

누에 핵다각체병 바이러스의 Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase 유전자가 누에의 발육에 미치는 영향

강경돈 · 이은정 · Shizuo George Kamita¹ · 성수일

수원대학교 자연과학대학, ¹Department of Entomology, University of California, Davis

Effect of the Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase Gene of the *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus on the Development of the Silkworm, *Bombyx mori*

Kyung-don Kang, Eun-jung Lee, Shizuo George Kamita¹ and Su-Il Seong

College of Natural Sciences, The University of Suwon, Suwon 445-743, Korea and

¹Department of Entomology, University of California, Davis, California 95616-8584

ABSTRACT

The baculovirus *egt* gene encodes an ecdysteroid UDP-glucosyltransferase(EGT) which catalyzes the transfer of glucose from UDP-glucose to the insect molting hormone ecdysteroid resulting in a functionally inactive ecdysteroid. In baculovirus-infected insect larvae, EGT has been shown block molting and pupation. In this study, we compared the development of 4th and 5th instar silkworm, *Bombyx mori*, larvae injected with either wild-type *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) or a mutant BmNPV(BmEGTZ) in which the *egt* gene was disrupted by the insertion of a lacZ gene cassette. Larvae injected with BmEGTZ died roughly 12 h more rapidly compared to identical larvae infected with BmNPV. In addition, BmEGTZ-infected larvae prematurely stopped feeding and gain less weight compared to BmNPV-infected larvae. In order to investigate why BmEGTZ-infected larvae died more rapidly than BmNPV-infected larvae, the array of hemolymph proteins in BmEGTZ- or BmNPV-infected larvae were analyzed by SDS-PAGE. The hemolymph of BmEGTZ-infected larvae showed virus-specific proteins, including polyhedrin, about 12 h earlier than the hemolymph of BmNPV-infected larvae

Key words : Silkworm, *Bombyx mori*, Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene, Baculovirus, BmNPV

서 론

누에 핵다각체병 바이러스(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV)는 baculovirus의 일종으로 숙주세포의 핵내에서 증식하여 막대형 구조의 바이러스를 생산하는 이중나선형 DNA바이러스이다 (Maeda, 1989). Baculovirus는 현재 해충의 생물학적 방제 및 외래 유전자의 도입과 발현을 위한 운반체(vector)로 널리 이용되고 있으나 근래 baculovirus의 genome내에 숙주의 ecdysteroid 작용을 제어하는 특

이 유전자가 존재하고 있음이 밝혀져 관심의 대상이 되고 있다. 즉, *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus(AcMNPV)에서 발견된 *egt* 유전자는 UDP-glucose로부터 당을 ecdysteroid에 전달하는 전이효소 EGT를 생산하며 (O'Reilly & Miller, 1989; Burand & Park, 1992), 이 효소에 의해 당이 부가된 ecdysteroid는 호르몬으로서의 기능을 상실하므로써 바이러스에 감염된 곤충의 탈피나 용화를 지연 또는 억제시킴으로써 결과적으로 유충 기간을 연장시키고 나아가서 숙주에서의

바이러스 생산량을 증대시킨다(O'Reilly, 1995). 또한 O'Reilly & Miller(1991)는 야생형 AcMNPV로부터 *egt* 유전자를 제거시킨 돌연변이체 바이러스를 감염시킨 결과 유충의 섭식을 감소시키고, 또한 초기 치사율을 증가시킴으로써 결과적으로 바이러스의 살충 능력을 증대시킬 수 있다고 보고하였다.

이와 같이 AcMNPV에서의 *egt* 유전자에 관해서는 비교적 상세한 연구가 보고되고 있으나 BmNPV에 관해서는 거의 알려진 바가 없다. 또한 바이러스 감염 시 바이러스의 증식에 미치는 ecdysteroid의 영향에 관해서는 Keely & Vinson(1975)의 단편적인 보고가 있으나 바이러스의 증식과 ecdysteroid와의 상호관계에 대해서는 해명되어야 할 점이 많다. 이러한 점에서 *egt* 결여 돌연변이체 바이러스의 이용은 *egt* 유전자의 숙주곤충에 대한 ecdysteroid의 기능제어기구해석을 위해 매우 유용한 연구재료라 할 수 있다. 본 연구에서는 *egt* 유전자의 숙주곤충에서의 ecdysteroid 제어기구해명에 관한 연구의 일환으로 우선 BmNPV의 *egt* 결여 돌연변이체 바이러스와 야생형 바이러스를 각각 누에 유충에 감염시켜 유충의 생체중 변화·폐사율 등을 조사하고 아울러 감염 유충체액 단백질의 경시적 변화를 비교함으로써 *egt* 유무에 따른 누에 핵다각체형 바이러스의 누에 발육에 미치는 영향을 비교조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시곤충

본 실험에서 사용한 누에는 교잡품종인 백옥잠으로, 인공사료(동방유량(주)제조)를 급여하여 25°C에서 정온 사육하였다.

2. 곤충세포주 및 바이러스

곤충세포주는 일본 동경대학 양잠학 연구실로부터 분양받은 BmN 세포주를 사용하였고, 10% FBS(Gibco)를 첨가한 TC-10 배양액을 만들어 27°C 항온기에서 계대배양하였다. 야생형 바이러스는 BmNPV T3(Maeda *et al.*, 1985)을 사용하였고 *egt* 결손 바이러스는 야생형 genome내의 *egt* 영역을 lac Z로 치환한 돌연변이체 바이러스, BmEGTZ를 미국 UC Davis의 Maeda 박사로부터 분양받아 BmN 세포주에 접종하여 증식시켰다. 바이러스 농도의 측정에는 plaque assay와 end-point 희석법을 병행하였다(Maeda, 1989).

3. 곤충의 성장비교

4령 당일과 3일 및 5령 당일과 3일의 누에유충을

2-3시간 끓인 후 얼음물에서 마취시켜 kanamycin(6 mg/ml)이 포함된 BmNPV T3와 BmEGTZ(5×10^5 PFU/ml)의 배양액 20 μ l를 각각 유충체강내로 주사하였으며 대조구에는 배양액만 20 μ l를 주사하였다(Ohkawa *et al.*, 1994). 누에의 성장은 시험구별로 압흔 20마리에 대한 유충의 생체중과 폐사정도 및 탈피상태 등을 24시간 간격으로 조사하였다. 단, 죽은 유충의 무게는 평균에 포함시키지 않았다.

4. 혈액채취 및 전기영동

4령 2일과 5령 3일의 누에유충에 바이러스를 주사하여 24시간 간격으로 채혈을 채취하였으며 채혈시는 시험관내에 소량의 phenylthiourea를 넣어 채혈의 melanosis를 방지하였다. 혈액의 SDS처리는 최종농도 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl buffer(pH6.8) 및 20% glycerol을 혼합하고, 100°C에 5분간 가열한 후 10,000g에서 5분간 원심한 상층액을 전기영동의 시료로 하였다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법에 준하여 12% acrylamide gel에 의한 slab 전기영동을 하였다. 영동이 끝난 gel은 coomassie brilliant blue로 염색한 후 methanol:glacial acetic acid: water(5:1:4)의 혼합액에서 탈색하였다.

결과 및 고찰

1. BmNPV T3와 BmEGTZ 감염 4령 유충의 성장비교

BmNPV의 *egt* 유전자가 누에 유충의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해, 4령 3일 유충에 BmNPV T3와 BmEGTZ를 각각 주사한 후 24시간 간격으로 암수별 체중변화와 폐사율을 조사하였다. 배양액만 주사한 대조구는 주사 후 1일째 마지막 잠에 들어가 1일간 일시적인 체중의 감소를 보였으나 주사 후 2일째 5령으로 탈피한 후 체중이 증가하였다. BmEGTZ를 주사한 유충은 2일째까지 대조구와 별다른 차이없이 체중이 감소하였으며 주사 후 1일째 모든 유충이 대조구와 동일하게 외형상 잠을 지는 형태는 관찰되었으나 완전히 탈피까지 이르는 유충은 발견되지 않았다. 결국 탈피는 하지 못하고 대부분 2일째부터 병징이 나타나다가 3일에서 4일째에 모두 폐사하였다. 이에 반해 BmNPV T3를 주사한 유충은 1일째부터 3일째까지 대조구나 BmEGTZ에 감염된 유충보다 체중이 증가하였으며 잠도 자지 않고 탈피도 하지 않았다. 또한 죽기 직전까지 계속 섭식활동을 하며 체중의 증가를 보였다. 2일째까지는 병징이 발견되지 않았으며 3일째부터 병징이 출현하여 4일째 대부분 폐사하

였으나 그중에는 4일째에도 생존하는 유충이 있었다.

폐사율을 보면, 주사 후 3일째에 BmEGTZ에 감염된 유충의 75%가 죽는데 반해 BmNPV T3의 경우는 한 마리도 죽지 않았으며, 4일째에는 BmEGTZ 감염구 모두 폐사했으나, BmNPV T3 감염구는 90%가 폐사했다. 이상의 폐사율의 결과는 암·수에서 모두 동일하였다. 결국 *egt*가 결여된 바이러스에 감염된 유충은 야생형에 비해 체중증가가 적고 폐사시간도 12시간이상 빠른 사실이 확인되었다(그림 1). 이상의 결과는 AcMNPV에 감염된 *Spodoptera frugiperda* (O'Reilly & Miller, 1989)와 *Trichoplusia ni*(Eldridge et al., 1992) 및 LdMNPV에 감염된 *Lymantria dispar* (Burand & Park, 1992) 등에서의 연구결과와 거의 일치하였다.

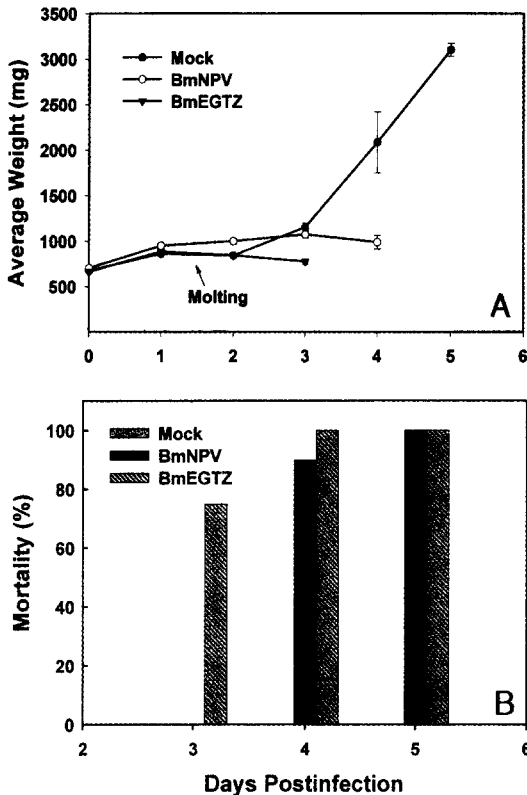


Fig. 1. Growth(A) and mortality(B) of *B. mori* infected with BmNPV T3 or BmEGTZ at the third day of the fourth instar larvae (female). Mock-infected larvae were injected with tissue culture fluid as control. Each symbol represents the changes of average weight of virus- and mock-infected larvae during the post-infection days. Error bars are equivalent to \pm one standard error.



Fig. 2. Features of *B. mori* larvae after injection with BmNPV T3(right) or BmEGTZ(middle) at the third day of the fourth instar larva. BmEGTZ-infected larva appears to enter the sleeping for the fourth ecdysis, while BmNPV T3-infected one continued to feed without sleeping gesture. Mock-infected larva(left) has completed the fourth larval ecdysis.

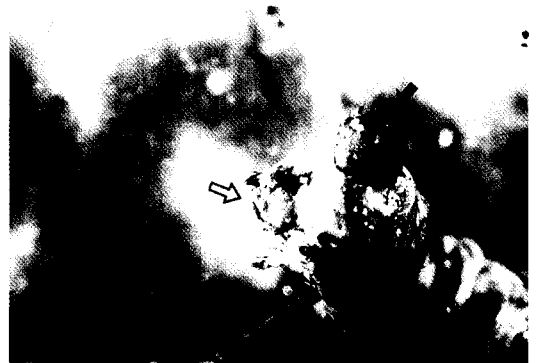


Fig. 3. Newly formed head cuticle(open arrow) in *B. mori* by injecting the BmEGTZ at the third day of the fourth instar larva. The old fourth instar larval head capsule(closed arrow) was taken off and put on the right side over the thorax.

2. BmNPV T3와 BmEGTZ 감염유충의 탈피 비교

이미 언급한 바와 같이 BmEGTZ에 감염된 유충은 대조구와 유사하게 외형적으로 잠에 들어간 형태를 보였으나(그림 2), 과연 내부적으로 탈피를 준비하고 있는지를 확인하기 위해, 주사한 후 2일째 유충의 머리부분과 피부를 해부하였다. 그 결과 4령의 머리부위에 5령의 새 큐티클층이 형성된 것을 관찰할 수 있었으며 피부도 구포피층내에 새로운 표피층이 형성되고 있음을 확인할 수 있었다(그림 3). 이것으로 보아 BmEGTZ를 주사한 유충은 탈피를 하기 위한 형태적 변화가 진행되고 있으나 바이러스의 감염으로 인해 최종 탈피까지는 이르지 못하는 것으로 확인되었다. 반면 야생의 BmNPV T3은 EGT 효소에 의한

혈액중의 ecdysteroid의 불활성으로 5령으로의 탈피가 저지되고 따라서 4령 섭식기간의 연장과 그에 따른 체중의 증가를 가져오는 것으로 나타났다.

3. 발육시기별 바이러스 감염에 의한 유충 성장 비교

유충의 발육시기별 바이러스 감염이 누에 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해, 전항에서의 4령 3일째 외에 4령유충 당일 및 5령유충 당일과 3일에 BmNPV T3와 BmEGTZ를 각각 주사하고 이후 유충생체중과 폐사율을 조사하였다.

4령 당일에 주사한 경우, 대조구는 정상적으로 체중이 증가하여 주사 후 5일째에 5령으로 탈피하였다. 그러나 4령 3일에 주사한 경우와는 달리, BmNPV T3와 BmEGTZ에 감염된 유충 모두 대조구에 비해 체중이 적게 증가하였다. 양 바이러스의 감염 결과를 비교하면 4령 3일의 감염시와 같이 BmEGTZ 감염유충의 체중증가가 BmNPV T3에 비해 적었으며 폐사율에 있어서도 4령 3일의 결과와 유사하게 나타나 BmEGTZ 감염 유충이 주사 후 4일째 30%, 5일째 모두 폐사한데 비해, BmNPV T3 감염유충은 4일째에는 폐사한 유충이 없었고, 5일째 모두 폐사하였다. 또한 BmEGTZ 감염 유충으로부터 잠에 들거나 탈피준비하는 징후를 보이지 않았다(그림 4A).

5령 당일 주사한 경우, BmNPV T3에 감염된 유충이 주사 후 3일째까지 대조구보다 체중이 더 무거웠던 점과 죽는 시간이 24시간 정도 지연된 점 이외에는 4령 당일 주사 경우와 거의 동일한 결과를 나타냈다. 이 경우에도 BmNPV T3에 비해 BmEGTZ 감염 유충의 체중증가가 역시 적었다. 폐사율은 주사 후 5일째에 BmEGTZ가 80%, BmNPV T3가 30%이고 6일째에는 양 바이러스에 감염된 유충 모두 폐사하였으나 전체적으로 BmEGTZ가 평균 12시간정도 빠르게 폐사하였다(그림 4B).

5령 3일 주사한 경우, 대조구와 BmEGTZ를 주사한 유충은 주사 후 3일째 토사를 개시하면서 체중의 급격한 감소를 보였으나 BmNPV T3 감염유충은 토사를 하지 않고 계속 섭식하며 체중이 증가하다가 5일째 병잠이 출현하면서부터 비로서 체중이 감소하였다(그림 5). 폐사율의 경우 주사후 5일째에 BmEGTZ가 100%인 반면 BmNPV T3는 10%로 역시 BmEGTZ 감염구가 일찍 폐사 하였으나 6일째에는 양 감염구 모두 폐사하였다(그림 4C). 야생형 BmNPV를 주사한 유충이 토사를 하지 않은 것은 4령 3일에 주사한 경우와 마찬가지로 바이러스 감염에 의한 ecdysteroid의 불활성화와 관계가 있는 것으로 생각되며, 반면 BmEGTZ에 감염된 유충이 대조구와 동일하게 토사를 하는 것은 *egt*

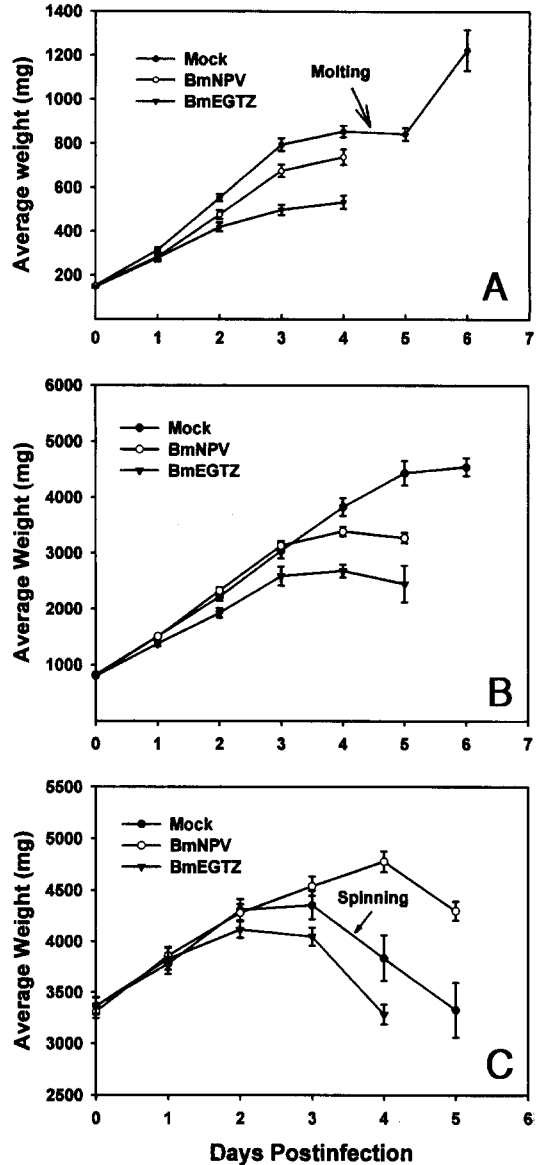


Fig. 4. Changes of average weights of *B. mori* larvae infected with BmNPV T3 or BmEGTZ at the day of the third larval ecdysis(A), the day of the fourth larval ecdysis(B) and the third day of the fifth instar larva(C). Error bars are equivalent to \pm one standard error.

유전자의 결여에 의한 ecdysteroid의 정상적인 기능수행에 의해 토사행위와 같은 변태과정이 진행되고 있음을 보여주는 결과라 하겠다(永田, 1998).

4. BmNPV T3와 BmEGTZ 감염유충의 체액단백질 변화



Fig. 5. Features of 7-day old *B. mori* larvae injected with BmNPV T3 or BmEGTZ at the third day of the fifth instar larvae. Mock-(left) and BmEGTZ-infected larva (middle) are beginning to spin, while BmNPV T3 larva (right) does not.

BmNPV T3와 BmEGTZ 바이러스를 5령 3일 유충에 각각 주사하고, 주사 후 24, 48, 72, 96, 120시간 간격으로 채액을 채취하여 SDS-PAGE 분석을 하였다. BmNPV T3와 BmEGTZ에 감염된 유충 모두 주사 후 48시간까지는 동일한 영동패턴을 나타내고 있으나 BmEGTZ의 경우 72시간째부터 새로운 밴드들이 나타나기 시작하고 특히 30-kDa 부근에 다각체 단백질이 출현하였다. 96시간째에는 새로운 밴드들의 수가 점차 증가하면서 다각체 단백질 밴드의 농도가 더욱 증가하였다. 반면 BmNPV T3 감염구는 72시간째까지 대조구와 별다른 차이를 보이지 않다가 96시간째에 BmEGTZ의 72시간째의 영동패턴과 유사하였으며 120시간째에는 BmEGTZ 감염구의 96시간째와 비슷한 영동패턴을 나타냈다(그림 6).

이러한 양 바이러스의 채액 단백질 변화양상은 4령 2일에 주사한 경우에도 거의 같은 경향을 나타냈다. 다만 폐사직전의 BmEGTZ 감염 유충채액중의 다각체 단백질 양이 같은 시기의 BmNPV T3 감염유충보다 적은 농도로 나타나, BmEGTZ 주사에 의한 유충의 조기폐사는 바이러스 증식이외의 다른 요인에 의해서도 작용받고 있음을 알 수 있었다(사진 생략).

바이러스 감염 후 나타나는 새로운 단백질 성분들의 출현이 바이러스의 유전정보에 의한 바이러스 특이 단백질인지, 바이러스 감염에 의한 혈액단백질의 붕괴에 의한 것인지 정확히는 알 수 없지만 영동패턴의 변화시점으로 보아 BmEGTZ가 BmNPV T3보다 바이러스의 숙주에 대한 병원작용이 빠르게 이루어지는 것만은 확실하였다.

이상과 같은 누에핵다각체병 바이러스의 *egt* 유전자의 결여에 의한 제반 병리학적인 현상은 다른 곤충

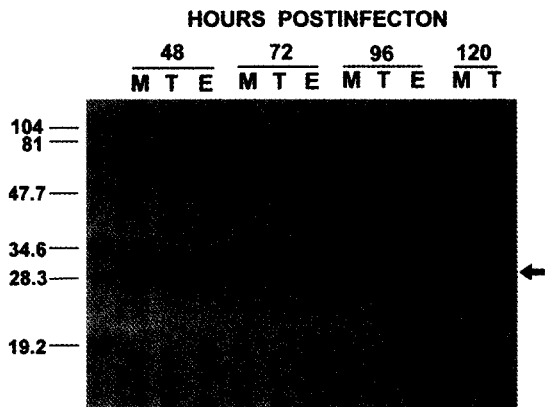


Fig. 6. SDS-PAGE profiles of hemolymph proteins of *B. mori* larvae injected with mock(M), BmNPV T3(T), or BmEGTZ(E) at the third day of the fifth instar. Hemolymphs were collected at 24, 48, 72, 96, and 120 hr after virus injection. The arrow indicates polyhedrin. Protein molecular masses in kilodaltons are shown at the left.

핵다각체병 바이러스의 경우와 거의 일치하고 있다 (O'Reilly & Miller, 1991; Eldridge *et al.*, 1992; Burand & Park, 1992). 바이러스의 진화적 관점에서 볼 때, *egt* 유전자가 결여된 NPV는 야생형 NPV의 조상으로 생각할 수 있는데, 숙주곤충의 ecdysone에 당을 부가시켜 호르몬 기능을 불활성화시킴으로써 숙주곤충의 탈피와 변태를 저해시키고 그 결과 숙주곤충의 섭식기간을 연장시킴으로써 결과적으로 바이러스 자신의 자손을 증가시킬 수 있도록 NPV의 진화과정 중 *egt* 유전자를 획득했을 것으로 추정하고 있다(O'Reilly & Miller, 1991). 그러나 BmNPV에 비해 BmEGTZ 감염시 나타나는 숙주곤충의 조기폐사의 원인 및 바이러스 감염과정에 대한 *egt* 유전자와 ecdysone의 상호관계 등에 대해서는 앞으로 계속 해명되어야 할 점이 많다(Keeley & Vinson, 1975). 바이러스 감염에 따른 *egt* 유전자의 ecdysteroid의 기능제어에 대한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 현재 수행중에 있다.

적 요

곤충 baculovirus의 *egt* 유전자는 숙주곤충의 ecdysteroid에 당을 부가시킴으로써 ecdysteroid 기능을 저해하여 유충의 탈피와 변태를 억제시킨다. 본 연구에서는 야생형 바이러스인 BmNPV T3와 *egt* 유전자의 기능이 제거된 mutant 바이러스 BmEGTZ를 누에의 4령과 5령 유충에 주사하여 각각의 성장에 미치는 영향을 비교하였다. 실험결과, *egt* 결여 바이러스 감

염유충은 야생형 바이러스 감염유충에 비해 체중의 증가가 적었고, 섭식활동을 조기에 중지하였으며 평균 12시간정도 빠르게 폐사하였다. 또한 BmEGTZ와 BmNPV T3 감염유충의 체액 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 다각체 단백질을 포함한 수종의 새로운 단백질들이 BmEGTZ 감염유충에서 12시간정도 빠르게 나타남을 확인하였다.

인용문헌

- Burand J. and E. Park (1992) Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and pupation of gypsy moth larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:171-175.
- Eldridge R., D. R. O'Reilly, B. D. Hammock and L. K. Miller (1992) Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1583-1591.
- Keeyley, L. L. and S. B. Vinson (1975) Beta-ecdysone effects on the development of nucleopolyhedrosis in *Heliothis* Spp. *J. Invertebr. Pathol.* **26**:121-123.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature(London)*. **227**:680-685.
- Maeda, S (1989) Gene transfer vectors of a baculovirus, *Bombyx mori*, and their use for expression of foreign genes in insect cells. In J. Mitsuhashi (ed.), *Invertebrate cell system applications*. CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 167-181.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato and M. Furusawa (1985) Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature(London)* **315**:592-594.
- 永田昌男·孫平江 (1998) 家蠶5齡幼蟲後期における核多角病ウイルスの増殖. *日蠶雜*, **67**:23-29.
- O'Reilly, D. R. (1995) Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**:475-485.
- O'Reilly, D. R. and L. K. Miller (1989) A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Science* **245**:1110-1112.
- O'Reilly, D. R. and L. K. Miller (1991) Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Biotechnology* **9**:1086-1089.
- Ohkawa, T., K. Majima and S. Maeda (1994) A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **68**:6619-6625.