□보 문□

韓應昆誌 45(1): 15~24 (2006)
Korean J. Appl. Entomol.

프루텔고치벌 브라코바이러스(*Cotesia plutellae* Bracovirus) 유래 IκB 유전자 구조와 피기생 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 체내 발현 패턴

김용균* · Neil A. Basio[1] · Ahmed M. A. Ibrahim · 배성우

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 곤충분자생리실험실

[1]Bulacan Agricultural State College, Pinaod, San Ildefonso, Bulacan, 3010 Philippines

Gene Structure of *Cotesia plutellae* Bracovirus (CpBV)-IκB and Its Expression Pattern in the Parasitized Diamondback Moth, *Plutella xylostella*

Yonggyun Kim*, Neil A. Basio[1], Ahmed M. A. Ibrahim and Sungwoo Bae

School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

[1]Bulacan Agricultural State College, Pinaod, San Ildefonso, Bulacan, 3010 Philippines

ABSTRACT : Inhibitor κB (IκB)-like gene has been found in the genome of *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV), which is the obligatory symbiont of an endoparsitoid wasp, *C. plutellae*. The open reading frame of CpBV-IκB was 417 bp and encoded 138 amino acids. Four ankyrin repeat domains were found in CpBV-IκB, which shared high homology with other known polydnavirus IκBs. Considering a presumptive cellular IκB based on *Drosophila* Cactus, CpBV-IκB exhibited a truncated structure with deletion of signal-receiving domains, which suggested its irreversible inhibitory role in NFκB signal transduction pathway of the parasitized host in response to the wasp parasitization. CpBV-IκB was expressed only in the parasitized diamondback moth, *Plutella xylostella*. Its expression was estimated by quantitative RT-PCR during parasitization period, showing a constitutive expression pattern from the first day of parasitization. An indirect functional analysis of CpBV-IκB was conducted and suggested a hypothesis of host antivirus inhibition.

KEY WORDS : Antivirus, *Cotesia plutellae*, CpBV, IκB, NFκB, *Plutella xylostella*, Polydnavirus

초 록 : 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 내부기생봉이고 κB억제자 (IκB)와 유사한 유전자가 이 기생봉의 절대 공생바이러스(*C. plutellae* bracovirus: CpBV) 게놈에서 발견되었다. 이 유전자의 발현 부위는 417 bp의 크기이며 138개 아미노산 서열 정보를 포함하였다. 이 단백질은 4개의 ankyrin 반복 영역을 지니고 있었으며, 알려진 다른 폴리드나바이러스 유래 IκB 유전자와 높은 상동성을 보였다. 초파리 Cactus 단백질을 통해 대상 기주 IκB와 비교하여 보면, IκB 신호수신영역이 부재하는 구조를 보여, CpBV-IκB는 NFκB 신호전달체계의 비가역적 억제 인자로 작용할 것으로 추정되었다. CpBV-IκB는 프루텔고치벌에 기생된 배추좀나방에서만 발현되었다. 정량적 RT-PCR 방법으로 CpBV-IκB의 발현량을 조사하여 보면, 기생 첫날부터 발현을 보이기 시작하여 뚜렷한 발현량을 기생 전체 기간동안 유지하는 양상을 보였다. 이 CpBV-IκB의 기능 분석이 간접적으로 이뤄졌으며, 이 유전자 발현물이 대상 기주 항바이러스 억제 인자로 작용할 것이라는 가설을 제시하였다.

검색어 : 배추좀나방, 폴리드나바이러스, 프루텔고치벌, 항바이러스, CpBV, IκB, NFκB

*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

서 론

프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 내부기생봉으로 야외 배추좀나방(*Plutellae xylostella*) 집단의 주요 생물적 조절 요인이다(Talekar and Yang, 1991; Oh *et al.*, 1997). 이 고치벌은 배추좀나방의 어린 유충시기에 기생하여 자신의 생존과 발육을 위해 기주 면역을 억제하고, 기주 유충 발육기간을 연장시키는 생리 교란을 유발한다(Bae and Kim, 2004; Lee and Kim, 2004). 이렇게 기생된 배추좀나방은 변태를 하지 못하고, 발육된 기생봉이 탈출하게 되면 바로 치사하게 된다.

여러 인자가 이러한 프루텔고치벌의 기생 활동을 돕게 된다. 이들은 어미로부터 유래되는 요인과 차세대 배자에서 유래되는 요인으로 나눠볼 수 있다. 어미로부터 유래되는 인자는 대상 배추좀나방 체내에 산란할 때 전달되는 인자로서 어미의 난소 수란관 내강에 존재했던 난소단백질, 독샘물질 및 폴리드나바이러스(polydnavirus: PDV)가 포함된다(Kim and Kim, 2004; Choi *et al.*, 2005). 배자로부터 유래되는 인자는 배자외막에서 기인되는 기형세포(teratocyte)로서 기생후 약 3일 후에 고치벌 부화와 동시에 피기생체 혈강에서 발견된다(Basio and Kim, 2005).

피기생된 기주체에서 보이는 다양한 생리적 교란현상은 기생봉에서 유래되는 다양한 인자가 종합적으로 작용하여 유도되지만, PDV가 가지고 있는 풍부한 유전적 게놈 정보는 많은 생리교란인자가 이 바이러스에 의해 야기되었을 것으로 추정되고 있다. PDV는 일부 맵시벌과와 고치벌과 종들과 절대 공생하는 바이러스로서, 이중나선형 게놈 DNA가 프로바이러스 형태로 기주 곤충 염색체에 존재하여 세대 증식을 하게 된다(Krell *et al.*, 1982; Belle *et al.*, 2002). 이 PDV는 다시 바이러스 분류상 맵시벌과에 공생하는 바이러스는 Ichnovirus (IV), 고치벌과에 속한 바이러스는 Bracovirus (BV)로 각각 나뉘고, 이들은 바이러스 외막 구조와 복제후 탈출과정 등에서도 차이를 보인다(Webb, 1988). 현재 여러 IV와 BV의 게놈이 밝혀지고 있으며, 최근에 전체 게놈구조가 밝혀진 *C. congregata* bracovirus (CcBV)는 567,670 bp 전체 게놈에 5-40 kb 크기의 30개 고리형 DNA 조각으로 구성되며, 156개의 추정 유전자 영역을 포함하고 있다(Espagne *et al.*, 2004). 기존에 밝혀진 다양한 PDV 유전자 family (Kroemer and Webb, 2004)는 물론이고 기능이 아직 밝혀지지 않은 유전자들이 CcBV에 포함되어, PDV 고유의 유전자 형태의 존재는 물론이고 PDV들 사이에 차이점도(주로 IV와 BV 차이) 보여 주고 있다(Espagne *et al.*, 2004).

프루텔고치벌에 공생하는 CpBV(*C. plutellae* bracovirus) 게놈은 약 27개 DNA 조각으로 475 kb 이상을 차지할 것으로 추정된다(미발표자료). 최근 CpBV에 대한 전체 게놈 분석이 착수되었고, 70% 이상의 게놈이 밝혀지고 있다. 이 CpBV도 마찬가지로 기존에 밝혀진 다양한 PDV 유전자 family들을 보유하고 있다(Choi *et al.*, 2004). 본 연구에서는 프루텔고치벌 기생에 따른 배추좀나방에서 발현되는 CpBV 유래 IκB (Inhibitor κB) 유사 유전자의 유전자 염기서열과 기존에 밝혀진 유사 유전자와의 구조적 차이 분석 및 피기생 배추좀나방에서 발현양상을 보고한다.

IκB는 면역신호전달 체계에서 중요한 NFκB의 억제인자로서, 이들 두 결합체가 세포질에 존재한다(Baeuerle and Baltimore, 1988). 주로 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 밝혀진 면역신호에 따르면, 외부인식 면역신호는 Toll 신호체계와 Imd 신호체계로 구분되어 세포내로 전달되며, 여기서 Dif와 Dorsal 신호단백질들은 Toll 신호체계에, Rel-110은 Imd에 반응하는 각각의 NFκB이다(Hoffmann, 2003; Imler and Bulet, 2005). Dif와 Dorsal은 Cactus라는 IκB 단백질과 결합되어 불활성화 상태로 존재하며, Rel-110은 Relish라는 IκB와 결합되어 있다(Dushay *et al.*, 1996). 이들의 결합은 상호 ankyrin 반복영역을 공유함으로 이뤄진다(Baeuerle, 1998). 외부 인식신호와 함께 이들 IκB들의 조절 부위가 인산화되면 이는 ubiquitin의 결합을 허용하게 되고, 이후 단백질분해효소 집합체에 의해 IκB가 분해되면, NFκB가 방출하게 된다. 방출된 NFκB는 노출된 핵내 이동신호를 통해 핵 안으로 이동하고, 다양한 면역관련 유전자들(*lectin, diptericin, cecropin, drosocin, drosomycin, defensin, attacin, lysozyme*)의 프로모터 영역에 결합하여 이들 유전자의 발현을 유도하게 된다(Sun and Faye, 1992; Engstrom *et al.*, 1993; Kappler *et al.*, 1993). 이후 다시 재결합된 IκB는 핵 안으로 침입하여 NFκB와 다시 결합하고, 세포질로 원상복귀하게 한다(Zabel and Baeuerle, 1990; Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1997). 이러한 시나리오는 CpBV-IκB가 배추좀나방의 면역신호 전달 체계에 교란을 꾀할 것이라는 추측을 가능하게 하고, 본 연구는 이러한 추측을 간접적으로 뒷받침하는 기초 자료를 제공한다.

재료 및 방법

곤충사육과 프루텔고치벌 기생

프루텔고치벌은 안동의 배추 포장에서 채집된 배추좀

나방에서 얻은 야외 집단을 실내 조건(온도 약 25℃, 광주기 16:8 (L:D)h)에서 누대사육하였다. 배추좀나방 유충은 배추잎으로 사육되었으며, 성충에게는 10% 설탕물이 공급되었다. 배추좀나방 2령 유충을 프루텔고치벌 기생에 이용하였다. 배추좀나방 유충에 대한 기생은 우화 후 1일 동안 미리 교미가 허용된 성충 집단에 배추좀나방 유충을 24시간동안 노출시켜 기생시켰다. 이후 기생된 배추좀나방은 일반 사육 방법으로 사육되었으며, 형성된 고치에서 우화된 성충은 50% 설탕물을 먹이로 공급하였다.

CpBV 게놈 DNA 및 subcloning

암컷 고치벌 난소로부터 Beckage *et al.* (1994)의 여과 지분리법을 이용하여 CpBV를 분리하였다. 약 200마리의 암컷 복부로부터 바이러스를 분리하고, 이를 일반 게놈 DNA 분리방법(Sambrook *et al.*, 1989)으로 CpBV 게놈 DNA를 분리하였다.

분리된 CpBV 게놈 DNA는 전이인자(EZ::TN™ <R6K γori/KAN-2> transposon)을 이용한 subcloning 키트 (Epicentre, Madison, USA)를 통해 각 원형 DNA 조각을 subcloning하였다. 이러한 subclone의 CpBV 게놈 조각 크기를 확인한 후 전이인자 말단 염기서열을 프라이머로 이용하여 CpBV 게놈의 염기서열을 밝혔다. 밝혀진 염기서열은 DNAstar 프로그램 (Version 5.01, DNAstar Inc., Madison, USA)을 이용하여 ORF (open reading frame)를 찾고, 이 ORF는 다시 NCBI-BLAST 프로그램(www.ncbi.nlm.nih.gov)을 이용하여 유사 유전자를 검색하였다.

cDNA 및 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

기생전후 날자별로 배추좀나방을 수집하였고, 이들의 전체 RNA를 Trizol 용액(MRC, OH, USA)으로 추출하였다. 이 전체 RNA (1 ㎍)를 주형으로 oligo-dT (5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TTT TTT-3') 프라이머로 RT-premix (바이오니어, 대전)를 이용하여 역전사하였다. 이후 RNase H로 RNA를 제거하고 단일가닥의 cDNA를 얻었다.

형성된 cDNA를 이용하여 CpBV-IκB 유전자의 전체 추정 ORF (open reading frame)의 PCR은 다음의 두 프라이머를 이용하여 94℃에서 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 1분의 반응 순으로 35회 PCR 산물을 증폭시켰다: FP (5'-ATG AGT AAC AAG AAC CGC TAT G-3'), RP (5'-CAA CTG AAG CCT TTG AGT CTT G-3').

CpBV-IκB 유전자 발현 분석

CpBV-IκB mRNA의 정량분석은 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (바이오니어, 대전)을 이용하여 SYBR 그린 형광물질과 형광분석방법을 가미한 real time quantitative PCR (qRT-PCR) 기술로 측정하였다. CpBV-IκB에 대한 qRT-PCR 프라이머들이 제작되었다: RT-FP (5'-GTG TGT ACA CAT TGC TGC GTC-3'), RT-RP (5'-GAA GGC GAT GTG GTA CGG CGT C-3'). qRT-PCR 반응은 Accupower Green star™ PCR premix (바이어니어, 대전)로 진행되었다. 이 반응물(20㎕)은 1x Greenstar™ master mix, 10 mM $MgCl_2$, 0.5 μM의 각 프라이머, 250 ng의 cDNA가 포함되었다. 반응조건은 Hotstart Taq DNA polymerase를 활성시키기 위해 95℃에서 15분간 가열하였으며, 이후 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분의 반응 순으로 40회 PCR 산물을 증폭시켰고, 증폭된 산물의 형광반응이 실시간으로 측정되었다. 각 처리는 3반복으로 각 반복은 독립된 반응을 의미한다. 나비목 유충의 보존적 β-actin 유전자 부위를 결정하여 이를 바탕으로 프라이머가 제작되고 (5'-TGG CACCACACCTTC TAC-3'; 5'-CAT GAT CTG GGT CAT CTT CT-3'), 이 유전자 증폭물이 각 CpBV-IκB 반응의 정량적 표준화 대조구로 이용되었다.

얻어진 PCR 증폭물의 형광량들은 Exicycler™ 프로그램에 의해 실시간으로 도식화되고, 정량적 임계 반응횟수 (critical threshold, CT)가 산출되었다. 다시 CpBV-IκB의 CT는 β-actin 유전자 CT에 대한 차이(ΔCT)로 산출한 후, 이를 상대적 수치($2^{-\Delta\Delta CT}$)로 환산하여 비교하였다(Livak and Schmittgen, 2001).

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus (AcNPV) 처리 및 CpBV-IκB 발현

서울대학교 제연호 교수로부터 야생형 AcNPV 균주를 분양받았다. 이를 감수성 기주인 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에서 증식시키고, 다각체 형태의 바이러스를 O'Reilly *et al.* (1992)에 기술된 방법으로 분리하였다. 프루텔고치벌 기생에 따른 AcNPV 감수성 변화를 보기 위해 기생 또는 비기생된 배추좀나방을 개체당 1.4×10^2 다각체 농도로 섭식시켰다. 처리후 일별 사망율과 소화관

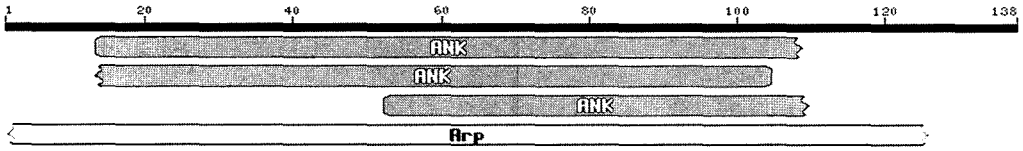
(A)

```
ATGAGTAACA AGAACCGGTA TGCTTTGTTG GAATACAATT GGAAAAGACA ACAGTGTGTA CACATTGCTG   70
CGTCTCAGCA AGAAGACGCC GTCGAAAAGA TGAAACTCCT GATACTCTGG GGCGCAGACG TCAATGGAAA  140
GGAGTTGAAG GGAGGGGATA CACCCTTGCA TATAGCAGTG AGGGCTCAAA ACTACACCTT GGTAGAATGG  210
CTGTGTCAAC AGCCTAACGT CAACAGAGAA GCTATGAACA ACGACTTAAT GACGCCGTAC CACATCGCCT  280
TCTTCGCCAG GGATGATAAG ATGATGGGCA TCTTGAAGCA GAACGGTGTA CAATGCAGGG TTCCCCTGCA  350
ATCGGAAACC AATTCTTATG ATGAGGACTA CCAACCAGAG TGCAAGACTC AAAGGCTTCA GTTGTGA     417
```

(B)

```
MSNKNRYALL EYNWKRQQCV HIAASQQEDA VEKMKLLILW GADVNGKELK GGDTPLHIAV RAQNYTLVEW   70
LCQQPNVNRE AMNNDLMTPY HIAFFARDDK MMGILKQNGV QCRVPLQSET NSYDEDYQPE CKTQRLQL   138
```

(C)



(D)

Protein (organism)	CpBV-IκB				
	Analyzed sequence (aa)	Amino acid identity (%)	Amino acid gap (%)	Match score (bits)	E value
cactus-like 1 (Cotesia congregata virus)	154	50	0	120	1e-26
viral ankyrin 2 (Microplitis demolitor bracovirus)	181	46	0	116	1e-25
viral ankyrin 2 (Microplitis demolitor bracovirus)	168	44	0	108	5e-23
viral ankyrin 1 (Microplitis demolitor bracovirus)	167	45	0	105	3e-22

Fig. 1. CpBV-IκB. (A) Nucleotide sequence (DQ299488: NCBI accession number) of its open reading frame (B) Its amino acid sequence (C) Domain search using NCBI-BlastP (D) Homologous genes with CpBV-IκB.

멜라닌 현상을 분석하였다. 소화관 붉은 반점 현상(Fig. 5 참조)은 반점의 크기와 형성수에 따라 0-3의 네 등급으로 구분하였다.

기생 또는 비기생 배추좀나방 소화관으로 부터 전체 RNA를 추출하고 상기에 기술한 바와 같이 cDNA를 형성하였다. 이를 주형으로 CpBV-IκB의 유전자 발현을 ORF 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 분석하였다.

결 과

프루텔고치벌의 기생에 따른 배추좀나방의 생리 변화는 상당 부분이 CpBV에 기인될 것이라는 생각은 이 바이러스의 전체 게놈 연구가 필요했다. 이를 수행하기 위한 일환으로 본 연구실에서는 바이러스의 게놈의 전체 클로닝을 실시하였다. CpBV 게놈은 기주 고치벌 암컷이 성충 조직을 형성하는 시기에 프로바이러스 형태에서 바이러스 입자로 복제되고(Kim and Kim, 2004), 복제된 바이러스는 더 이상 스스로의 복제가 불가능한 원형 고리조각 형태로 나타난다. 여기에 복제원점을 가지고 있는 전이인자 삽입을 통해 각 CpBV 고리조각 게놈이 클로닝되었다. 이렇게 형성된 바이러스 게놈 조각들은 대장균에서도 쉽게 증식이 되어 유전자 염기서열에 이용되었다. 이 가운데 한 클론에서 부분적 염기서열이 밝혀졌고, 이 서열에서 찾은 ORF가 기존의 PDV 유래 viral ankyrin 유사 유전자로 밝혀졌다(Fig. 1). 우리는 이 유전자를 CpBV-IκB로 명명하였다. CpBV-IκB는 417 bp의 ORF 크기로 138개의 아미노산 서열 정보를 가지고 있었다. Genbank의 단백질 영역 분석 결과 이 유전자는 ankyrin 반복 서열을 가지고 있는 것으로 나타났고, CcBV나 MdBV (*Microplitis demolitor* bracovirus)의 viral ankyrin 유전자와 유사한 구조를 가지고 있는 것으로 나타났다.

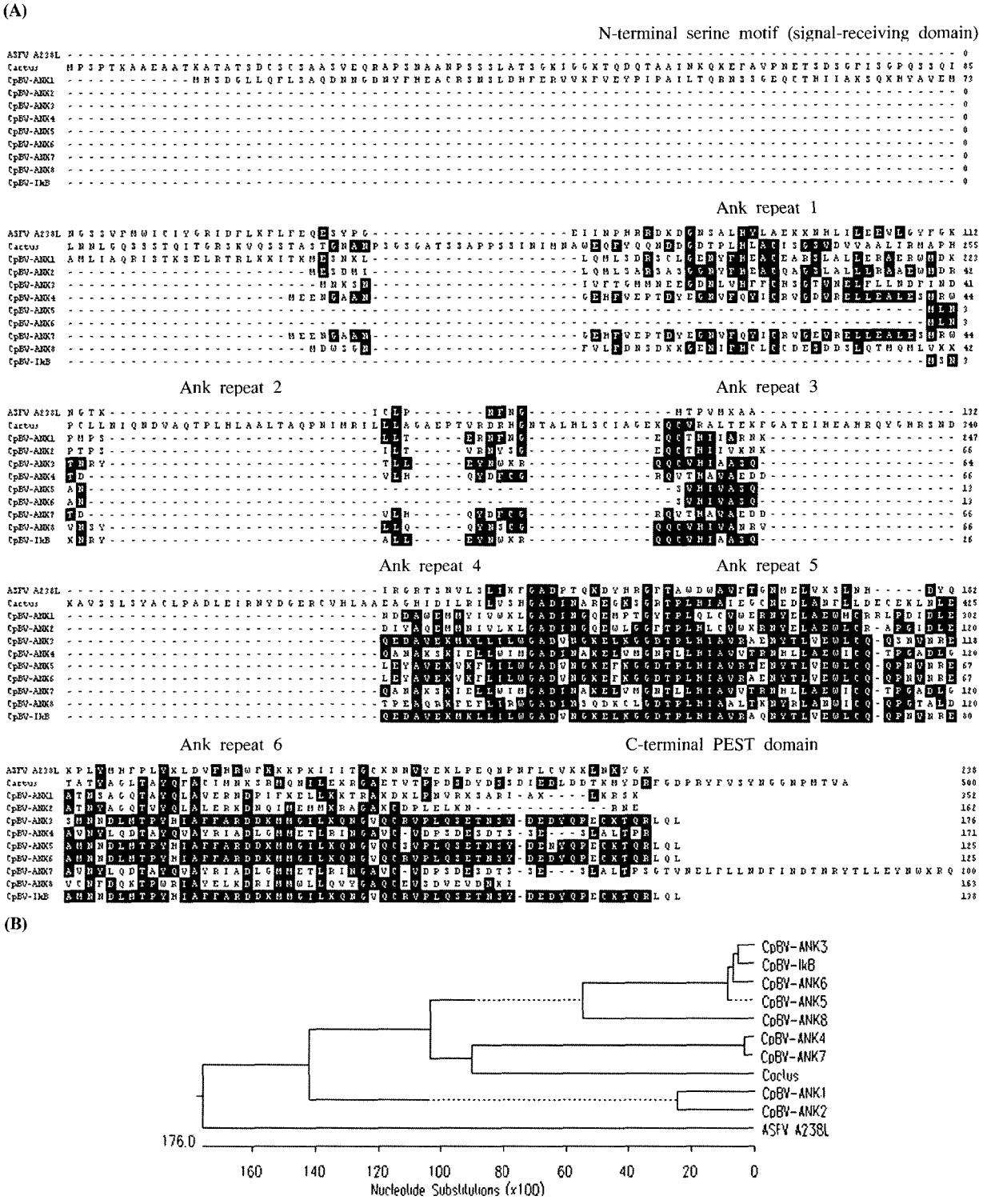


Fig. 2. (A) Comparison of CpBV-IκB (DQ299488: NCBI accession number) with other CpBV-related genes in reference to *Drosophila* cactus. Amino acid sequence alignment was performed by ClustalW program of DNAstar Version 5.01. Locations of *Drosophila* cactus ankyrin repeats 1 to 6 have been denoted according to Dushay *et al.* (1996). The open boxes in the N- and C-terminal regions of the *Drosophila* cactus are sensitive to protease activity and are involved in the regulation of cellular activity. Black residues indicate matches to the viral IκB consensus sequence. NCBI accession numbers: ASFV A238L (NP 042733), *Drosophila* cactus (A44269), CpBV-ANK1 (AAZ04285), CpBV-ANK2 (AAZ04266), CpBV-ANK3 (AAZ04279), CpBV-ANK4 (AAZ04280), CpBV-ANK5 (AAZ04281), CpBV-ANK6 (AAZ04283), CpBV-ANK7 (AAZ04284), CpBV-ANK8 (Personal communication with Dr. YH Je, Seoul National University). (B) Phylogeny tree of the selected IκB-like genes. Numbers on the phylogenetic tree indicate the percentage of similarity index on each branch analyzed by a ClustalW program.

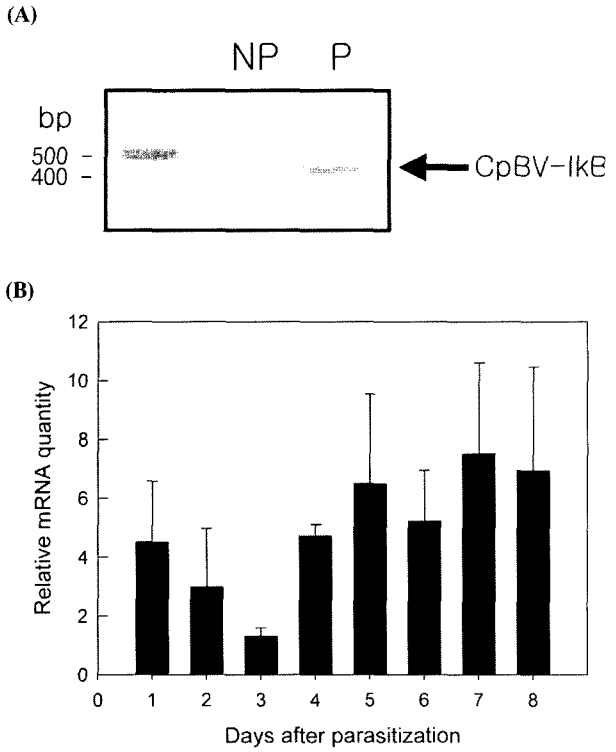


Fig. 3. Expression of CpBV-IκB in diamondback moth (DBM) parasitized by *Cotesia plutellae*. (A) RT-PCR with ORF primers (see Materials and Methods), where 'NP' and 'P' represent nonparasitized and parasitized DBM, respectively. (B) A quantitative RT-PCR of CpBV-IκB with qRT-PCR primers (see Materials and Methods) during the total parasitization period. Three independent measurements were performed in the qRT-PCR analysis. Each error bar indicates a standard deviation of the three measurements.

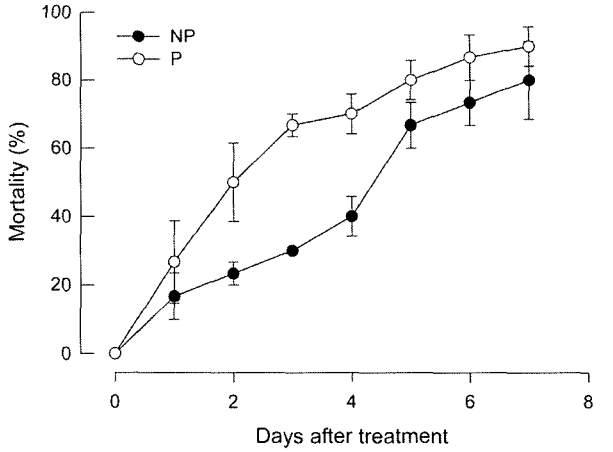


Fig. 4. Oral susceptibility of diamondback moth (DBM) to AcNPV ($1.4x10^2$ PIB/individual). 'NP' and 'P' represent non-parasitized and parasitized DBM, respectively. Both larvae were at the same age of third instar, where the parasitized larvae passed two days after parasitization when treated with AcNPV. Each treatment consisted of three replications with 10 larvae per replication.

Genbank에 등록되어 있는 ankyrin 유사 CpBV 유전자는 모두 7개이고, 8번째는 미등록된 CpBV-ANK8이다. 본 연구에서 밝힌 CpBV-IκB는 이들과는 서열이 다른 것으로 나타났다(Fig. 2). 이들 9개 CpBV 유래 ankyrin 유사 유전자들이 초파리 Cactus 유전자와 비교하였고, 이를 통해 영역별 구조를 확인하였다(Fig. 2A). CpBV-IκB와 8개 CpBV-ANK 유전자들은 Cactus의 N 말단과 C 말단 분위를 제외하고 ankyrin 반복 서열에서 유사성을 보였다. 그러나 Cactus는 이들 ankyrin 반복 부위를 6개 가지고 있는 반면, CpBV-IκB는 3-6번째의 4개만 가지고 있었다. 즉, CpBV-IκB는 초파리 Cactus의 N 말단 신호처리영역, 1, 2번째 ankyrin 반복 영역 그리고 C 말단 PEST 영역 등 여러 부위가 결실된 구조를 나타냈다. CpBV-IκB는 일부 CpBV ankyrin 유전자와 80% 이상의 높은 상동성을 보인 반면, CpBV ANK1, 2, 4, 8과는 비교적 낮은 상동성(30.4-37.0%)을 보였다. 또한 CpBV-IκB는 African swine fever virus (ASFV) 유래 IκB 유전자인 A238L과도 12.3%의 아미노산 서열 상동성을 보였다(Fig. 2B).

CpBV-IκB 유전자 발현이 RT-PCR 방법으로 분석되었다. 우선 전체 ORF를 포함하는 프라이머로 cDNA를 증폭시킨 결과 기생된 배추좀나방에서만 이 유전자가 발현되었다(Fig. 3A). 증폭된 유전자 크기는 게놈상에서 추정된 크기와 유사하게 나타났다. 다시 qRT-PCR 방법으로 이 유전자의 기생 기간 동안 배추좀나방 체내에서 발현되는 양상을 분석하였다(Fig. 3B). CpBV-IκB는 기생 첫날부터 발현되어, 이후 발현량이 감소하다가 다시 기생 후기까지 높은 발현이 유지되는 양상을 보였다.

CpBV-IκB의 기능에 대한 연구가 병행되었다. 한편 조직별 CpBV-IκB 발현 양상 분석에서 이 유전자가 혈구, 지방체는 물론이고 및 소화관에서도 발현된다는 결과를 얻었다(미발표자료). 또한 AcNPV를 섭식시키면 기생된 배추좀나방이 비기생된 배추좀나방에 비해 높은 감염력을 보였다(Fig. 4). 비기생 배추좀나방의 반수치사기간(LT50)은 3.75 일 (3.11-4.56 일: 95% 신뢰구간)인 반면, 기생체에서는 LT50은 1.99 일 (1.45-2.46 일)로 뚜렷하게 감수성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

AcNPV를 섭식시키면 소화관에서 붉은 반점이 형성된다는 것을 관찰하였다(Fig. 5). 이러한 정도가 바이러스 노출량에 관련되는 것으로 보여, 형성된 붉은 반점의 밀도에 따라 0-3의 네 등급으로 구분하였다. 이때 기생된 배추좀나방과 비기생된 배추좀나방에게 AcNPV를 섭식시키면, 소화관 반점 형성에서 뚜렷한 차이를 발견하였다. 기생된

배추좀나방은 뚜렷하게 낮은 소화관 붉은 반점 지수를 보였다(Fig. 6). 기생된 배추좀나방 소화관에서는 CpBV-IκB의 발현을 특이적으로 보였다(내부그림, Fig. 6).

고 찰

CpBV 게놈의 임의 염기서열 분석은 CpBV-IκB를 찾게 하였다. IκB는 NFκB의 억제인자로서 ankyrin 반복 서열이 이들 구조의 특징이며, 이 구조는 NFκB와 결합하는 데 필요하다(Huxford *et al.*, 1998; Jacobs and Harrison, 1998). IV와 BV의 두 부류의 PDV 모두에서 이러한 유전자가 보고되었다(Kroemer and Webb, 2005; Thoetkiattikul *et al.*, 2005). 두 부류의 PDV는 서로 다른 진화적 기원을 가지고 있어서(Whitfield and Asgari, 2003), 이들의 유사 유전자 공유와 이들이 보이는 유사한 나비목 곤충 생리교란을 고려하여 보면, 이 유전자가 이들 기생봉들의 발육과 관련되어 주요한 역할을 차지할 것으로 짐작된다.

CpBV-IκB는 유사성이 높은 초파리의 Cactus 유전자 구조와 비교하여 볼 때 6개의 ankyrin 반복 영역 가운데 1, 2번째 영역을 제외하고 나머지 4개의 영역에서 유사한 구조를 보유하였다. Ankyrin 반복서열은 'TPLHLA' 서열을 중심으로 기본 33개의 아미노산 배열을 보이며, IκB를 비롯하여 세포골격 단백질, 세포주기조절자인 Swi6, 발육조절자인 Notch, 독소유전자인 α-latroxin에서도 발견된다(Bennett, 1992; Hatada *et al.*, 1992; Ray *et al.*, 1995; Sedgwick and Smerdon, 1999; Andrade *et al.*, 2001). 이들 단백질에서 ankyrin 구조는 단백질과 단백질 사이에 결합과 신호전달에 중요한 역할을 담당하게 된다. 그러나 본 CpBV-IκB의 ankyrin 반복 서열은 IκB의 ankyrin과 가장 높은 상동성을 보였다. 특별히 CpBV-κB가 보유하고 있는 4개의 ankyrin 반복 영역은 NFκB와 대부분의 연결점을 가지고 있어 이들의 사이 결합에 최소 단위로 대표할 수 있다(Huxford *et al.*, 1998). 흥미있게도 진화적 관련성이 매우 적은 포유동물의 병원성 바이러스인 ASFV가 CpBV-IκB와 유사한 IκB 유전자를 함유하고 있으며, NFκB인 p50/p56의 기능을 교란하는 것으로 알려지고 있다(Revilla *et al.*, 1998). CpBV-IκB는 초파리의 Cactus와 비교하여 볼 때 또한 N 말단 신호처리영역과 C 말단 PEST 영역이 결실된 구조를 나타냈다. 전형적 IκB의 N 말단에 두 개의 serine 아미노산이 매우 보존적 서열(DSGΨXS: Ψ는 소수성아미노산, X는 임의의 아미노산)에서 나타난다(Karin, 1999; Shirane *et al.*, 1999). 면역신호에 따라 이 serine 부위가 인산화되면, ubiquitin 단백질에 의해 인식되고, 이를 단백질 분해 효소에 의해 IκB가 분해되고, 결과적으로 NFκB가 IκB와의 결합에서 방출되게 된다(Burke *et al.*, 1999; Karin, 1999; Latimer *et al.*, 1998; Shirane *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Senftleben *et al.*, 2001). 이와 유사하게 C 말단 부위도 인산화되어 단백질 분해효소에 노출되게 된다(Beg and Baldwin, 1993; Liu *et al.*, 1997). 즉, CpBV-IκB는 NFκB와 결합할 수 있는 최소 ankyrin 반복 서열은 유지하되, 세포내 신호체계에 의해 IκB가 조절되는 부위는 결실된 구조를 지니고 있다. 그래서 CpBV-IκB는 NFκB를 항구적으로 결합하여 이 신호체계를 비가역적 억제상태로 유도할 수 있다는 것을 의미하게 된다. *Microplitis demolitor* BV에서 유래된 IκB는 초파리의 NFκB 단백질인 Dif, Dorsal 또는 Relish와 결합할 수 있고, 이러한 결합은 이들 NFκB의 DNA 프로모터 결합을 방해하여, 궁극적으로 항생펩타이드 유전자 발현을 억제시켰다(Thoetkiattikul *et al.*, 2005). *Campoletis sonorensis* IV에서 유래된 7개의 서로 다른 IκBs는 조직별 발현 특이성을 보였고, 발현 단백질이 핵내에서도 존재하는 것을 보여, 이들 IκB가 NFκB의 신호체계를 억제할 수 있다는 것을 뒷받침했다(Kroemer and Webb, 2005).

CpBV는 본 연구 결과를 포함하여 최소한 9개의 IκB 유전자(378-1,059 bp)를 포함하고 있다. 이는 420-579 bp 크기의 IκB를 각각 7개씩 포함하고 있는 MdBV와 CsIV보다 많고, ORF의 크기도 다양하였다. 그러나 일부 CpBV의 IκB는 정확한 발현체의 크기를 확인할 필요가 있어서 월등히 크기가 큰 CpBV-ANK1과 CpBV-ANK7은 좀 더 분석해 볼 필요가 있다. 여하튼 다양한 IκB가 CpBV 게놈에 존재한다는 것은 이상에서 기술한 NFκB 신호체계 교란을 하는 데 다양성이 필요하였음을 추측하게 한다. 앞에서 서술하였듯이 NFκB는 동형 또는 이형이량체로 존재하여, 포유동물의 경우 IκBα는 p50-p60 이량체 NFκB, IκBβ는 p50-cRel 이량체 NFκB, IκBε는 p60가 포함된 동형 또는 이형이량체 NFκB 그리고 Bcl-3는 p50 또는 p52 동형이량체와 각각 결합하게 된다(Simeonidis *et al.*, 1997). 곤충에서도 초파리는 3 종류의 NFκB 단백질(Dif, Dorsal, Relish)이 동형 또는 이형이량체로 결합하는 것으로 보이고, 이들은 서로 다른 유전자 발현에 관여하는 것으로 여겨진다(Han and Ip, 1999; Uvell and Engstrom, 2003).

CpBV가 다양한 IκB를 가져야 할 또 다른 이유는 NFκB 관련 유전자 발현이 매우 다양하다는 것이다. De Gre-

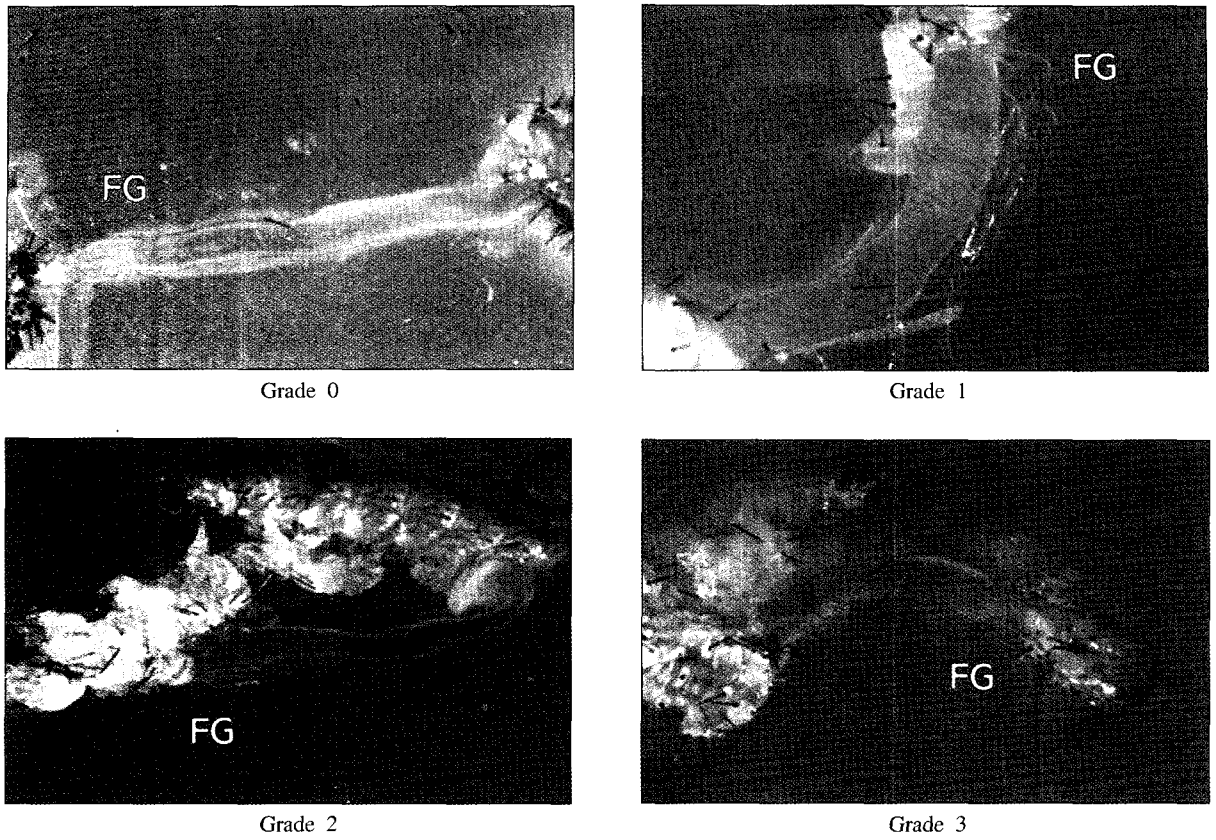


Fig. 5. Gut melanization of diamondback moth larvae after oral infection with AcNPV. The red-spotted melanization occurred mostly on foregut and anterior midgut, where no melanization (grade 0), sporadic spots (grade 1), dense spots (grade 2), and highly dense spots (grade 3).

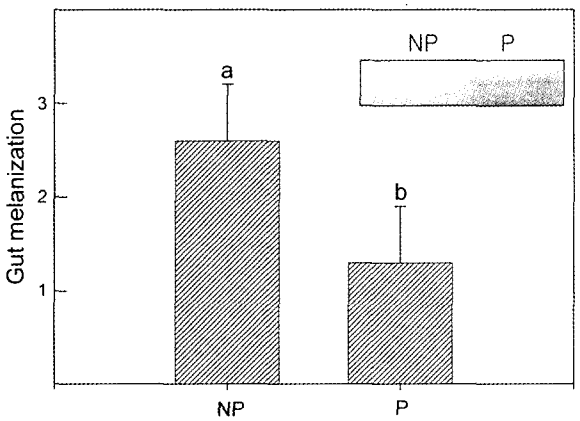


Fig. 6. Depression in gut melanization of the diamondback moth (DBM) parasitized by *Cotesia plutellae*. 'NP' and 'P' represent nonparasitized and parasitized DBM, respectively. Inset figure indicates CpBV-IκB expression in the parasitized DBM gut by RT-PCR analysis.

gorio *et al.* (2001)은 초파리에서 NFκB 신호와 관련지어 230개 유전자 발현이 촉진되며 반면에 170개 유전자는 발현이 억제된다는 것을 보였다. 서로 다른 CsIV의 IκB는 크게 혈구세포에서 주로 발현하는 종류와 지방체에서 발현하는 종류로 나눌 수 있었다(Kroemer and Webb, 2005). 즉, 조직별로 다양하게 나타낼 수 있는 기주 면역반응 또는 발육 과정을 CpBV가 다양한 IκB를 지님으로 교란시킬 수 있다고 사려된다. 고치벌 기생과 관련지어 IκB의 교란 작용은 피낭형성과 같은 세포성면역의 억제 작용을 가정할 수 있다. 이는 초파리에서 보고되었듯이 NFκB에 의해 조절되는 요인들이 피낭형성 과정에 이용된다는(Irving *et al.*, 2005) 사실에서 설득력을 갖는다. 또 다른 관점으로 배추좀나방이 보일 수 있는 항바이러스 기작에 대해 CpBV 자신을 보호하기 위해서 IκB가 NFκB 신호 체계 가운데 항바이러스 기작과 관련 높은 Toll 신호 체계(Zambon *et al.*, 2005)를 무력화한다는 가설이다.

본 연구는 프루텔고치벌에 기생된 배추좀나방은 AcNPV 섭식에 따른 항바이러스 기작으로 여겨지는 소화관 상피세포 멜라닌 반응이 억제되는 것을 보였다. 또한 기생된 배추좀나방 소화관에 CpBV-IκB가 발현되는 것을 보여,

간접적으로 CpBV-IκB가 항바이러스 기작을 교란하는 것으로 추정하게 했다. 곤충에 있어서 항바이러스 기작은 아직 많이 연구되지 않았지만, 벡큘로바이러스에 대해서는 일반적으로 감염 상피세포의 이탈과 기타 감염 세포의 세포자연치사가 주요한 항바이러스 기작으로 알려지고 있다(Clem, 2005). 특별히 세포자연치사는 다른 세포성 면역 반응과 이뤄질 때 감염 바이러스의 증식억제는 물론이고, 파괴에 이르게 할 수 있다. 본 연구에서 관찰된 붉은 멜라닌 반점은 AcNPV 감염부위로 여겨질 수 있다. 이러한 이유는 높은 농도의 바이러스를 감염시킬수록 이러한 소화관 반점 지수는 높아졌다(미발표자료). 또한 프루텔고치벌 기생 배추좀나방은 같은 농도의 AcNPV 감염에도 낮은 반점지수를 보여, 세포자연치사의 억제뿐만 아니라 일반적으로 기생에 따른 세포성 면역반응의 저하가(Bae and Kim, 2004) 이러한 반점저하의 원인으로 여겨진다. 그러나 아직 이러한 소화관 반점이 AcNPV 감염 부위라는 직접적 증거가 없고, 또한 기생된 배추좀나방에서 반점 저하의 원인이 CpBV-IκB라는 데는 보다 명확한 증거가 필요하다. 이를 위해 표식된 AcNPV를 섭식시키고, 반점 부위에서 이러한 표식을 추적하는 연구가 필요하며, CpBV-IκB의 발현을 억제시키는 방법을 동원하여, 이 유전자가 이러한 항바이러스 기작을 교란한다는 증거를 확보하여야한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 사업으로 지원되었다. CpBV 게놈 분석 및 결과 해석에 도움을 준 서울대학교 제연호 교수님과 최재영 박사에게 감사드립니다. 또한 본 연구의 연구비 처리와 물품 조달에 수고를 아끼지 않은 송영임에게 감사드립니다.

Literature Cited

Andrade, M.A., C. Perez-Iratxeta and C.P. Pomting. 2001. Protein repeats: structure, functions, and evolution. J. Struct. Biol. 134: 117～131.

Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, M. Rodriguez, D. Thomas, R.T. Hay, J.L. Virelizier and C. Dargemont. 1997. Nuclear location of IκBα promotes active transport of NFκB from the nucleus to the cytoplasm. J. Cell Sci. 110: 369～378.

Bae, S. and Y. Kim. 2004. Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. Comp. Biochem. Physiol. 138A: 39～44.

Baeuerle, P.A. and D. Baltimore. 1988. IκB: a specific inhibitor of the NFκB transcripttion factor. Science 242: 540～546.

Basio, N.A. and Y. Kim. 2005. A short review of teratocytes and their characters in *Cotesia plutellae* (Braconidae: Hymonoptera). J. Asia-Pacific Entomol. 8: 211～217.

Beckage, N.E., F.F. Tan, K.W. Schleifer, R.D. Lane and L.L. Cherubin. 1994. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 26: 165～195.

Beg, A.A. and A.S. Baldwin, Jr. 1993. The IκB proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-κB transcription factors. Genes Dev. 7: 2064～2070.

Belle, E., N.E. Beckage, J. Rousselet, M. Poirié, F. Lemeunier and J.-M. Drezen. 2002. Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome. 76: 5793～5796.

Bennett, V. 1992. Ankyrins. J. Biol. Chem. 267: 8703～8706.

Burke, J.R., M.K. Wood, R.-P. Ryseck, S. Walther and C.A. Meyers. 1999. Peptides corresponding to the N and C termini of IκB-α, -β, and -ε as probes of the two catalytic subunits of IκB kinase, IKK-1 and IKK-2. J. Biol. Chem. 274: 36146～36152.

Choi, J.Y., J.Y. Rho, J.N. Kang, H.J. Shim, S.D. Woo, B.R. Jin, M.S. Li and Y.H. Je. 2005. Genomic segments cloning and analysis of *Cotesia plutellae* polydnavirus using plasmid capture system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332: 487～493.

Clem, R.J. 2005. The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 289: 113～130.

De Gregorio, E., P.T. Spellman, G.M. Rubin and B. Lemaitre. 2001. Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide arrays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 12590～12595.

Dushay, M.S., B. Asling and D. Hultmark. 1996. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like genes in the antibacterial defense of *Drosophila*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 93: 10343～10347.

Engstrom, Y., L. Kadalayil, S.C. Sun, C. Samakovlis, D. Hultmark and I. Faye. 1993. *kβ*-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. J. Mol. Biol. 232: 327～333.

Espagne, E., C. Dupuy, E. Huguet, L. Cattolico, B. Provost, N. Martins, M. Poirié, G. Periquet and J.M. Drezen. 2004. Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. Science 286～289.

Han, Z.S. and T. Ip. 1999. Interaction and specificity of Rel-related proteins in regulating *Drosophila* immunity gene expression. J. Biol. Chem. 274: 21355～21361.

Hatada, E.N., A. Nieters, F.G. Wulczyn, M. Naumann, R. Meyer, G. Nucifora, T.W. McKeithan and C. Scheidereit. 1992. The ankyrin repeat domains of the NF-κB precursor p105 and the protooncogene *bcl-3* act as specific inhibitors of NF-κB DNA binding. Proc Natl. Acad. Sci. USA 89: 2489～2493.

Hoffmann, J.A. 2003. The immune response of *Drosophila*. Nature 426: 33～38.

Huxford, T., D.-B. Huang, S. Malek and G. Ghosh. 1998. The crystal structure of the IκBα/NF-κB complex reveals mechanisms of NF-κB inactivation. Cell 95: 759～770.

Imler, J.L. and P. Bulet. 2005. Antimicrobial peptide in *Dro-*

sophila: structures, activities, and gene regulation. Chem Immunol. Allergy 86:1～21.

Irving, P., J.-M. Ubeda, D. Doucet, L. Troxler, M. Lagueux, D. Zachary, J.A. Hoffmann, C. Hetru and M. Meister. 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. Cell. Microbiol. 7: 335～350.

Jacobs, M.D. and S.C. Harrison. 1998. Structure of an IκBα /NF-κB complex. Cell 95: 749～758.

Kappler, C., M. Meister, M. Lagueux, E. Gateff, J.A. Hoffmann and J.M. Reichhart. 1993. Insect immunity. Two 17 bp repeats nesting a *kβ*-related sequence confer inducibility to the *diptericin* gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. EMBO J. 12: 1561～1568.

Karin, M. 1999. The beginning of the end: IκB kinase (IKK) and NF-κB activation. J. Biol. Chem. 274: 27339～27342.

Kim, Y. and J. Kim. 2004. Inhibitory effect of *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV) on development of a non-natural host, *Spodoptera exigua*. Korean J. Appl. Entomol. 43: 217～223.

Krell, P.J., M.D. Summers and S.B. Vinson. 1982. Virus with a multipartite superhelical DNA genome from the ichneumonid parasitoid *Campoletis sonorensis*. J. Virol. 43: 859～870.

Kroemer, J.A. and B.A. Webb. 2004. Polydnavirus and genome: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. Annu. Rev. Entomol. 49: 431～456.

Kroemer, J.A. and B.A. Webb. 2005. IκB-related vankyrin genes in the *Campoletis sonorensis* ichnovirus: temporal and tissue-specific patterns of expression in parasitized *Heliothis virescens* lepidopteran hosts. J. Virol. 79: 7617～7628.

Latimer, M., M.K. Ernst, L.L. Dunn, M. Drutskaya and N.R. Rice. 1998. The N-terminal domain of IκBα masks the nuclear localization signal(s) of p50 and c-Rel homodimers. Mol. Cell. Biol. 18: 2640～2649.

Lee, S. and Y. Kim. 2004. Juvenile hormone esterase of diamondback moth, *Plutella xylostella*, and parasitism of *Cotesia plutellae*. J. Asia-Pacific Entomol. 7: 283～287.

Lin, P.-H., L.H. Huange and R. Steward. 2000. Cactin, a conserved protein that interacts with the *Drosophila* IκB protein cactus and modulates its function. Mech. Dev. 94: 57～65.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delata C(T)) method. Methods 25: 402～408.

Liu, Z.-P., R.L. Galindo and S.A. Wasserman. 1997. A role for CKII phosphorylation of the cactus PEST domain in dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. Genes Dev. 11: 3413～3422.

Oh, M.R., S.S. Kim, J.D. Park, J.C. Paik and D.I. Kim. 1997. Biological characteristics of *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Korean J. Entomol. 27: 79～84.

O'Reilly D.R., L.K. Miller and V.A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. 347 pp. W.H. Freeman and Company, NY.

Ray, P., D.-E. Zhang, J.A. Elias and A. Ray. 1995. Cloning of a differentially expressed IκB-related protein. J. Biol. Chem. 270: 10680～10685.

Revilla, Y., M. Callejo, J.M. Rodriguez, E. Culebras, M.L. Nogal, M.L. Salas, E. Vinuela and M. Fresno. 1998. Inhibition of nuclear factor κB activation by a virus-encoded IκB-like protein. J. Biol. Chem. 273: 5405～5411.

Sambrook, J., E.F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Sedgwick, S.G. and S.J. Smerdon. 1999. The ankyrinrepeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem. Sci. 24: 311～316.

Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F.R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S.-C. Sun and M. Karin. 2001. Activation by IKKα of a second evolutionarily conserved, NF-κB signaling pathway. Science 293: 1495～1499.

Shirane, M., S. Hatakeyama, K. Hattori, K. Nakayama and K.-I. Nakayama. 1999. Common pathway for the ubiquitination of IκBα, IκBβ, and IκBε mediated by the F-box protein FWD1. J. Biol. Chem. 274: 28169～28174.

Simeonidis, S., S. Liang, G. Chen and D. Thanos. 1997. Cloning and functional characterization of mouse IκBε. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14372～14377.

Sun, S.C. and I. Faye. 1992. Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor, *kβ*. Eur. J. Biochem. 204: 885-892.

Talekar, N.S. and J.C. Yang. 1991. Characteristics of parasitism of diamondback moth by two laval parasites. Entomophaga 36: 95～104.

Thoetkiattikul, H., M.H. Beck and M.R. Strand. 2005. Inhibitor κB-like proteins from a polydnavirus inhibit NF-κB activation and suppress the insect immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11426～11431.

Uvell, H. and Y. Engstrom. 2003. Functional characterization of a novel promoter element required for an innate immune response in *Drosophila*. Mol. Cell. Biol. 23: 8272～8281.

Webb, B.A. 1998. Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. pp. 105-139. In The insect viruses, eds. by L.K. Miller and L.A. Ball. Plenum Publishing Corporation, New York.

Zabel, U. and P.A. Baeuerle. 1990. Purified human IκB can rapidly dissociate the complex of the NFκB transcription factor with its cognate DNA. Cell 61: 255～265.

Zambon, R.A., M. Nandakumar, V.N. Vakharia and L.P. Wu. 2005. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 7257～7262.

(Received for publication 30 November 2005;
accepted 21 December 2005)