

# 폴리드나바이러스(CpBV) 유래 면역억제 유전자를 이용한 베클로바이러스 병원력 제고 기술

김용균\* · 권보원<sup>1</sup> · 배성우 · 최재영<sup>2</sup> · 제연호<sup>2</sup>

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과, <sup>1</sup>(주) 경농 중앙연구소, <sup>2</sup>서울대학교 농업생명과학대학 곤충학과

(2008년 8월 8일 접수, 2008년 8월 25일 수리)

## Enhanced Pathogenicity of Baculovirus Using Immunosuppressive Genes Derived From *Cotesia plutellae* Bracovirus

Kim, Yonggyun\*, Bowon Kwon<sup>1</sup>, Sungwoo Bae, Jai Young Choi<sup>2</sup> and Yeon Ho Je<sup>2</sup>

Department of Bioresource Sciences, College of Natural Sciences, Andong National University, <sup>1</sup>Central Research Institute, Kyung Nong Co., <sup>2</sup>Department of Entomology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University

### Abstract

Baculoviruses have been used to control some serious lepidopteran pests. However, their narrow target insect spectrum and slow efficacy are main limitations to be used in various applications. This study introduces a technique to overcome these limitations by inhibiting insect immune defence to enhance the viral pathogenicity. Polydnviruses are an insect DNA virus group and symbiotic to some ichneumonid and braconid endoparasitoids. *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV) is a braconid polydnvirus and encodes several immunosuppressive genes. We selected seven CpBV genes and recombined them to wild type *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcNPV). A bioassay of these seven recombinants indicated that most recombinants had similar or superior efficacy to wild type AcNPV against beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and diamondback moth, *Plutella xylostella*. Recombinant AcNPV with CpBV-ELP was the most potent in terms of lethal time by shortening more than 2 days compared to wild type AcNPV. This recombinant was further proved in its dose-dependent pathogenicity and its efficacy by spray application on *S. exigua* infesting cabbage cultivated in pots. We discussed the efficacy of CpBV-ELP recombinant AcNPV in terms of suppressing antiviral activity of target insects.

**Key words** Baculovirus, *Cotesia plutellae*, *Plutella xylostella*, Polydnvirus, Recombinant, *Spodoptera exigua*

### 서론

폴리드나바이러스는 맵시벌상과에 속한 일부 내부기생봉에 공생한다(Krell 등, 1982). 특별히 각 종에 속한 바이러스는 서로 상이한 유전적 구성을 가지고 있어, 이들 공생 기생봉의 각 아과에 속한 종수를 추정하면 모두 30,000 종 이상

이 되며, 이는 폴리드나바이러스가 현재 지구상에 알려진 바이러스 가운데 가장 다양한 종류로 구성된 바이러스 분류군이 된다(Webb과 Strand, 2005). 이들 폴리드나바이러스가 속한 기주 기생봉의 분류군(맵시벌과(ichneumonidae)와 고치벌과(braconidae))에 따라 이크노바이러스(ichnovirus: IV)와 브라코바이러스(bracovirus: BV)로 대별된다(Webb, 1998).

내부기생봉은 기생의 양상에 따라 기생과 더불어 숙주의 발육이 정지되는 숙주마비형(idiobiont)과 기생이후에도 숙

\*연락처 : Tel. +82-54-820-5638, Fax. +82-54-823-1628  
E-mail: hosanna@andong.ac.kr

주의 발육이 지속되는 숙주발육형(koinobiont)으로 대별된다(Mackauer와 Sequeira, 1993). 숙주발육형 내부기생충인 경우 숙주 체내의 면역방어 기작을 극복해야 하며, 숙주의 발육 과정을 조절하여 자신의 발육을 도모하여야 한다. 이를 위해 다양한 기생인자를 보유하고, 이를 기생과 더불어 가동시켜 성공적 기생을 이루게 할 수 있다. 이러한 기생인자는 다시 어미로부터 직접 유래된 인자인 난소단백질, 독소단백질 및 폴리드나바이러스이며, 발육하는 배자로부터 기인된 인자인 기형세포(teratocyte)를 포함하게 된다(Quicke, 1997).

프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대해서 내부기생충으로서 숙주발육형 기생 생활환을 보인다(김 등, 2004). 폴리드나바이러스인 CpBV는 물론이고 기형세포, 난소단백질 및 독소단백질을 기생인자로 보유하고 있다(Basio와 Kim, 2006; Kim과 Ryu, 2007). CpBV는 약 470 kb 이상의 게놈크기를 가지고 있는 것으로, 현재 약 80% 염기서열이 밝혀진 상황에서 약 135개 이상의 유전자를 보유하는 것으로 추정되고 있다(Kim 등, 2007). 이들 유전자는 추정된 아미노산 서열에 따라 기존에 알려진 폴리드나바이러스 유전자군(Kroemer와 Webb, 2004)으로 분류되고 있으나 이 가운데 약 50% 이상은 아직 정확한 유전자 특성을 추정하지 못하고 있다.

프루텔고치벌에 기생된 배추좀나방은 면역기능 저하와 유충 발육 기간의 지연이라는 생리적 특징을 보이게 된다(Lee 등, 2005; Ibrahim과 Kim, 2006). 면역기능을 유발하는 기생인자로서 기형세포도 포함되지만, CpBV15 $\beta$ (Nalini와 Kim, 2007), CpBV-ELP(Kwon과 Kim, 2008), CpBV-H4(Gad

와 Kim, 2008), CpBV-lectin(Nalini 등, 2008) 등 여러 CpBV 유래 유전자들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 곤충의 면역 기능은 주로 미생물병원체에 대한 방어기작으로 미생물제제의 효과를 억제하는 주 요인이 된다(김 등, 2008). 그래서 면역을 억제할 수 있는 물질과 혼합은 다양한 미생물제제의 효과를 제고시키는 효과를 기대할 수 있다.

본 연구는 베쿨로바이러스의 효과를 제고시키기 위해 곤충의 면역을 억제시킬 수 있는 CpBV 유래 유전자들을 응용하였다. 즉, 이들 CpBV 유전자 각각을 베쿨로바이러스에 클로닝하여 재조합 베쿨로바이러스를 제작하였다. 이를 통해 CpBV 유래 유전자의 대상 해충 면역억제 효과를 기대하고, 살충 병원력은 베쿨로바이러스로부터 기대한다는 가설을 세웠다. 이들 재조합베쿨로바이러스의 병원력 분석은 배추좀나방과 파밤나방(*Spodoptera exigua*)을 대상으로 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 곤충 사육

배추좀나방 유충은 배추잎으로 실내 조건(25°C, 16:8 (L:D)h)에서 누대 사육되었다. 파밤나방은 안동지역에서 채집된 유충을 인공사료(Gho 등, 1991)로 14년간 상기 조건의 실내에서 누대 사육한 집단을 이용하였다. 두 종의 성충은 모두 먹이로 10% 설탕물을 공급받았다.

### CpBV 유전자 선별 및 전달벡터 클로닝

CpBV 유전자 가운데 면역억제 기능이 밝혀진 7개(CpBV-

**Table 1.** Primers used to clone different CpBV genes into pBacPAK8/9 transfer vectors

CpBV genes		Sequence (5'→3')
EGFP	FP	CCGGTCCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCG
	RP	CGCGGGTACCTTACTTGTACAGCTCG
CpBV15 $\alpha/\beta$	FP	CCGGTCCTCGAGATGAATACTTTCTTGTTTTTG
	RP	CGCGGGTACCTTAATTACGTTTAGGCTCAGTGA
ELP	FP	ATGTTCAACAAAGTAGTCTTCATTG
	RP	TTGCAGCCGATAACTAGGACTTAATG
H4	FP	GGATCCATGGCTGATCATCTAAAGG
	RP	GAATTCTCAACCTCCATAACCATAGATC
Ikb	FP	CTCGAGATGAATAAGTCAAATATAGTA
	RP	GCATGCCAACTGAAGCCTTTGAGTCTT
Lectin	FP	CCGGTCCTCGAGATGAGTATTGGGAAGAGACT
	RP	CGCGGGTACCTTACACGCTTGTGCAGAAGAAGG
PTP	FP	GCGCCCCGGGATGGGCGCGAAATTCAC
	RP	CGCGGTACCTTAAAGCCTATCAGCAACTAAGCTAGC

PTP1, CpBV-IkB3, CpBV15 $\alpha$ , CpBV15 $\beta$ , CpBV-ELP1, CpBV-lectin, CpBV-H4)의 유전자가 선별되었다. 이 유전자들의 ORF(open reading frame)가 특이적 프라이머(Table 1)로 각각 증폭되었다. 이들 프라이머들은 서로 다른 제한효소 부위를 각각 정방향 및 역방향 프라이머에 부착시켜 대상 유전자를 증폭하였다. 이렇게 증폭된 DNA는 프라이머에 지정된 두 제한효소로 자른 후, pBacPAK8/9(Clonetech, USA)의 다각체단백질 프로모터에 위치한 다중클로닝 부위에 Jung 등(2006)의 방법에 따라 재조합되었다.

### 재조합베쿨로바이러스 제작 및 증식

재조합된 pBacPAK8/9은 Je 등(2001)의 방법에 따라 pApGOZA와 공동으로 Sf9 세포에 주입시켰으며, 재조합된 베쿨로바이러스를 플라크 분석(O'Reilly 등, 1992)으로 선별하였다. 즉, 약  $1 \times 10^6$  Sf9 세포를 60 mm 직경의 배양용기에 담은 후 27°C에서 30 분간 배양시켰다. 한편 1  $\mu$ g의 pApGOZA DNA는 4  $\mu$ g의 pBacPAK8/9과 함께 100  $\mu$ L의 incomplete TC-100 배양액과 혼합하였으며, 다른 튜브는 20  $\mu$ g의 CellfectinTM(Invitrogen, USA)을 100  $\mu$ L의 incomplete TC-100 배양액과 혼합한 후 이 두 튜브를 섞었다. 이 혼합 용액을 실내온도에서 45 분간 배양시켰고 한 방울씩 배양된 Sf9 세포에 처리하고 27°C에서 5 시간 배양하였다. 이후 다시 이 세포는 10% fetal bovine serum이 포함된 TC-100 배양액에서 5일 동안 배양했다. 이후 500  $\times$  g에서 5분간 원심 분리한 후 바이러스가 포함된 상등액을 수거하여 4°C에서 보관하였다.

### 베쿨로바이러스 생물검정

**1차 스크리닝.** 배추잎에 일정한 농도의 야생형 또는 재조합 베쿨로바이러스(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus: AcNPV)를 처리하고 대상 유충에게 섭식시켜 살충율로 병원성 검사를 실시하였다. Sf9 세포주에서 증식된 다각체형 바이러스( $7 \times 10^7$  PIB/ml) 10  $\mu$ L를 5  $\times$  5 mm의 배추 잎 조각에 처리하였다. 이를 직경 3 cm의 원형 용기에 여과지를 깔고 올려놓았다. 처리된 배추잎 주변으로 10마리의 2령 유충을 옮겨 놓고 처리된 잎이 모두 섭식되도록 5시간 방치하였다. 동일한 처리가 3반복되었다. 이후 3-4마리씩 나누어 배추좀나방은 배추, 파밤나방은 인공사료로 사육되었다. 처리 후 24시간 마다 치사된 개체를 조사하였다. 이때 치사 유충은 외부 자극에 대해서 능동적 반응 움직임이 없는 개체로 규정하였다.

**ELP 재조합 베쿨로바이러스 검정.** 이 재조합 바이러스의 농도별 병원력을 조사하기 위해 225, 2,250, 22,500 PIB/ $\mu$ L의 농도로 상기와 동일한 방법으로 처리했다.

**ELP 재조합 베쿨로바이러스 포트 방제 실험.** 본 재조합 바이러스 살포에 따른 방제 효과를 규명하기 위해 포트에서 높이 약 15 cm로 자란 배추에 각각 30마리의 2-3령의 파밤나방을 접종하였다. 다음 날 생존 밀도를 파악한 후 100 mL의 바이러스 용액(400 PIB/ $\mu$ L)을 세 포기(=반복)의 배추에 살포했다. 대조약제로서 배추에 발생하는 파밤나방 방제용 약제인 에마펙틴 벤조에이트 유제(에이팜<sup>®</sup>, 신젠타, 서울) 1,000 ppm을 동일한 부피로 살포하였다.

### 통계분석

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM(SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석후 처리평균간 비교를 실시하였다. 반수치사시간(median lethal time: LT<sub>50</sub>)은 Finney의 probit 분석법(Raymond, 1985)을 이용하여 산출하였다.

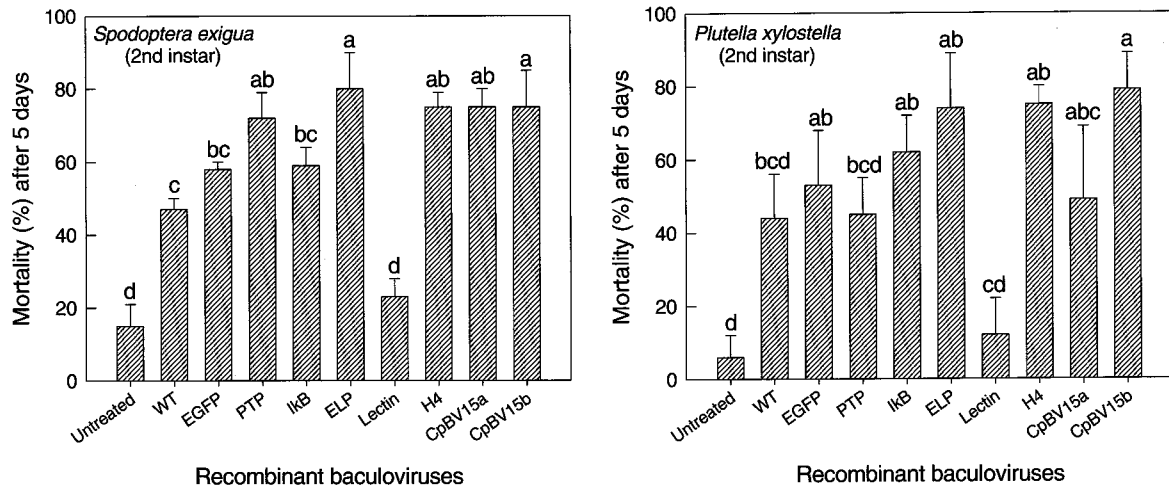
### 결 과

#### 재조합 베쿨로바이러스 1차 스크리닝

CpBV 유래 7개의 면역억제 유전자가 AcNPV의 다각체 프로모터에 재조합되었다. 이렇게 재조합된 베쿨로바이러스는 여러 연구에서 재조합된 유전자가 이 바이러스에 감염된 곤충에서 발현한다고 보고하였다(Jung 등, 2006; Lee와 Kim, 2008). 발현이 확인된 재조합 바이러스의 동일한 농도를 이용하여 파밤나방과 배추좀나방의 2령을 대상으로 병원력을 비교하였다(Fig. 1). 두 대상 곤충 모두에서 CpBV-lectin 유전자를 제외하고 모든 CpBV 유래 유전자가 재조합된 베쿨로바이러스는 야생형('WT') 또는 EGFP 재조합 바이러스와 비등하거나 또는 증가된 병원력을 나타냈다. 이들의 병원력을 치사속도로 분석한 결과(Table 2)를 살펴보면 유사한 경향을 나타내고 있다. 특별히 CpBV-ELP 유전자가 재조합된 베쿨로바이러스 병원력도 높게 나타났고, 치사속도도 약 2일에서 2.5일을 단축시키는 효과를 주었다.

#### CpBV-ELP 재조합 베쿨로바이러스 병원력 검정

비교 분석된 재조합 바이러스 가운데 CpBV-ELP가 두 곤충에 대해 가장 높고 빠른 병원력을 보여, 다음 단계로서 이 바이러스의 농도별 병원력 변화가 분석되었다(Fig. 2). 분석된

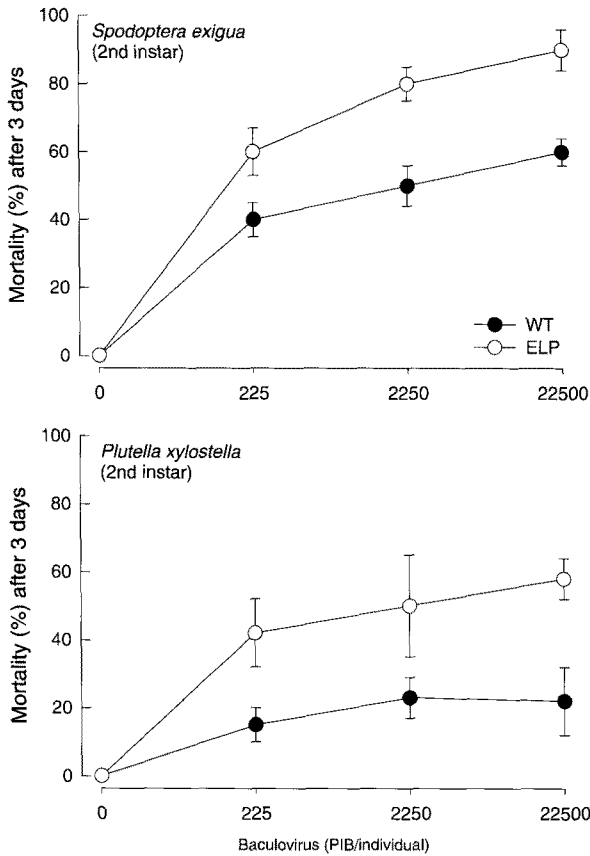


**Fig. 1.** Bioassay of seven recombinant AcNPVs against two lepidopteran larvae by oral administration. The virus suspension ( $7 \times 10^7$  PIB/ml) in 10  $\mu$ L was loaded on a piece of cabbage ( $5 \times 5$  mm), which were fed by 10 test larvae per replication for  $\approx 5$  h. Each treatment was replicated three times. Different letter above standard deviations represent significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). Wild type ('WT') and enhanced green fluorescence protein ('EGFP') baculoviruses were used for treated controls. All genes for constructing recombinants were derived from *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV): 'CpBV15 $\alpha$ ', 'CpBV15 $\beta$ ', CpBV-ELP1 ('ELP'), CpBV-H4 ('H4'), CpBV-IkB3 ('IkB'), CpBV-lectin ('Lectin'), and CpBV-PTP1 ('PTP').

**Table 2.** Comparative pathogenicities of different recombinant baculoviruses against two lepidopteran pests in terms of median lethal time (LT<sub>50</sub>). Wild type ('WT') and enhanced green fluorescence protein ('EGFP') baculoviruses were used for treated controls. All genes for constructing recombinants were derived from *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV): 'CpBV15 $\alpha$ ', 'CpBV15 $\beta$ ', CpBV-ELP1 ('ELP'), CpBV-H4 ('H4'), CpBV-IkB3 ('IkB'), CpBV-lectin ('Lectin'), and CpBV-PTP1 ('PTP').

Recombinant type of AcNPV	N	LT <sub>50</sub> (days)	95% confidence interval	Slope
<i>Plutella xylostella</i> (2nd instar)				
WT	30	5.32	4.64-7.31	5.70±1.45
EGFP	30	4.47	3.67-6.28	2.83±0.06
CpBV15 $\alpha$	30	6.05	4.68-11.50	2.85±0.73
CpBV15 $\beta$	30	3.37	1.92-6.04	3.09±1.10
ELP	30	3.22*	2.72-3.90	3.08±0.55
H4	30	2.67	1.53-4.61	3.00±0.99
IkB	30	4.69	4.37-5.23	10.35±2.28
Lectin	30	10.20	6.22-29.72	3.12±1.45
<i>Spodoptera exigua</i> (2nd instar)				
WT	30	5.07	4.53-6.40	6.66±1.62
EGFP	30	4.56	4.11-5.39	6.17±1.29
CpBV15 $\alpha$	30	4.24	2.06-9.37	2.93±1.22
CpBV15 $\beta$	30	3.68	1.40-9.68	5.98±6.05
ELP	30	2.46*	2.02-2.92	2.99±0.50
H4	30	4.24	3.97-4.55	11.19±2.05
IkB	30	4.78	4.01-6.59	3.44±0.74
Lectin	30	5.75	5.11-10.62	9.94±3.68
PTP	30	3.24	2.77-3.84	3.43±0.59

Asterisks after LT<sub>50</sub> indicate significant difference between treatment and WT control by non-overlapping of 95% confidence interval.

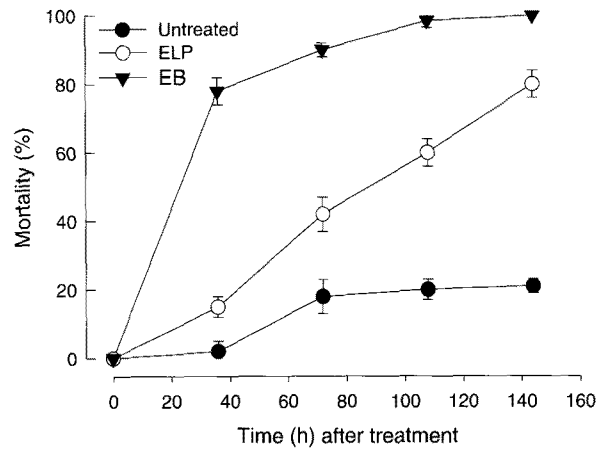


**Fig. 2.** Dose-mortality curves of a recombinant AcNPV containing CpBV-ELP against two lepidopteran larvae by oral administration. Different concentrations of the recombinant virus suspension in 10  $\mu$ L was loaded on a piece of cabbage (5  $\times$  5 mm), which were fed by 10 test larvae per replication for  $\approx$  5 h. Error bars represent standard deviations of three replications. Wild type ('WT') baculovirus was used for treated control.

모든 농도에서 CpBV-ELP 재조합 바이러스는 농도에 따른 병원력 상승을 보였으며, 야생형에 비해 모든 농도에서 살충력이 높았다. 이러한 병원력 상승효과는 두 나방류에 대해서 모두 나타났으며, 처리된 최고 농도(22,500 PIB/individual)에서는 야생형에 비해 약 2배 높은 살충력을 나타냈다.

**CpBV-ELP 재조합 베콜로바이러스의 살포에 따른 방제 효과**

이상의 섭식처리에 따라 ELP 재조합 바이러스의 살충력이 확인되었고, 다음으로 실제 살포에 따라 병원력을 발휘하는지를 검증하였다(Fig. 3). 이를 위해 비교적 병원력이 높게 나오는 파밤나방을 대상으로 포트 실험을 진행하였다. 대조 약제처리로서 현재 배추에 발생하는 파밤나방의 적용 약제인 에마멕틴 벤조에이트 유제를 추천농도로 바이러스 살포와 동일한 부피로 살



**Fig. 3.** Pot bioassay of a recombinant AcNPV containing CpBV-ELP against larvae of *Spodoptera exigua* by spray of the viral suspension (400 PIB/ $\mu$ L). The larvae were mostly 2nd-4th instars and infesting cabbage on pot (30 cm diameter). After 5 days after the spray, live larvae were counted to express mortality compared to density before treatment. Each treatment was replicated three times. Error bars represent standard deviations of three replications. Emamectin benzoate EC (1,000 ppm, Syngenta-Korea, Seoul) was used for treated control.

포하였다. 대조약제는 처리 3일 이후에 95% 이상의 살충력을 보였다. 재조합 바이러스는 5일이 경과했을 때 무처리에 비해 보강된 살충율로 산출하여 보면 약 75%의 방제력을 나타냈다.

**고 찰**

척추동물의 선천성 면역반응과 유사하게 작용하는 곤충의 면역반응은 세포성면역과 체액성면역으로 구분된다(Gillespie 등, 1997). 세포성 면역반응은 혈구에 의한 작용으로서 식균작용, 소낭형성 및 피막형성으로 병원체의 크기와 밀도에 따라 다양하게 발현된다(Lavine과 Strand, 2002). 체액성 면역반응은 라이소자임, 세크로핀, 드로소마이신과 같은 세균과 진균에 대한 항생펩타이드의 화학적 방어 반응을 포함하게 된다(Meister 등, 2000; Lowenberger, 2001). 현재 해충의 방제제로 사용하고 있는 미생물농약은 Bt와 같은 세균, *Beauveria*와 같은 진균 또는 베콜로바이러스와 같은 바이러스로서 곤충은 이를 방어하기 위해 다양한 면역 반응으로 대처하게 된다. 이러한 대상 곤충과 상호 작용 속에 미생물농약은 자신의 방제 효과를 나타내게 된다. 자연히 곤충의 면역억제를 유도하는 물질은 이러한 미생물 방제제의 효과를 증진시킬 수 있게 된다.

플리드나바이러스는 나비목 곤충의 면역을 억제시킬 수 있는 발현체 유전자를 지니고 있다(Webb과 Strand, 2005).

본 연구에서 선발한 7종의 CpBV 유래 유전자는 모두 곤충의 면역을 교란하는 기능을 보유하였다. 예를 들어, CpBV15β는 혈구의 활착 반응을 억제시켜 세포성 면역을 무력화시키며(Nalini와 Kim, 2007), CpBV-ELP1은 혈구세포 수의 감소를 초래하여 면역억제를 유도하며(Kwon과 Kim, 2008), CpBV-H4는 기주 히스톤 H4의 유사체로서 혈구세포의 행동을 억제시키며(Gad와 Kim, 2008), CpBV-IkB는 현재로서 정확히 기능을 알 수 없으나, 배추좀나방 항바이러스 기작을 억제시키는 인자로서 추정되고 있으며(김 등, 2006), CpBV-lectin은 혈구세포의 인식 작용을 억제하며(Lee 등, 2008), CpBV-PTP1은 혈구응집 및 소낭형성을 억제하는 인자로서 밝혀졌다(Ibrahim과 Kim, 2008). 본 연구는 이러한 면역억제 인자를 생물적 방제인자인 베쿨로바이러스에 재조합하여 처리함으로써 베쿨로바이러스가 가지고 있는 방제적 단점인 느린 치사속도, 기주 특이성에 기인된 좁은 대상 해충 범위를 극복할 것으로 기대하였다.

재조합된 베쿨로바이러스는 Sf9 세포에서 발현이 되었으며, 상기에 기술한 선행 연구들에서 대상 곤충에서 모두 발현이 입증되었다. 이러한 배경과 조건에서 동일한 농도로 섭식 처리한 결과 CpBV-lectin을 제외하고 모두 야생형 베쿨로바이러스와 유사하거나 우수한 방제 효과를 나타냈다. 이 가운데 CpBV-ELP 유전자는 치사속도를 뚜렷하게 높여주는 효과를 주어 이상적 재조합 바이러스로 추천되어 추후 분석이 이뤄졌다. 흥미로운 것은 CpBV-lectin 유전자가 재조합된 베쿨로바이러스는 오히려 병원력을 크게 감소시켰다. 이에 대한 원인은 현재로서 알 수 없으나, 다른 유전자들도 같은 위치에 재조합되었기 때문에 이는 이 유전자의 특징으로 볼 수 있다. CpBV-lectin 유전자는 C-type 렉틴 단백질로서  $Ca^{++}$  농도에 민감했고, rat RBC에 특이적으로 혈구응집반응을 보였으며, N-acetyl-D-glucosamine과 N-acetyl neuramic acid에 특이적 탄수화물 선호성을 보였다(Nalini 등, 2008). 기생체에서는 기생봉 알표면에 위치했으며, 혈구와의 결합은 보이지 않아, 기주의 면역렉틴과 경쟁적으로 기생봉의 인식 부위를 선점하는 면역회피 기작과 연계되었을 것으로 추정하였다(Nalini 등, 2008). 이러한 CpBV-lectin의 성질을 미뤄 이 단백질이 베쿨로바이러스와 결합하여 혈구로부터 인식은 회피하게 할 수 있지만, 베쿨로바이러스의 다음 활동(예, 세포침입)을 억제시켜 병원력을 감소시키지 않았나 사려된다. 이에 대한 연구는 이 야생형 베쿨로바이러스와 CpBV-lectin 단백질의 결합 반응 및 이후 병원력 감퇴를 확인한 후에야 해석될 수 있다.

CpBV-ELP를 이용하여 병원력이 제고된 재조합 베쿨로바이러스의 농도별 및 살포에 따른 병원력 발현이 분석되었다.

재조합 바이러스의 농도에 따라 두 나비목 해충에 대해서 살충력이 높아졌으며, 포트에 재배된 배추에 살포하여 파밤나방을 대상으로 80% 이상의 살충력을 보였다. CpBV-ELP는 현재까지 밝혀진 CpBV 계통 유전자 서열을 바탕으로 전체 7개가 알려졌었다(Kim 등, 2007). ELP 유전자는 *Cotesia* 속 속한 폴리드나바이러스에서만 알려지고 있다(Espagne 등, 2004). 본 연구에 이용된 CpBV-ELP1은 CpBV가 함유하고 있는 이들 유전자 가운데 가장 발현 기간이 길고 조사된 모든 조직에서 발현되어 선발되었다(Kwon과 Kim, 2008). 일반적으로 베쿨로바이러스 병원성은 증장을 통한 침입 이후 증장에 붙어 있는 기관지세포로 전이되어 온몸으로 전파되는 것으로 알려지고 있다(Washburn 등, 1995, 2001; Kirkpatrick 등, 1998). 즉, 증장세포가 베쿨로바이러스 체내 침입의 주요 관문이 되어, 이들 세포의 항바이러스 기작은 이에 대한 병원성을 낮출 수 있다. 항바이러스 기작은 세포치사에 따른 새로운 증장세포로의 재생이 여러 나비목 곤충에서 보고되었다(Federici와 Rice, 1997; Clem, 2001). 또한 침입된 증장세포를 혈구세포의 세포성 면역기작에 의해 바이러스 전파를 억제하는 것이 항바이러스 기작으로 알려졌다. CpBV-ELP의 높은 혈구치사 효과는 대상 곤충의 혈구수를 감소시키며, 이는 다시 바이러스에 대한 세포성 면역기작을 무력화시키는 효과를 가져옴으로 재조합 바이러스의 병원력을 높여 주게 된다고 해석할 수 있다. 이에 대한 기작적 연구가 추후 진행되어야겠다. 또한 본 연구에서 보여준 다른 재조합 바이러스의 경우도 우수한 병원력 상승을 기대할 수 있어 곤충의 면역반응이 복잡하며, 이들 CpBV 유전자의 면역 작용점이 상이하기 때문에 이들 면역억제 유전자의 혼합 처리에 따른 시너지 방제 효과 제고를 기대해 볼 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 단기핵심기술사업으로부터 지원받아 수행되었다. 권보원과 배성우는 교육부 2단계 BK21 사업에서 지원받았다. 본 연구의 산물인 CpBV-ELP 재조합 베쿨로바이러스는 특허출원하였다.

## >> 인 / 용 / 문 / 헌

Basio, N. A. M and Y. Kim (2006) Additive effect of teratocyte and calyx fluid from *Cotesia plutellae* on immunosuppression of *Plutella xylostella*. *Physiol. Entomol.* 31:341~347.

- Clem, R. J. (2001) Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ.* 8:137~143.
- 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* 306:286~289.
- Federici, B. A. and R. H. Rice (1997) Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of the *Anagrapha falcifera* multinucleocapsid NPV. *Arch. Virol.* 142:333~348.
- Gad, W. and Y. Kim (2008) A viral histone H4 encoded by *Cotesia plutellae* bracovirus inhibits haemocyte-spreading behaviour of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Gen. Virol.* 89:931~938.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost and T. Trenczek (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42:611~643.
- Gho, H. K., S. G. Lee, B. P. Lee, K. M. Choi and J. H. Kim (1991) Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. *Korean J. Appl. Entomol.* 29:180~183.
- Ibrahim, A. M. A. and Y. Kim (2006) Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Insect Physiol.* 52:943~950.
- Ibrahim, A. M. A. and Y. Kim (2008) Transient expression of protein tyrosine phosphatases encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus inhibits insect cellular immune responses. *Naturwissenschaften* 95:25~32.
- Je, Y. H., J. H. Chang, J. Y. Rho and B. R. Jin (2001) Generation of baculovirus expression vector using defective *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome maintained in *Escherichia coli* for Occ<sup>+</sup> virus production. *Int. J. Indust. Entomol.* 2:155~160.
- Jung, S., M. Kwoen, J. Y. Choi, Y. H. Je and Y. Kim (2006) Parasitism of *Cotesia* spp. enhances susceptibility of *Plutella xylostella* to other pathogens. *J. Asia-Pac. Entomol.* 9:255~263.
- Kim, Y., J. Y. Choi and Y. H. Je (2007) *Cotesia plutellae* bracovirus genome and its function in altering insect physiology. *J. Asia-Pac. Entomol.* 10:181~191.
- Kim, Y. and S. Ryu (2007) Ultrastructure of *Cotesia plutellae* bracovirus in its replication at wasp ovarian calyx. *J. Asia-Pac. Entomol.* 10:357~361.
- Kirkpatrick, B. A., J. O. Washburn and L. E. Volkman (1998) AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* 72:63~72.
- 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 genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. *Annu. Rev. Entomol.* 49:431~456.
- Kwon, B. and Y. Kim (2008) Transient expression of an EPI-like gene encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses the hemocyte population in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Dev. Comp. Immunol.* 32:932~942.
- Lavine, M. D. and M. R. Strand (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1295~1309.
- Lee, S., N. A. Basio, D. S. Kim and Y. Kim (2005) Proteomic analysis of parasitization by *Cotesia plutellae* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Asia-Pac. Entomol.* 8:53~60.
- Lee, S. and Y. Kim (2008) Two homologous parasitism-specific proteins encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus and their expression profiles in parasitized *Plutella xylostella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 67:157~171.
- Lee, S., M. Nalini and Y. Kim (2008) A viral lectin encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus and its immunosuppressive effect on host hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 149A:351~361.
- Lowenberger, C. 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:219~229.
- Mackauer, M. and P. Sequeira (1993) Patterns of development in insect parasites. pp. 1~23. In *Parasites and Pathogens of Insects* (Eds. N.E. Beckage, S.N. Thompson and G.A. Federici). Academic Press, New York.
- Meister, M., C. Hetru and J. A. Hoffmann (2000) The antimicrobial host defense of *Drosophila*. pp. 17~36. In *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System. Current Topics in Microbiology* (eds. L. Du Pasquier and G.W. Litman), Vol. 248, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Nalini, M., J. Y. Choi, Y. H. Je, I. Hwang and Y. Kim (2008) Immuno-evasive property of a polydnoviral product, CpBV-lectin, protects the parasitoid egg from hemocytic encapsulation of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Insect Physiol.* 54:1125~1131.
- Nalini, M. and Y. Kim (2007) A putative protein translation inhibitory factor encoded by *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses host hemocyte-spreading behavior. *J. Insect Physiol.* 53:1283~1292.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V.A. Luckow (1992) *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Oxford University, New York.
- Quicke, D. L. J. (1997) *Parasitic Wasps*. Chapman & Hall, U.K.
- Raymond, M. (1985) Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORS-TOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 22:117~121.
- SAS Institute, Inc. (1989) *SAS/STAT user's guide*, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Webb, B. A. 1998. Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. pp. 105~139. In *The Insect Virus* (eds. L.K. Miller and L.A. Balls). Plenum, New York.

- Washburn, J. O., B. A. Kirkpatrick and L. E. Volkman (1995) Comparative pathogenesis of *Authographa californica* M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology* 209:561~568.
- Washburn, J. O., J. F. Wong and L. E. Volkman (2001) Comparative pathogenesis of *Helicoverpa zea* S nucleopolyhedrovirus in noctuid larvae. *J. Gen. Virol.* 82:1777~1784.
- Webb, B. A. and M. R. Strand (2005) The biology and genomes of polydnavirus. pp. 323~360. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (eds. L.I. Gilbert, K. Iatrou and S.S. Gill),

Elsevier, New York.

- 김용균, 배상기, 이선영 (2004) 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*) 폴리드나바이러스 복제와 산란 습성. *한응곤지* 43:225~231.
- 김용균, N. Basio, A. M. A. Ibrahim, 배성우 (2006) 프루텔고치벌 브라코바이러스 (*Cotesia plutellae* bracovirus) 유래 Ikb 유전자 구조와 피기생 배추좀나방 (*Plutella xylostella*) 체내 발현 패턴. *한응곤지* 45:15~24.
- 김지민, M. Nalini, 김용균 (2008) 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대한 곤충병원세균류 배양액의 곤충면역억제활성 및 비티 생물농약과 혼합효과. *농약과학회지* 12:184~191.

## 폴리드나바이러스(CpBV) 유래 면역억제 유전자를 이용한 베쿨로바이러스 병원력 제고 기술

김용균\* · 권보원<sup>1</sup> · 배성우 · 최재영<sup>2</sup> · 제연호<sup>2</sup>

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과, <sup>1</sup>(주) 경농 중앙연구소, <sup>2</sup>서울대학교 농업생명과학대학 곤충학과

**요 약** 베쿨로바이러스는 일부 나비목 해충을 대상으로 방제하는 데 사용되고 있다. 그러나 화학농약에 비해 느린 살충효과 및 좁은 적용 해충으로 응용 범위에 한계를 갖고 있다. 본 연구는 이러한 한계를 극복하고자 곤충의 면역억제를 통해 바이러스 병원력을 제고시킬 수 있는 기술을 소개한다. 폴리드나바이러스는 일부 맵시벌 및 고치벌에 공생하는 곤충 DNA 바이러스 분류군이다. 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*) 유래 CpBV(*Cotesia plutellae* bracovirus)는 브라코바이러스에 속한 폴리드나바이러스로서 면역억제를 발휘하는 여러 유전자를 함유하고 있다. 이 가운데 7개의 CpBV 유전자를 선별하고 이를 야생형 *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus(AcNPV)에 재조합하였다. 이들 재조합 베쿨로바이러스를 이용하여 파밤나방(*Spodoptera exigua*)과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)을 대상으로 생물검정한 결과, 이들 대부분은 야생형의 바이러스와 유사하거나 우수한 살충력을 나타냈다. 특히 CpBV-ELP를 포함한 재조합 베쿨로바이러스가 대조 바이러스에 비해 살충시간을 약 2 일 이상 단축시킴으로 가장 우수하였다. 이 재조합 베쿨로바이러스는 농도에 따른 살충력 증가와 배추를 가해하는 파밤나방을 대상으로 한 바이러스 살포 처리가 뚜렷한 방제효과를 나타내어 현장 적용 가능성을 제시하였다. 또한 본 연구는 이 재조합 바이러스의 살충력 제고 현상을 CpBV-ELP의 항바이러스 기작 억제라는 측면에서 고찰했다.

**색인어** 베쿨로바이러스, 프루텔고치벌, 배추좀나방, 폴리드나바이러스, 재조합체, 파밤나방