 Ac-BH에 비해 더욱 유용할 것으로 기대된다. 또한, RecS-B6와 RecB-8의 경우 그 유전적 패턴이 매우 유사함에도 불구하고 병원성에서는 상이한 결과를 보임으로써 이들 유전자의 비교 분석을 수행한다면 병원성에 관련된 요인의 분석도 가능할 것으로 기대되며, 현재 이 두바이러스의 유전적 차이에 대해 유전자 지도 작성을 통한 비교 분석을 수행중이다. 이상의 결과에서 숙주범위가 넓어진 재조합 baculovirus를 살충제로서 이용하기 위해서는 현재까지 밝혀진 helicase 유전자의 치환만으로는 충분하지 못하며 기타 병원성에 영향을 주는 다른 유전자의 치환 또는 조작이 필요함을 제시해 주었다.

## 요 약

BmNPV와 AcNPV간의 전체 유전자 재조합과 BmNPV의 helicase 유전자에 의해서만 숙주범위가 넓어진 재조합 baculoviruses의 특성을 전자현미경으로 관찰한 결과 다각체 단백질 유전자 뿐 만 아니라 숙주세포 및 기타 다른 요인도 다각체의 모양을 결정짓는데 영향을 주는 것으로 나타났다. 또한 그들의 병원성을 누에 및 파밤나방 3령 유충을 이용하여 조사한 결과, helicase에 의해서만 숙주범위가 넓어진 재조합 바이러스의 경우 원래 숙주곤충인 파밤나방에는 매우 낮은 병원성을 보이는 반

면 병원성이 없던 누에에는 매우 높은 병원성을 보였으나 살충제로써는 유용하지 않는 것으로 판단되었다. 반면, 두 바이러스의 유전자 재조합에 의해 숙주범위가 넓어진 바이러스는 비록 병원성은 낮으나 양쪽 숙주에 대해 모두 병원성을 보여 오히려 살충제로써 이용가능성을 보였다. 특히 RecS-B6와 ResB-8은 그들의 유전적 패턴이 매우 유사하여 이들의 구조 차이에 대한 분석은 바이러스의 병원성을 결정짓는 요인결정을 가능하게 할 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)와 서울대학교 농업생명소재연구소 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Blissard, G. W. and G. F. Rohrmann. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* **35**: 127-155.
- Wood, H. A. and R. G. Robert. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 69-87.
- Maeda, S. and K. Majima. 1990. Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71**: 1851-1855.
- 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.
- 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.
- Croizier, G., Croizier, L., Argaud, O. 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.
- 우수동, 박범석, 박지현, 정인식, 양재명, 강석원. 1993. 누에 및 *Autographa californica* 핵다각체 바이러스에 대한 유전자 재조합. *한국응용곤충학회지* **32**: 407-413.
- 고현관, 박종대, 최용문, 최귀문, 박인선. 1991. 파밤나방의 기주 및 피해조사. *한국응용곤충학회지* **30**: 111-116.
- 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.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow. 1992. Baculovirus Expression Vectors; A laboratory manual. W. H. Freeman and Company, New York.

11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, **227**: 680-685.
12. Smith, G. E. and M. D. Summers. 1982. DNA homology among subgroup A, B, and C baculoviruses. *Virology* **123**: 393-406.
13. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. Molecular Clonings; A Laboratory manuals. Cold Spring Harbor Laboratory.
14. Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 333.
15. Carstens, E. B., A. Krebs and C. E. Gallerneault. 1986. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *J. Virol.* **58**: 684-688.
16. Fuxa, J. R., E. H. Weidner and A. R. Richter. 1992. Polyhedra without virions in a vertically transmitted nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 53-58.
17. Kamita, S. G. and S. Maeda. 1996. Abortive infection of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in Sf-9 cells after mutation of the putative DNA helicase gene. *J. Virol.* **70**: 6244-6250.

(Received 12 April 1997)