

누에 핵다각체병 바이러스 gp64 유전자의 특성조사 및 transient 발현 벡터 개발

김미향 · 최재영 · 우수동 · 이해광 · 제연호*
서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부

Characterization of gp64 Gene of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus and Development of a Transient Expression Vector. Kim, Mi-Hyang, Jae-Young Choi, Soo-Dong Woo, Hae-Kwang Lee, and Yeon-Ho Je*. Graduate School of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea / Expression of the baculovirus major envelope glycoprotein gene (gp64) is regulated by transcription from both early and late promoters. To develop a transient expression vector under the control of gp64 gene promoter, the gp64 gene of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-K1 (BmNPV-K1) was characterized. The gp64 gene was localized at *EcoR* I-*Pst* I 7.38-kb fragment of the BmNPV-K1 genome. The *EcoR* I-*Pst* I 7.38-kb fragment was cloned and the nucleotide sequence of 2,277 bases including the coding region of gp64 gene was determined. Based on these results, transient expression vector using gp64 gene promoter was constructed and named as pBm64. *E. coli lacZ* gene was introduced into pBm64 as a reporter gene and expressed transiently in *B. mori* 5 (Bm5) cells. The expression vector transfected into the cells was maintained stably for 1 to 5 days. In order to confirm the expression of the reporter gene by gp64 promoter, recombinant virus was constructed. The recombinant virus has two independent transcription units in opposite orientations with two promoters; gp64 and polyhedrin gene promoters each initiating transcription of β -galactosidase and polyhedrin, respectively. Polyhedra formation and expression of β -galactosidase in Bm5 cells infected with the recombinant virus were observed with phase contrast microscope and *in situ* staining.

Key words: *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, immediate-early gene, gp64, transient expression vector

Baculovirus는 약 600여종의 곤충에서 분리, 보고되어 있으며, subgroup A에 속하는 핵다각체병 바이러스(nucleopolyhedrovirus: 이하 NPV)는 약 88-150 kb의 이중나선 구조의 DNA 게놈을 지닌 바이러스로 곤충 세포의 핵 내에서 증식한다. NPV는 감염 주기동안 구조적으로나 기능적으로 두 가지의 구별되는 바이러스 입자를 생성하는 특징을 가지고 있다[2]. 봉입체를 형성하는 바이러스(polyhedron-derived virus)의 입자는 핵 내에서 envelope를 만들고, 다각체(polyhedra)로 불리는 큰 모양의 봉입체에 순차적으로 둘러싸여진다. 반대로, budded virus(BV)는 출아(budding)의 형태로 세포막을 envelope로 획득하여 감염된 개체 내에서 세포 간의 감염을 전달하는 2차 감염원의 역할을 한다. BV의 주된 envelope glycoprotein인 gp64는 바이러스에 의해 코딩되며 바이러스가 숙주 곤충 세포 내로 endocytosis하는데 필수적이다[18]. 대부분의 baculovirus 구조 단백질은 late gene으로 발현하지만, gp64 유전자는 early promoter와 late promoter를 둘 다 가지고 있어 발현이 조절된다[1,19].

Baculovirus early gene은 immediate-early와 delayed-early gene으로 나뉘는데, immediate-early gene은 바이러스가 세포에 감염되면 바이러스의 다른 발현산물에 의존하지 않고 즉시 전사되며, delayed-early gene은 세포 내의 바이러스 유전자 발현이 시작된 직후부터 전사된다[6].

Immediate-early gene은 비감수성 곤충 세포에서도 전사를 수행할 수 있는 유전자라는 것이 transient 발현 검정을 통한 실험으로 확인되었다[6,8]. 반면, delayed-early gene은 다른 바이러스 유전자 산물이 없는 비감염 세포에서는 활성이 없는 것으로 알려져 있다. 그러나, 비감염 곤충 세포주에서 prototype의 delayed-early 프로모터(*Autographa californica* NPV, p39)가 전사 활성을 가지는 것으로 알려지면서 immediate-early와 delayed-early의 구분이 어려워지고 있다[16].

Immediate-early gene에는 *ie-1*, gp64 등이 있으며, 이들의 프로모터를 이용한 transient 발현 벡터는 미지 유전자의 발현 산물을 신속히 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 세포 내에서 불안정한 단백질의 발현 또는 세포에 독성을 가지는 단백질의 발현 그리고 형질전환 세포주의 제작 등에 이용할 수 있는 장점이 있으며, 다각체 단백질 또는 p10 유전자의 프로모터를 이용한 baculovirus 발현 벡터계에서 표지 유전자의 발현에 이용함으로써 재조합 바이러스의 신속한 분리에 이용할 수도 있다[17]. 현재 이러한 transient 발

*Corresponding author
Tel. 82-31-290-2492, Fax. 82-31-296-0926
E-mail: kskipl@plaza.snu.ac.kr

현 벡터계로는 AcNPV의 *ie-1* 프로모터를 이용한 발현 벡터가 제작되어 그 가능성을 확인해주고 있다[5]. 따라서 본 연구에서는 gp64 early transcript와 gp64 단백질이 DNA 증식 직전의 감염된 세포 내에 존재하는 것을 토대로[1,4] gp64 유전자의 프로모터를 이용한 새로운 transient 발현 벡터를 개발하고자 국내에서 분리된 BmNPV-K1의 gp64 유전자 특성을 조사하고 외래 유전자로써 *E. coli lacZ* 유전자를 발현 벡터에 삽입하여 누에 세포주에서의 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

곤충세포주 및 바이러스

본 실험에서 이용된 Bm5 세포주는 Dr. P. V. Choudary (University of California, Davis, USA)가 제공하였으며, Summers 등[15]의 방법에 따라 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)이 함유된 TC-100(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 곤충세포 배양액으로 27°C에서 배양하였다. BmNPV-K1[7]은 국내 양잠 농가에서 분리된 것으로 곤충 세포주에서 증식시켜 이용하였고, 재조합 바이러스인 BmP64-LacZ도 세포주에서 증식시켜 실험에 이용하였다.

바이러스 DNA 분리

바이러스 DNA 분리는 Smith와 Summers[12]의 방법에 따라서 정제된 다각체를 알칼리용액(0.1 M NaCO₃, 0.17 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 10.9)에 부유시키고, SDS를 1%, proteinase K(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 0.5 mg/ml가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 4시간 이상 처리하였다. 그 후 phenol/chloroform 방법으로 정제하고 냉에탄올로 DNA 침전을 얻어 3차 증류수에 녹여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Southern blotting 분석

Southern blotting[13]에 사용된 탐침은 AcNPV의 gp64 유전자 약 1.0 kb 단편[9]을 DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim Co., Germany)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 labeling하여 이용하였다. Southern blotting은 바이러스의 DNA에 여러가지 제한효소를 처리하고 전기영동한 gel을 상온에서 denaturation용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)으로 15분간 침지하여 DNA를 변성시킨 후, neutralization 용액(1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.4)으로 15분간 중화시켰다. 중화시킨 gel은 20XSSC 용액(3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)으로 nylon membrane 위로 capillary transfer 시킨 후, UV cross-linker(Amersharm, USA)에서 3분간 처리하여 고정시켰다. 이와 같이 처리된 membrane을 DIG labeling된 탐침으로 hybridization 반응시킨 후, DIG Luminescent Detection Kit(Boehringer Mannheim Co., Germany)

를 이용하여 그 결과를 조사하였다.

BmNPV-K1 gp64 유전자의 염기서열 분석

BmNPV-K1의 gp64 유전자 염기서열 구조를 분석하기 위해 클로닝한 약 7.38 kb 단편에 대해서 여러가지 제한효소를 처리에 의해 다시 부클로닝(subcloning)한 후, 약 2.28 kb를 분석하였다. DNA 염기서열은 자동 염기서열 분석장치(Automated nucleotide sequencer)를 이용하여 분석하였다. 염기서열 분석을 위한 시료는 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction(PE Applied Biosystems, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 제작하였으며, 제작된 시료는 ABI PRISM Model 377 Sequencer(PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 gel 상에서 전개시킨 후, ABI 100 소프트웨어를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

Transient 발현 벡터 제작 및 재조합 바이러스 제작

플라스미드 조작은 일반적인 조작 방법에 따라 수행하였다[11]. Transient 발현 벡터 제작을 위해 gp64 프로모터를 포함한 5' 비전사 영역과 SV40 small T antigen 부분의 poly(A) tail을 가진 벡터를 제작하였다. gp64 프로모터를 포함한 5' 비전사 영역의 클로닝은 pBmEP 플라스미드 DNA를 template로 -486에서 -464에 해당하는 forward primer 5'-GGTACCGAACGTAATATTCTTTAGGACG-3'와 -23에서 +1에 해당하는 backward primer 5'-CTCGAGTCTCGCTTGTTGTTTCTTATC-3'를 이용하여 PCR을 수행한 후, PCR 산물을 pGemT-easy 벡터(Promega, USA)에 클로닝하였다. 클로닝된 PCR산물과 SV40 small T antigen 부분의 poly(A) tail을 가진 pBIKSpolyA에 *Kpn* I과 *Xho* I을 처리하여 gp64 프로모터 하에 poly(A) tail을 결합시켜 pBm64 transient 발현 벡터를 제작하였다. 외래 유전자로써 *E. coli lacZ* 유전자의 발현을 위해서는 pBm64 벡터에 *Hind* III와 *EcoR* V를 처리하고 pBmKSK3-LacZ에 *Hind* III와 *Sma* I을 처리하여 얻은 *lacZ* 유전자를 연결시켜 pBm64-LacZ 발현벡터를 제작하였다. 또한 gp64 프로모터에 의한 *E. coli lacZ* 유전자의 안정적인 발현을 조사하기 위한 재조합 바이러스의 제작은 다각체 단백질 유전자 위치에 gp64 프로모터 하의 *lacZ* 유전자와 다각체 단백질 프로모터 하의 다각체 단백질 유전자가 발현되는 이중 발현 벡터 구조를 가지는 pBmP64-LacZ 전이 벡터와 바이러스 genome DNA를 cotransfection시켜 재조합 바이러스를 제작하였다(Fig. 6). 전이 벡터 pBmP64-LacZ는 pBmP-F[20]와 pBmocc-LacZ에 *Dra* II, *Hind* III를 처리하여 다각체 단백질의 프로모터와 구조유전자 부분을 다각체 단백질 유전자 5' flanking region과 3' flanking region사이에 삽입시켜 제작한 벡터 pBmP-O에 *Dra* II, *Klenow*, *Spe* I을 처리하여 다각체 단백질 프로모터와 반대방향으로, pBm64-LacZ에 *Xho* I, *Hind* III, *Klenow*를 처리하여 self-ligation을 시키고 *Sal*

I, *Xba* I을 처리하여 pBluescriptIIKS에 클로닝한 pBm64-LacZ(-)에 *Xho* I, Klenow, *Xba* I을 처리하여 얻은 gp64 프로모터와 *lacZ* 유전자를 삽입하였다.

End-point 희석에 의한 바이러스 분리

재조합 바이러스를 분리하기 위하여 전이벡터와 BmNPV-K1 DNA를 cotransfection 시킨 후 5일 경과된 세포의 배양액을 10⁻⁶~10⁻⁷으로 희석하고, 96 well plate에 각 well 당 1.0 × 10⁴ 세포개의 농도로 분주된 배양세포에 각 희석액을 접종하고 27°C에서 배양하였다. 접종 후 4일부터 세포 내 다각체 형성 및 β-galactosidase의 발현 여부를 도립현미경과 X-gal 처리에 의한 *in situ* staining방법으로 관찰하였다. 동일한 방법으로 3회 이상의 순화과정을 거쳐 재조합 바이러스를 선별하였다.

Dot-blotting 분석

Dot-blotting을 위해 사용한 탐침은 pBm64-LacZ 플라스미드 DNA를 DIG DNA Labeling Kit(Boheringer Mannheim Co.)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 labeling하여 이용하였다. 발현벡터 pBm64-LacZ 10 μg를 Bm5 세포주에 transfection 시키고 1일 후부터 5일 후까지 감염 세포를 수거하여 전체 DNA를 추출하여 nylon membrane에 떨어트려 건조시킨 후, UV cross-linker(Amersharm)에서 3분간 처리하여 고정시켰다. 이와 같이 처리된 membrane을 DIG labeling된 탐침으로 hybridization 반응시킨 후, DIG Luminescent Detection Kit(Boheringer Mannheim Co.)를 이용하여 그 결과를 조사하였다. 양성 대조구로는 pBm64-LacZ 플라스미드 DNA 10 μg를 이용하였으며, 음성 대조구로는 mock-infected 세포주를 이용하였다.

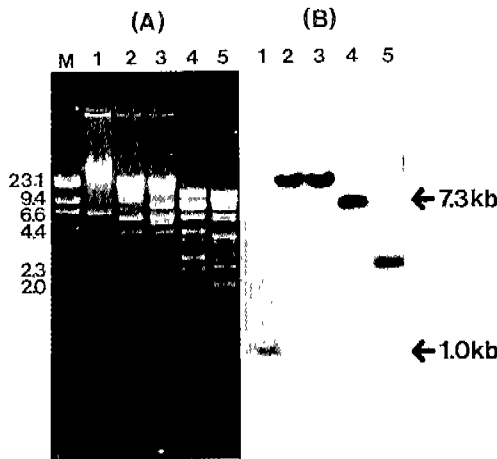


Fig. 1. Southern bolt analysis of the gp64 gene of BmNPV-K1. BmNPV-K1 DNA was completely digested with various restriction endonuclease and electrophoresed on a 0.8% agarose gel (A). The DNAs were hybridized with labeled AcNPV gp64 partial 1.0-kb fragment (B). Lane: M, Lambda DNA digested with *Hind* III; 1, *Bam* H I; 2, *Eco*R I; 3, *Pst* I; 4, *Eco*R I+*Pst* I; 5, *Sal* I.

β-Galactosidase의 in situ staining 검정

β-Galactosidase의 발현 여부를 조사하기 위하여 *in situ* staining 방법[10]에 따라 세포를 염색하였다. 재조합 바이러스 감염이 5일된 세포를 회수하여 PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) 완충액으로 3회 세척하고 0.25% glutaraldehyde용액(0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM MgCl₂)으로 15분간 세포를 고정시킨 후, X-gal 용액(0.2% X-gal, 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 3.3 mM K₄Fe(CN)₆ 3H₂O, 3.3 mM K₄Fe(CN)₆)을 더하여 37°C에서 30분 이상 처리하고, 70% glycerol 막을 형성시켜 도립현미경 하에서 염색여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

BmNPV-K1 gp64 유전자의 위치 탐색 및 제한효소 지도

국내에서 분리된 BmNPV-K1 gp64 유전자의 구조를 분석하기 위해 바이러스 genome DNA를 여러가지 제한효소로 처리한 후, AcNPV의 gp64 약 1.0 kb의 단편[9]을 탐침으로 Southern blotting을 수행한 결과, *Bam*H I으로 처리한 경우에 탐침과 비슷한 크기의 약 1.0 kb의 위치에서, *Eco*R I과 *Pst* I를 동시에 처리한 경우에는 약 7.3kb의 위치에 반응이 나왔다(Fig. 1). *Eco*R I-*Pst* I 7.38 kb 단편을 pBluescript IIKS 벡터에 클로닝하여 pBmEP로 명명하였으며, 제한효소 지도를 작성하였다(Fig. 2). BmNPV T3[14]의 *Eco*R I-*Pst* I 7.38 kb 단편과 제한효소 지도를 비교해 본 결과 BmNPV T3의 7.38kb에는 존재하지 않는 *Hind* III, *Nco* I, *Bam*H I,

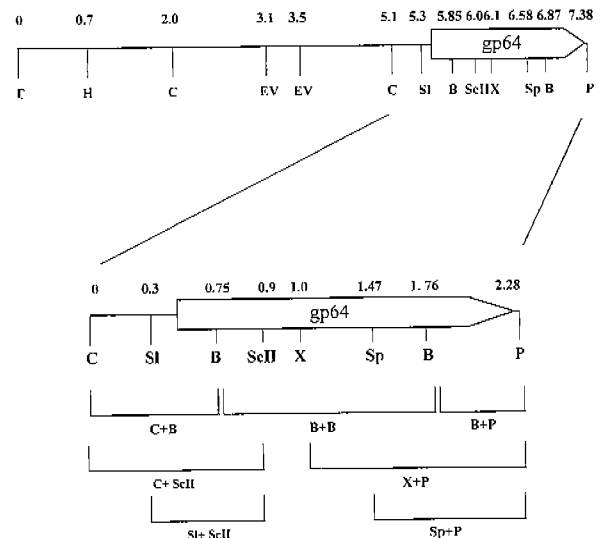


Fig. 2. Restriction endonuclease map of 7.38-kb fragment containing gp64, and strategy for sequencing of 2.28-kb fragment containing gp64 coding gene. Restriction endonuclease sites: B, *Bam* H I; C, *Cla* I; P, *Pst* I; ScII, *Sac* II; S1, *Sal* I; Sp, *Sph* I; Sp, *Sph* I; X, *Xho* I.

Bgl II등을 가지고 있었으며, 또한 *Xba* I, *Xho* I등은 BmNPV-K1의 7.38 kb에는 존재하지 않았다. 이런 차이점을 확인, 비교하기 위해 pBmEP에 여러 제한효소를 처리하여 부클로닝을 하였으며, gp64구조 유전자를 포함하는 2.28 kb의 염기서열을 분석하였다.

BmNPV-K1 gp64 유전자의 염기서열 및 아미노산 분석
BmNPV-K1의 gp64구조 유전자를 포함한 약 2.28 kb의 염기서열을 분석하여 기존에 보고된 BmNPV T3의 gp64 염기서열과 비교, 분석한 결과, 전체 2,277 bases에서 약

91.22%의 상동성을 가졌으며, gp64 구조 유전자에 해당하는 1,092 bases에서는 약 93.77%의 상동성을 나타냈다 (Fig. 3). 염기서열을 토대로 아미노산 서열에서는 총 364개 중 29개의 아미노산이 BmNPV T3와 상이하여 92%의 상동성을 나타냈다.

Early 프로모터를 조절하는 인자에는 TATA element (TATATAA)와 early 유전자의 전사를 시작하는 initiator motif(CAGT)가 알려져 있다[1]. gp64 유전자 프로모터는 early와 late 프로모터를 모두 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 분석한 BmNPV-K1의 gp64 염기서열에도 early

BmK1	ATCGATTAA GGGTGAATA CICTTAGGA CGCITTTAT CATTTAAAT GTAATTGAC AGATATTAA	70
BmT3	*****AAC***** T***** *T***** *C***** *****	70
BmK1	ATAAACAAA CACATGAATA TAATTTTAT TGTTTTAT CAATTTCGC GAGGGCCCG CGTTCGTCA	140
BmT3	***** i***** ***** ***** *T***** *****	140
	-337	
BmK1	CACGGCCCAA CTGCCGTTGC <u>TAAGAA</u> MGG TGACATGAC TTGCGCGCG CGGTTAGTTC CAAGATAGCC	210
BmT3	*****T***** *C***** *T***** *****T***** ***** *A*****	209
BmK1	ATCGTGAATG CGTCCGAAT TGG1AATGAT GACCACTCC AGACTGCTGT CGGGAGAGTA CATGAAGTTG	280
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** *****	279
BmK1	CGCGTGTTCG ATGTCGACTG AGCGTCCGTC TTCATGATCC GCTTTTCATA ACAGCCGAGT AAAAAATATC	350
BmT3	T***** ***** C*****T***** *****A***** *****	349
	-139 -136 -126 -109	
BmK1	TTATCAATTA <u>AGATA</u> AAAAG <u>ATAAG</u> ATTAT TAATCTAACA <u>ACGGT</u> GCCTG IGTCAGC1AG GCCAGATAAC	420
BmT3	***** ***** *GA***** *T***** ***** ***** *****A*****G	417
	-70 -66 -39	
BmK1	GGTCGGGTAT <u>ATAAG</u> ATGCC TCAAIIGCIAC 1AGTAAATCA <u>GTC</u> ACACCAA GGCCTCAATA AGGAACACAC	490
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** *T***** *****G*****	487
	+1	
BmK1	AAGCAAGATG GTAAGCGCTA TTGTTTATA TGTGCTTTC CGGCGCGCG CGCATTCTGC CTTTCCGCGC	560
BmT3	*G***** ***** C***** ***** ***** ***** *****	554
	M V S A I V L Y V L L A A A A H S A F A A	
BmK1	GAGCACTGCA ACGCGCAAT GAAGACGGGT CCGTACAPGA TTRAAACTT GGCAATTACC CGGCCAAGG	630
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	624
	E H C N A Q M K T G P Y K I K N L D I T P P K	
BmK1	AAACGCTGCA AAAGCACGTG GAAATCACCA TCGTGGAGAC GGAATTACAA GAARACG*GA TTATCGGCTA	700
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	694
	E T L Q K D V E I T I V E T D Y N E N V I I C Y	
BmK1	CAAGGGGTAC TACCAGCGGT ATCCCTACAA CGGCGGCTCG CTGGATCCCA ACACACGGGT CGAGAAACC	770
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	764
	K G Y Y O A Y A Y N G G S I P N T R V E E T	
BmK1	ATGAAAACGC TGAATGTGG CAAGAGGAT TTGCTCATGT GGAACATCAG GCAGCASTGC GAGGTGGCG	840
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	834
	M K T L N V G K E D F L M W T I R Q Q C E V G	
BmK1	AAGAGCTGAT CGACCGTTGG GGCAGTGACA GCGACGACTG TTTTCGGCAC AACAGGGGC CGGGCCAGTG	910
BmT3	*****T***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	904
	E E L I D R W G S D S D C F R D N E G R G Q W	
BmK1	GGTCAARGGC AAAGAGTTGG TGAAGCGGCA GAATACACAT CACTTTGTGC ACCACACGTC CAAGAAATCG	980
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	974
	V K G K E L V K R Q N N N H F A H H T C N K S	
BmK1	TGGCGATGCG GCATTTCCAC TTCGAAATG TACACGAGCC TCGACTGCCA GGACGACAGC GAGGAATGCC	1050
BmT3	***** *G***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1044
	W R C G I S T S K M Y S R L E C Q D D T D E C	
BmK1	AGG*ATACAT TTTGGACGCT GAGGGCAACC CCATCAACGT GACCGTGGAC AC1GTGCTTC ATCGAGACGG	1120
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1114
	Q V Y I L D A E G N P I N V T V D T V L I R D G	
BmK1	CGTGAGIATG ATTCTCAAAC AAAGTCTTAC GTTCACGACG CGCRAATTA AAGCTGCTGT TCTGCTCAT	1190
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1184
	V S M I L K Q K S T F T T R Q I K A A C L L I	
BmK1	AAAGATGACA AAAATAACCC CGAGTCGGTG ACACGGGARC ACGT*TAGAT TCGAATGAT ATCAATGATC	1260
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1254
	K D D K N N P E S V T R E H C L I D N D I Y D	
BmK1	TTTC*AAAA CACGTGGAAC TCGAAGTTTA ACAGATGCAT TAAACGCAA GTCGAGCACC GAGTGAAGAA	1330
BmT3	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1324
	L S K N T W N C K F N R C I K R K V E F R V K K	

Fig. 3. Comparison of BmNPV-K1 (BMK1) and BmNPV (BmT3) gp4 gene sequences. Deduced amino acid sequences are for the BMMPV-K1 gp64 protein. Underlines (—) indicate residues missing in the corresponding nucleotide sequence and asterisks(*) indicate identical sequence. The first nucleotide of the initiator ATG codon has been designated +1. Late promoter core sequences (TAAG) are underlined, and sequences associated with early transcription are shown in bold.

BmK1	GCGCGCGGCC	ACTTGGCGCC	ACAACGTTAG	AGCCRASTAC	ACAGHGGGAG	ACACTGCCAC	CCRAGGGAC	1400
BmT3	A*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1394
	R P P	T W R	H N V	R A K	Y T E	G D T	A T K	G D
BmK1	TTGATGCATA	TTCAAGAGGA	GCTGATGTAC	GAAAACGATF	TGCTGAAAT	GAACAT1GAG	CTGATGCATG	1470
BmT3	C*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1464
	L M H	X O E	E L M	Y E N	D L L	K M N	1 E L	M H
BmK1	CGCACATCAA	CARGCTAAAC	PATATGCTGC	ACGACCTGAT	AGTCTCCGTG	GCCAAOCTGG	ACGACCTGTT	1540
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1534
	A H I	N K L	N N M	L H D	L I V	S V A	K V D	F R L
BmK1	GATTGGCAAT	CTGATGAACA	ACTCTGTTTC	TTCAACATTT	TTGTCGGAGC	ACACGTITTT	GCTGATGCUC	1610
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1604
	I G N	L M N	N S V	S S T	F L S	D D T	F L L	M P
BmK1	TGCACCAATC	CGCGGGCACA	CACCAGTAAT	TGCTACAACA	ACAGCATCTA	CARAGARGGG	CGTTGGGTGG	1680
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1674
	C T N	F P A	H T S	N C Y	N N S	I Y K	E G R	W V
BmK1	CCACACGGGA	CTCGTCGCA	TCCATAGATT	TTAGCAACTA	CAAGGAACTA	GCAATTGACG	ACGACCTCGA	1750
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1744
	A N T	D S S	Q C I	D F S	N Y K	E L A	F D D	D V E
BmK1	GTTTTGGATC	CCGACCTCG	GCAACAGGAC	CTATCACGAC	AGTTGGAAG	ATGCCAGCGG	CTGTCGTTT	1820
BmT3	A*****T	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1814
	F W I	P T I	G N T	T Y H	D S W	K D A	S G W	S F
BmK1	ATTGCCAAC	AAAAAGCAA	CCTCATACC	ACCATGGAAA	ACACCAAGT	TGCGGGCGTC	GGCACCAGTC	1890
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1884
	I A Q	Q K S	N L I	T T M	E N T	K F G	V G	T S
BmK1	TGAGCGACAT	CACTTCCATG	GCTGAGGGG	AATTGGCCGC	TAAATTGACT	TCGTTGATG	TTGTCATGT	1960
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	1954
	L S D	I T S	M A E	G E L	A A K	L T S	F M F	G K V
BmK1	AGTTAACTTT	GTAATTATAT	TAATTGTGAT	TITATTTTTC	TACTGTATGA	TTAGAAACCG	TAATAG---	2027
BmT3	**CC*CT*	*****G**	*****A**	*****G*	*****G*	*****G*	*****TAG*	2074
	V N F	V T I	L I V	I L F	L Y C	M I R	N R N	R
BmK1	CAATATTAAA	TGTAATAATA	AAAATTGTAT	CATTATTAAI	GTAATAATAA	AAAATTGTAT	AGTTTTTAT	2097
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	2091
	Q Y							
BmK1	TGTTATATTAT	AAAATAAAAT	TTTTAAAAT	ACAAAGTTTT	TTAATATCTC	AGCGGAGACT	TGAACACACA	2167
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	2122
BmK1	ATTCTAGCAA	GATCTATACG	ATCCAGAGCG	CTACGCTCTA	CCTTGAGCTA	CTGAGACGAT	ATGATTATGT	2237
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***	2133
BmK1	TCCAARTAGC	GAGTGTGTTG	AGATTAAATA	ATGACTGCAG				2277
BmT3	*****A***	*****A***	*****A***	*****A***				2166

유전자의 initiator motif인 CAGT(-39)와 -70 위치에 TATA element가 있어 gp64 유전자의 전사 조절 인자를 확인 할 수 있었고, 숙주 전사 인자에 반응하는 것으로 알려진 upstream activating region element(GATA, CAACGTG)도 존재하였다. 또한 late 프로모터를 조절하는 인자에는 TAAG가 알려져 있는데 [1], gp64의 late 프로모터를 조절하는 4개의 인자(-66, -126, -139, -337)도 확인할 수 있었다.

Transient 발현 벡터 제작과 dot-blotting

BmNPV-K1의 gp64 프로모터를 이용한 transient 발현 벡터를 제작하기 위해 gp64 프로모터 하에 외래 유전자의 삽입을 위한 다중 클로닝 위치(multi-cloning sites)와 전사 종료를 위해 SV40 small T antigen 부분의 poly(A) tail을 가진 벡터를 제작하고 pBm64로 명명하였다(Fig. 4). Transient 발현 벡터의 발현성을 확인하기 위해 *E. coli lacZ* 유전자를 클로닝하여 pBm64-LacZ를 제작하고 Bm5 세포주에 transfection시켰다. Transfection 5일 후에 *in situ* staining검정을 하여 *lacZ*의 발현여부를 확인하고자 하였으나 발현을 확인할 수가 없었다(자료 미제시). 이는 *lacZ*의 발현을 확인할 수 없을 정도로 gp64 프로모터의 발현 능력이 매우 약하거나 세포주 내로 유입되는 플라스미드의 안정성에 문제가 있는 것으로 유추되었다. 따라서 먼저 플라스미

드의 안정성을 확인하기 위하여 발현 벡터를 포함한 플라스미드를 transfection시킨 후 그 안정성을 dot-blotting으로 확인하였다. 그 결과, transfection후 1일 쯤부터 세포주에서 플라스미드의 안정성을 관찰 할 수 있었고, 5일째까지도 그 안정성을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 gp64 transient 발현 벡터에 의한 *lacZ* 유전자의 발현을 확인할 수 없었던 결과는 플라스미드의 안정성과는 무관할 것으로 판단되었다.

BmNPV-K1 gp64 프로모터의 발현성 검증

세포 내에서 플라스미드 DNA의 안정적인 존재가 확인됨에 따라 제작되어진 벡터 내에서 gp64 프로모터의 외래 유전자 발현성 여부를 조사하기 위하여 gp64 프로모터 하에 *lacZ* 유전자를 가지는 재조합 바이러스를 제작하였다(Fig. 1). 다각체 단백질 유전자 위치에 gp64 프로모터 하에서 *lacZ* 유전자가 발현되도록 하고, 반대 방향으로 다각체 단백질 유전자 프로모터 하에서 다각체 단백질 유전자가 발현되는 재조합 바이러스를 제작하고 BmP64-LacZ로 명명하였다. 재조합 바이러스의 *lacZ* 발현 여부를 확인하기 위해 Bm5 세포주에 BmP64-LacZ를 10 MOI로 접종하고 β -galactosidase *in situ* staining을 수행하였다(Fig. 7). 모 바이러스인 BmNPV-K1과 비교하였을 때 β -galactosidase의 점종

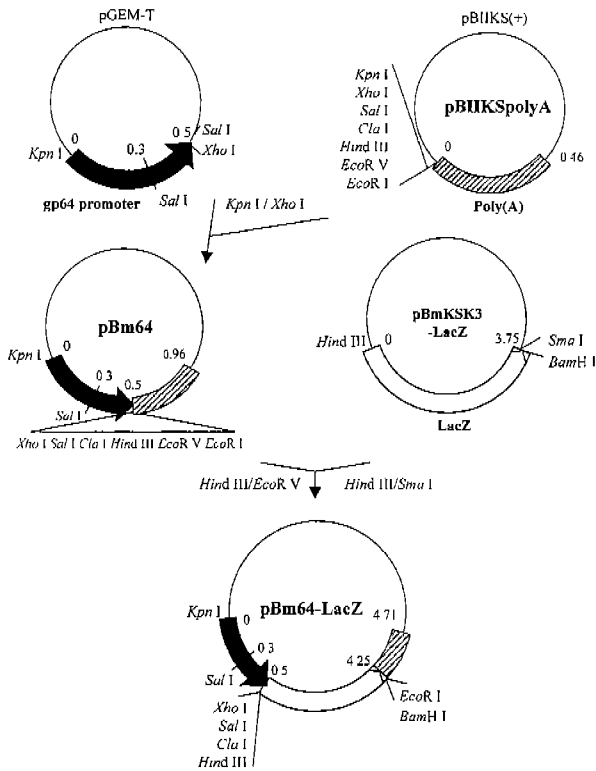


Fig. 4. Schematic diagram of the transient expression vector with BmNPV-K1 gp64 promoter.

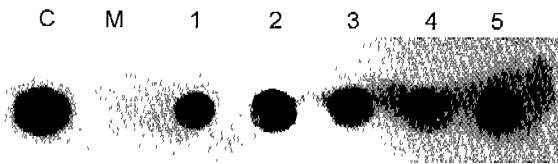


Fig. 5. Dot-blot analysis of pBm64-LacZ plasmid DNA in Bm5 cells. Bm5 cells were transfected with 10 µg of pBm64-LacZ plasmid DNA. Whole DNAs from cells were extracted and hybridized with labeled pBm64-LacZ plasmid DNA to determine the stability of plasmid in cells. C, 10 µg of pBm64-LacZ (positive control); M, mock-infected Bm5 cell; 1, 1 day post-transfection; 2, 2 days post-transfection; 3, 3 days post-transfection; 4, 4 days post-transfection; 5, 5 days post-transfection.

후 5일에 발현을 관찰할 수 있었으나 전체적인 발현량은 매우 약한 것으로 판단되었다.

이러한 결과는 본 연구에서 제작된 gp64 프로모터에 의해 lacZ 유전자의 발현이 가능하고 벡터의 구조에 있어서도 이상이 없음을 지적해 주고 있다. Blissard 등[3]은 gp64 프로모터는 바이러스의 다른 발현 산물에 의존하지 않고 감염 직후 세포 내에서 early 프로모터에 의해 전사가 가능하며 또한 감염 후기에는 late 프로모터에 의해 전사가 계속적으로 진행된다고 보고하였다. 따라서, 본 연구 결과 제작되어진 gp64 transient 발현 벡터에 의한 lacZ 유전자의 발현 역시 세포 내로 유입된 플라스미드 DNA의 안정

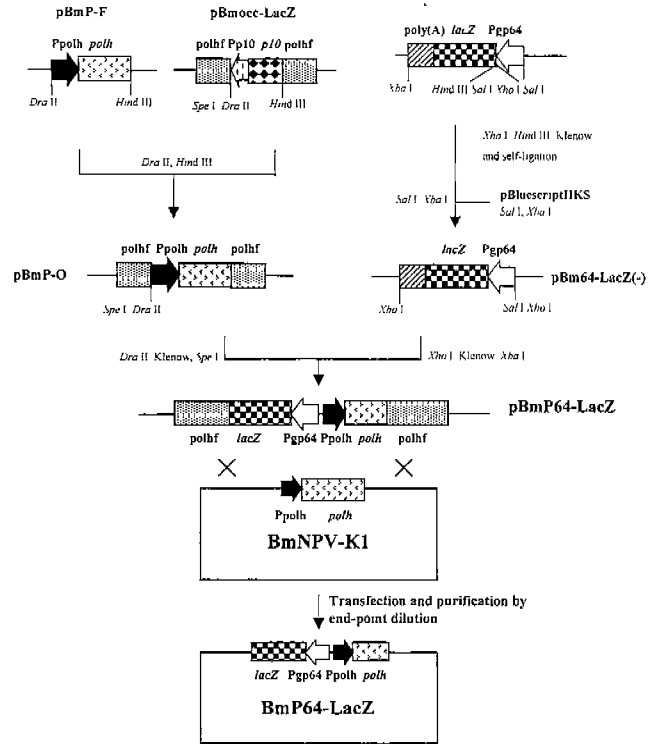


Fig. 6. Schematic diagram for the construction of recombinant virus BmP64-LacZ. Transfer vector pBmP64-LacZ was cotransfected with genomic DNA of wild-type BmNPV-K1 virus.

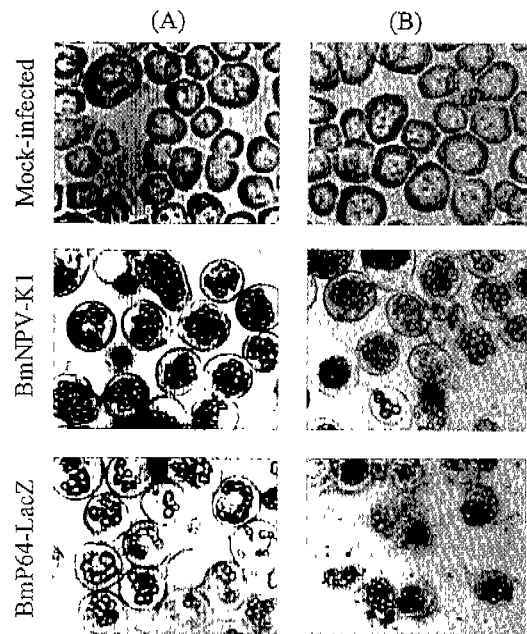


Fig. 7. Phase-contrast micrographs (A) and *in situ* β-galactosidase staining (B) of Bm5 cells infected with wild-type BmNPV-K1 and recombinant virus BmP64-LacZ.

성이나 프로모터 구조에는 이상이 없는 것으로 확인됨에 따라, 발현은 이루어지나 early 프로모터만의 발현으로 인해

매우 약하게 발현된 것으로 추정된다.

그러므로 이러한 특성을 가진 gp64 프로모터를 이용한 벡터는 lacZ 보다 더욱 민감한 표지 유전자를 발현시켜 재조합 바이러스의 분리에 이용하거나 또는 숙주세포에 독성을 보이는 유전자 산물의 소량 발현에 더욱 유용할 것으로 판단된다.

요 약

누에 핵다각체병 바이러스의 gp64 프로모터를 이용한 transient 발현 벡터를 제작하기 위해서 gp64 유전자의 구조를 분석하였다. Southern blotting 분석을 통해 genome DNA 에서 gp64 유전자를 탐색하고 gp64 구조유전자를 포함하는 2,277 nucleotide의 염기를 분석하였으며 gp64의 early, late 프로모터 발현을 조절하는 인자들을 확인하였다. gp64 프로모터를 이용한 transient 발현 벡터를 제작하고 외래유전자로서 lacZ 유전자를 Bm5 세포주에서 transient 발현시켰다. 세포주 내에 도입된 플라스미드 DNA의 안정성을 확인하였으며, gp64 프로모터의 외래유전자 발현성 여부를 조사하기 위하여 gp64 프로모터 하에 lacZ 유전자를 가지는 재조합 바이러스를 제작하고 β -galactosidase *in situ* staining을 수행한 결과 전체적인 발현량은 매우 약한 것으로 판단되었다. BmNPV-K1의 gp64 프로모터를 이용한 벡터는 더욱 민감한 표지 유전자를 발현시켜 재조합 바이러스의 분리에 이용하거나 숙주세포에 독성을 보이는 유전자 산물의 소량 발현에 더욱 유용할 것으로 판단된다.

감사의 말

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

REFERENCES

- Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann. 1989. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orygia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **170**: 537-555.
- Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* **35**: 127-155.
- Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann. 1991. Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *J. Virol.* **65**: 5820-5827.
- Bradford, M. E., G. W. Blissard, and G. F. Rohrmann. 1990. Characterization of the infection cycle of *Orygia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus in *Lymantria dispar* cells. *J. Gen. Virol.* **71**: 2841-2846.
- David, D. C., D. S. Max., and L. A. Guarino. 1991. Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis

- virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J. Virol.* **65**: 945-951.
- Guarino, L. A., and M. D. Summers. 1986. Functional mapping of a *trans*-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.* **57**: 563-571.
- Hong, H. K., S. D. Woo, J. Y. Choi, H. K. Lee, Y. H. Je, and S. K. Kang. 2000. Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Arch. Virol.* **145**: 2351-2361.
- Nissen, M. S., and P. D. Friesen. 1989. Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J. Virol.* **63**: 493-503.
- Martin, D. A., S. C. Howard., J. Kuzio., M. Lopez-Ferber, and R. D. Possec. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**: 586-605.
- 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.
- Sambrook, J., E. F. Fritsh, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Smith, G. E., M. D. Summers., and M. J. Fraser. 1983. Production of human 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.
- Sumiko, G., M. Kci, and S. Maeda. 1999. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **80**: 1323-1337.
- 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.
- Theilmann, D. A., and S. Stewart. 1991. Identification and characterization of the IE-1 gene of *Orygia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **180**: 492-508.
- Um, W. S., J. W. Yang, S. K. Kang, I. S. Chung, T. Y. Yoon, and J. M. Yang. 1993. Transient expression of the *E. coli* β -galactosidase linked next to the polyhedrin promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in insect cells. *Mol. Cells.* **3**: 309-313.
- Volkman, L. E., and P. A. Goldsmith. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* **143**: 185-195.
- Whitford, M., S. Stewart, J. Kuzio, and P. Faulker. 1989. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **63**: 1393-1399.
- Woo, S. D., H. U. Kim, B. S. Park, S. K. Kang, J. M. Yang, and I. S. Chung. 1992. Location and nucleotide sequences of the *Bombyx mori* nuclear polyherosis virus polyhedrin gene. *Korean J. Seric. Sci.* **34**: 20-25.

(Received Jan. 11, 2001/Accepted Feb. 6, 2001)