Original article KOREAN JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY

한국응용곤충학회지
Korean J. Appl. Entomol. 53(4): 331-338 (2014)
DOI: http://dx.doi.org/10.5656/KSAE.2014.09.0.041

ⓒ The Korean Society of Applied Entomology
pISSN 1225-0171, eISSN 2287-545X

바이러스 유래 시스타틴 재조합 단백질의 곤충 면역 및 발육 억제효과

김영태 · 엄성현 · 박지영 · 김용균*
안동대학교 생명자원과학과

Inhibitory Effects of a Recombinant Viral Cystatin Protein on Insect Immune and Development

Yeongtae Kim, Seonghyun Eom, Jiyeong Park and Yonggyun Kim*
Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

ABSTRACT: Cystatins (CSTs) are reversible and competitive inhibitors of C1A cysteine proteases, corresponding to papain-like cathepsins in plants and animals. A viral CST (CpBV-CST1) was identified from a polydnavirus, *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV). Our previous study indicated that a transient expression of CpBV-CST1 interfered with immune response and development of *Plutella xylostella* larvae. To directly demonstrate the protein function, this study produced a recombinant CpBV-CST1 protein (rCpBV-CST1) using bacterial expression system to determine its inhibitory activity against cysteine protease and to assess its physiological alteration in insect immune and development. The open reading frame of CpBV-CST1 encodes a polypeptide of 138 amino acids (≈ 15 kDa). rCpBV-cystatin protein in BL21 STAR (DE3) competent cells containing a recombinant pGEX4T-3:CpBV-CST1 was over-expressed by 0.5 mM IPTG for 4 h. In biological activity assay, the purified rCpBV-CST1 showed a significant inhibition against papain activity. It inhibited a cellular immune response of hemocyte nodule formation in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Moreover, its oral administration retarded larval development of the diamondback moth, *Plutella xylostella* in a dose-dependent manner. These results suggest that CpBV-CST1 may be applied to control insect pest populations.

Key words: Cystatin, Polydnavirus, Immune, Development, Recombinant protein

초 록: 시스타틴(cystatin: CST)은 C1A류 시스테인 단백질분해효소에 대한 경쟁적 가역억제자로서 동식물류에서 파파인과 같은 캐셉신을 억제 대상으로 작용하게 된다. 바이러스 유래 CST (CpBV-CST1)이 폴리드나바이러스의 일종인 CpBV (*Cotesia plutellae* bracovirus)에서 동정되었다. 기존 연구는 이 유전자의 과발현이 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 유충의 면역 및 발육을 교란한다는 것을 보여 주었다. 본 연구는 이 유전자의 단백질 기능을 분석하기 위해 세균발현시스템을 이용하여 재조합단백질(rCpBV-CST1)을 형성하여 단백질분해효소에 대한 활성억제효과를 결정하고, 곤충의 면역과 발육에 대한 생리적 억제효과를 분석했다. 이 유전자 번역부위는 138 개 아미노산으로 약 15 kDa 크기의 단백질로 추정되었다. CpBV-CST1이 먼저 pGEX 발현벡터에 재조합되고, BL21 STAR (DE3) competent cells에 형질전환된 후 0.5 mM IPTG로 4 시간동안 과발현되었다. 분리된 재조합단백질은 파파인에 대한 뚜렷한 억제효과를 나타냈다. 이 재조합단백질은 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대해서 혈구소낭형성의 세포성 면역반응을 억제하고, 경구로 처리할 때 배추좀나방의 유충발육을 처리 농도에 비례하여 제한시켰다. 이상의 결과는 CpBV-CST1이 해충 밀도 억제에 응용될 수 있음을 제시하고 있다.

검색어: 시스타틴, 폴리드나바이러스, 면역, 발육, 재조합단백질

시스테인 단백질분해효소 억제자(cysteine protease inhibitor: CSI)는 활성부위에 시스테인 아미노산을 보유하는 단백질분해효소에 대한 억제자로서 적어도 10 개 이상의 분류군으로 구별된다(Rawlings et al., 2004). 이 가운데 시스타틴(cystatin: CST)은 파파인과 같은 캐셉신(cathepsin) 단백질분해효소에 대한 경쟁적 가역억제자이며 I25의 CSI 분류군에 속하게 된다(Rawlings et al., 2004). 시스타틴은 아미노산 서열을 기준으로 크게 세 부류로 나뉜다(Rawlings and Barrett, 1990; Turk and

***Corresponding author:** hosanna@andong.ac.kr
Received July 18 2014; **Revised** September 14 2014
Accepted September 18 2014

The Korean Society of Applied Entomology (KSAE) retains the exclusive copyright to reproduce and distribute for all KSAE publications.
The journal follows an open access policy.

Bode, 1991). 제1형 시스타틴(I25A: cystatin A와 sarcocystatin)은 약 100 개의 아미노산으로 구성된 소형 단백질로 탄수화물이나 이황화결합이 존재하지 않는다. 제2형 시스타틴(I25B: cystatin C와 phytocystatin)은 약 120 개의 아미노산으로 구성된 분비형 단백질로 두 개의 이황화결합을 지니게 된다. 제3형 시스타틴(I25C: kininogen)은 혈장 또는 관절액에서 여러 생리기능의 거대 당단백질을 이루고 있다.

일반적으로 시스타틴은 체내 캐셉신 효소활성을 조절하며, 동물과 식물의 방어단백질로 알려지고 있다(Olsson et al., 1999; Dubin, 2005). 곤충에서도 누에(*Bombyx mori*)의 경우 캐셉신을 이용하여 대상 세포에 침입하는 병원체 또는 기생자에 대해서 시스타틴은 방어물질로서 작용하게 된다(Yamamoto et al., 1999). 더욱이 시스타틴은 단독으로도 항생제 역할을 담당할 수 있다. 투구게(*Tachypleus tridentatus*)에서는 이 시스타틴이 그람음성세균에 대해서 항생 능력을 보였다(Agarwala et al., 1996). 중증열성혈소판감소증후군 병원 바이러스를 매개하는 작은소참진드기(*Haemaphysalis longicornis*)에서는 이 시스타틴이 원생동물 병원체의 증식을 억제하는 항생 효과를 나타냈다(Zhou et al., 2006).

최초의 바이러스 시스타틴은 폴리드나바이러스(polydnavirus: PDV)의 일종인 *Cotesia congregata* bracovirus (CcBV)에서 보고되었다(Espagne et al., 2005). 유사한 바이러스 시스타틴 유전자들이 *Glyptapanteles indiensis* bracovirus, *G. flavicoxis* bracovirus, *C. plutellae* bracovirus (CpBV)에서 발견되었다(Abrahamson et al., 2003; Desjardins et al., 2008; Chen et al., 2011). 이 PDV는 맵시벌 및 고치벌과에 속한 일부 내부기생봉의 공생바이러스로서 이중나선형 DNA 바이러스 구조를 지니며 기주 기생봉의 성공적 기생에 필수적 역할을 담당한다(Kim, 2006).

CpBV는 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)에 공생하는 PDV로서, 바이러스 입자에 포함된 게놈은 157 개의 단백질 유전자를 암호하고 있으며, 이 가운데 시스타틴을 4 개 함유하고 있다(Kim et al., 2013). 이들 시스타틴 가운데 2 개는 동일한 서열을 나타내어 CpBV-CST1, CpBV-CST2, CpBV-CST3로 구분되며, 이 가운데 피기생체에서 CpBV-CST2는 발현되지 않고 CpBV-CST1과 CpBV-CST3만 발현된다. CpBV-CST1을 비기생 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 유충에 일시발현시킨 결과 면역억제 및 발육 저하를 가져왔다(Kim et al., 2013). 이러한 결과는 CpBV-CST1을 이용하여 해충 방제에 이용할 수 있는 가능성을 제기하였다.

본 연구는 CpBV-CST1을 섭식으로 처리할 경우 해충에 대한 발육 억제를 유도할 수 있는 지를 분석하기 위해 이 유전자의 재조합단백질을 형성하였다. 이 재조합단백질이 시스타틴의 활성을 보이는 지를 조사하기 위해 파파인을 대상으로 단백질분해활성 억제를 측정하였다. 이를 바탕으로 해충의 면역 및 발육 억제를 단백질 수준에서 분석하여 궁극적으로 해충 방제의 수단으로 응용하는 데 기초자료를 얻기 위해 진행되었다.

재료 및 방법

시험곤충

배추좀나방(*P. xylostella*)은 안동시 송천동에 소재한 배추 포장에서 채집한 유충을 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 사용하였다. 유충은 온도 25±1℃, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40 ~ 60%의 조건에서 배추를 먹이로 사육하였다. 성충은 10% 설탕물을 먹이로 공급하고 배추 잎을 이용하여 산란을 유도하였다. 파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 배추좀나방과 같은 조건에서 인공사료(Goh et al., 1990)를 이용하여 Seo et al. (2011)의 방법으로 사육하였다.

CpBV-CST1 재조합 발현벡터 클로닝

기존에 클로닝된 CpBV-CST1 cDNA (Kim et al., 2013)를 이용하여 특이적 프라이머(5'-GGAATTCATGTGCAAGGAATATCGAGTA-3'와 5'-CCGCTCGAGTTAATTTGAATCATCAATTT-3': 여기서 밑줄은 EcoRI과 XhoI 인식서열)를 통해 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 1분 조건으로 35회 PCR을 수행하여 open reading frame (ORF) 영역을 증폭하였다. 이 PCR 산물을 pCR2.1 클로닝벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 삽입하고 대장균에 형질전환시킨 후, CpBV-CST1의 삽입이 확인된 균총을 선발하였다. 이후 이 선발 균총을 LB-ampicillin 액체배지에서 배양하고 플라즈미드를 분리하여 제한효소 EcoRI과 XhoI로 절단하였다. 절단된 ORF cDNA를 동일한 제한효소로 절단시킨 pGEX4T-3 벡터(Invitrogen)에 재조합시키고, 대장균 BL21 (DE3) 균주에 형질전환하였다. 이후 유전자 서열 분석으로 삽이 부위를 결정한 후 재조합단백질을 형성하는 균주(BL21/pGEX4T-3-CpBV-CST1)로 사용하였다.

CpBV-CST1 단백질 발현과 분리

소량 배양한 재조합단백질 균주를 LB-ampicillin 액체 배지에 1/100 비율로 접종한 후 37℃에서 200 rpm으로 배양하여 OD_{600} 0.6-0.8에 이를 때 isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

(IPTG)를 최종농도 0.5 mM 이 되도록 첨가 후 4 시간 진탕배양하였다. 이후 12,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 증식된 세균을 얻고 여기에 10 mM EDTA와 1% Triton X-100가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 현탁시키고 열변성 처리 후 SDS-PAGE를 실시하여 재조합 단백질의 발현 유무를 대조구와 비교 확인하였다. 응결체(inclusion body)로 형성된 재조합단백질의 refolding을 위해 protein refolding kit (Novagen, Damstadt, Germany, USA)를 이용하였다. 이에 따라 용해된 단백질을 rCpBV-CST1으로 명명하고 효소 활성 분석 및 생물검정 시료로 사용하였다.

MALDI-TOF 분석

SDS-PAGE 상에서 분석 대상 단백질 밴드를 절취하여 trypsin으로 가수분해하여 단편화하고, MALDI-TOF (Microflex LRF20, Bruker Daltonics Korea, Seongnam, Korea)에 의한 질량분석과 PMF (peptide mass fingerprinting) 기반으로 Mascot database (www.matrixscience.com)를 이용하여 단백질을 동정하였다. MALDI-TOF 분석은 안동대학교 공동실험실습실에서 이뤄졌다.

시스타틴 효소 활성 분석

rCpBV-CST1 단백질의 단백질분해효소 활성억제 효과를 분석하기 위하여 rCpBV-CST1 단백질 25 μg과 papain 0.6 unit을 혼합하여 25℃에 10 분간 반응시켰다. 여기에 기질 용액(30 mM $CaCl_2$, 0.5 mM N-α-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide, 100 mM Tris-HCl, pH 6.8)을 첨가하여 전체가 200 μl 로 채운 후 37℃에서 30 분간 반응시켰다. 이후 30% 빙초산 용액으로 반응을 중지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정했다. 대조구로 GST (glutathione-S-transferase)를 rCpBV-CST1과 동일한 농도로 처리하였다.

소낭형성 분석

세포성 면역반응의 일환으로 세균 침입에 따른 혈구의 소낭형성 반응을 네 종류의 곤충에 대해서 분석했다. 대장균(*E. coli* Top10)을 LB 배지에서 증식시키고 5×10^4 세균 세포수를 대상 곤충의 혈강으로 주입하였다. 혈강 주입은 유리 모세관을 이용하여 초미량펌프가 장착된 미세조정장치(SYS-microcontroller, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 주입하였다. 유리 모세관은 micropipette puller (PN-30, Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 제조하였다. 세균이 주입된 유충은 곤충 증식 조건(온도 25±1℃, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%)에서 8 시간 배양시켰다. 이후 4℃로 옮긴 후 소낭형성 반응을 정지시켰다. 이후 각 처리 곤충을 해부하여 형성된 소낭을 해부현미경 50 배 배율에서 관찰했다. 형성된 소낭 수는 먼저 소화관 주변 및 기관지에 붙어 있는 것들을 계수하고, 이후 소화관을 적출하고 가려진 몸 부위에 존재했던 소낭을 추가로 계수하여 산출하였다. 각 소낭 분석은 처리 개체를 반복으로 각 처리는 5 마리로 구성되었다.

재조합단백질 생물검정

rCpBV-CST1 단백질을 100 mM 인산완충용액(PBS, pH 7.4)으로 다양한 농도로 희석하였다. 희석액에 배춧잎(1 cm^2)을 10 분간 침지시킨 후 여과지가 깔려진 용기(직경 9 cm)에서 5 분간 건조시켰다. 각 배추 잎에 갓 부화한 배추좀나방을 10 마리씩 3 반복으로 처리하였으며, 24 시간 주기로 용화될 때까지 처리 배추잎을 제공하였다. 이후 형성된 용수와 용화 직후 용무게를 각각 측정하였다. 대조구는 PBS로 상기와 동일하게 처리하였다. 용화율 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다.

결 과

CpBV-CST1 재조합 단백질(rCpBV-CST1) 발현 및 분리

CpBV-CST1의 발현을 위해 약 26 kDa 크기의 glutathione-S-transferase (GST)와 결합된 재조합단백질을 형성하는 pGEX 발현 벡터를 이용하였다(Fig. 1A). 재조합된 발현벡터를 단백질 발현전용 BL21 대장균 균주를 이용하여 과발현시켰다(Fig. 1B). 형성된 재조합단백질은 응결체로 구성되어 변성 및 재결합 방식을 이용하여 용해된 순수 단백질을 얻었다. SDS-PAGE 상에서 분리된 단백질은 p37로 추정되었으며, 이를 MALDI-TOF로 분석한 결과 CpBV-CST1과 일치하였다(Table 1). 그러나 분리된 단백질에 p30 영역에서 부가적으로 과발현된 단백질이 약 5% 정도(단백질 염색 세기 면에서)로 포함되었다. 이 단백질을 분석하기 위해 MALDI-TOF로 조사한 결과 GST 단백질 서열을 포함하고 있어, 아마도 과발현된 CpBV-CST1의 분해물 또는 미완성 단백질로 추정된다. 즉, 분리된 rCpBV-CST1은 95%가 완전한 형태의 재조합단백질을 포함하고 있다는 것을 의미했다.

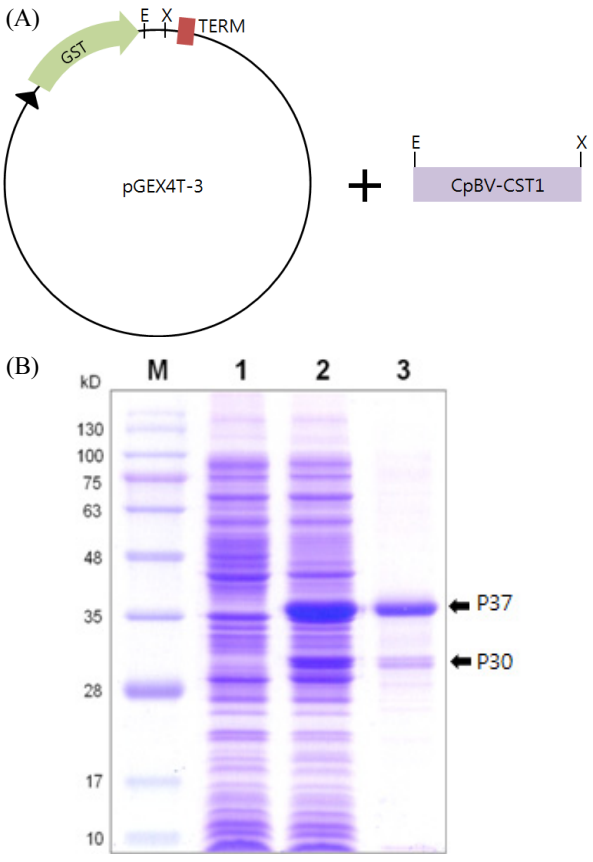

Fig. 1. Recombinant CpBV-CST1 ('CpBV-CST1'). (A) Cloning of rCpBV-CST1 to pGEX4T-3 expression vector. Directional cloning of CpBV-CST1 open reading frame to the vector using EcoRI ('E') and XhoI ('X'). Arrow head on the vector map indicates a promoter responding to LacI inhibitor. 'GST' represents glutathione-S-transferase. Square indicates a transcription terminator. (B) Over-expression and purification of rCpBV-CST1. The proteins were separated on 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie dye: lane M for protein standard markers, lane 1 for uninduced total cell protein, lane 2 for induced total cell protein, and lane 3 for partially purified rCpBV-CST1.

rCpBV-CST1의 시스타틴 활성

파파인 단백질 분해효소를 대상으로 rCpBV-CST1의 억제 효과를 분석했다(Fig. 2). 대조구로서 재조합단백질 생성 때 연결된 GST를 이용하였다. rCpBV-CST1은 대조구에 대비 파파인 단백질분해능력을 약 75% 이상 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 세균에서 발현한 rCpBV-CST1이 시스타틴의 활성을 지니는 것을 의미했다.

rCpBV-CST1의 곤충면역억제 효과

시스타틴 활성을 지니는 rCpBV-CST1 단백질을 이용하여 곤충 면역반응에 대한 영향을 분석했다(Fig. 3). 비교적 면역반

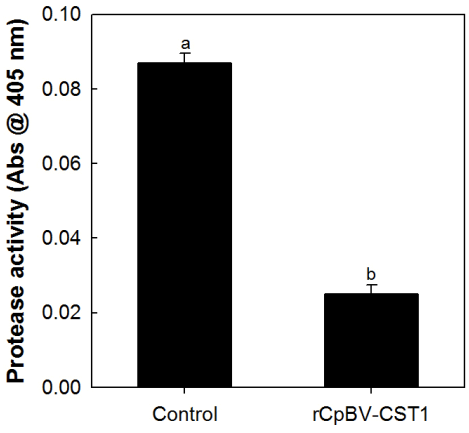

Fig. 2. Cystatin activity of a recombinant CpBV-CST1 (rCpBV-CST1). A reaction (200 μl) consisted of papain (0.6 units), BAPNA (0.5 mM), and rCpBV-CST1 (25 μg). Control used GST (25 μg) instead of rCpBV-CST1. Each treatment was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference between means at Type I error = 0.05 (LSD test).

Table 1. MALDI-TOF analysis of over-expressed proteins of a recombinant pGEX4T-3 containing CpBV-CST1 open reading frame

Proteins	Peptide fragments	MASCOT analysis		
		Match gene (MASCOT ID)	Species	Score[a]
P37	MSPILGYWKIKGLVQPTRLL LEYLEEKYEEHLYERDEGDKWR	Glutathione S-transferase (gi 595714)	*Escherichia coli*	199
	VAEARHSFVGGIQSISVDDSGVKEA AETIMRKINREYRG	Cystatin (gi 188484385)	*Cotesia vestalis* bracovirus	155
P30	FAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGAR	TEM-1b beta-lactamase (gi 284486667)	*Escherichia coli*	176
	MMVAEALGVKVDTVDVNLMK	Glutathione S-transferase (gi 595714)	*Escherichia coli*	78

[a]Score of MASCOT prediction, in which scores higher than 50 signifies identity or extensive homology ($p < 0.05$).

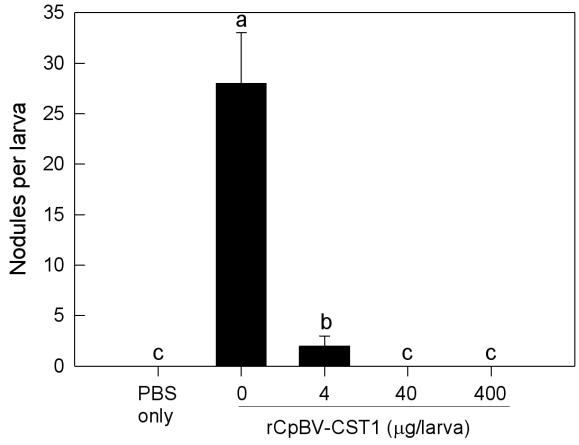

Fig. 3. Inhibitory effect of a recombinant CpBV-CST1 ('rCpBV-CST1') on hemocyte nodule formation in response to bacterial injection in the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*. Each larva was injected with *Escherichia coli* (5×10^4 cells) along with 1 μl of rCpBV-CST1. After 8 h incubation at 25°C, the treat larvae were analysed in nodule number. Control used PBS instead of the protein. Each treatment was replicated five times. Different letters above standard deviation bars indicate significantly difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

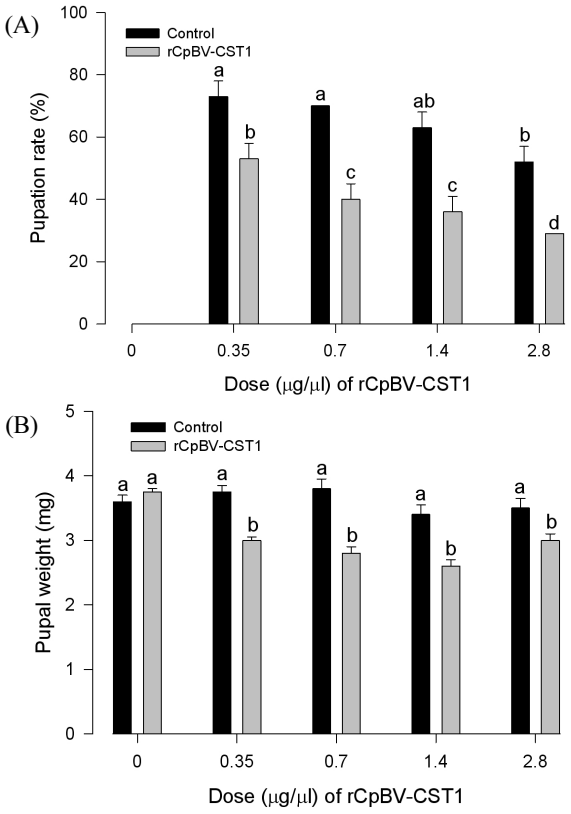

Fig. 4. Adverse effect of a recombinant CpBV-CST1 ('rCpBV-CST1') on larval development of *Plutella xylostella* with respect to pupation rate (A) and pupal weight (B). Different amounts of rCpBV-CST1 were treated to the larvae from hatch to pupation by leaf-dipping method. Control used an uninduced bacterial extract (See Fig. 1B). Each treatment was replicated three times with 10 larvae per replication.

응 연구에 널리 이용되었던 파밤나방을 본 면역반응 연구에 이용하였다. 세균 주입에 대해서 파밤나방은 8 시간 이내에 체내에 평균 약 37 개의 소낭을 형성하였다. 그러나 rCpBV-CST1을 함께 주입하는 경우 소낭형성 반응은 급격하게 줄었다. 특별히 이 억제 반응은 주입되는 rCpBV-CST1 농도에 따라 증가하였으며, 조사된 최저 농도 보다 낮은 농도에서 억제를 보일 수 있을 나타냈다.

rCpBV-CST1의 곤충발육억제 효과

재조합단백질 rCpBV-CST1의 섭식에 따른 배추좀나방 발육 억제에 대한 분석이 이뤄졌다(Fig. 4). 배추좀나방 유충 발육 전체 시기에 대해서 섭식이 이뤄졌으며, 이때 발육된 용화율 및 용무게가 분석에 이용되었다. 이때 대조구로서는 과발현 직전의 세균배양액으로부터 추출된 단백질을 이용하였다. rCpBV-CST1의 처리 농도가 높아짐에 따라 배추좀나방의 용화율 억제가 나타났다. 처리구에 비해 용화율이 높지만, 대조구에서도 처리 농도가 높아짐에 따라 다소 용화율이 감소하였다(Fig. 4A). 본 실험 조건에서 번데기로 발육한 개체들은 rCpBV-CST1의 처리에 따라 용무게의 감소를 보였다(Fig. 4B).

고 찰

PDV의 시스타틴은 *Cotesia*와 *Glyptapanteles* 두 속에 속한 고치벌에 공생하는 브라코바이러스에서만 발견되고 있다(Serbielle et al., 2009). 시스타틴은 파파인과 같은 캐셉신 효소의 작용에 대한 경쟁적 가역억제자이다(Turk et al., 1997; Abrahamson et al., 2003). 캐셉신은 비활성 전구체로 합성되어 아미노 말단 부위가 분해되면서 활성화된다(Lecaille et al., 2002). 곤충에서는 네 종류의 캐셉신류(B, L, F, 26/29 kDa)가 보고되었다(Kurata et al., 1992; Attardo et al., 2006). 캐셉신은 발육(Homma et al., 1994; Cho et al., 1999; Uchida et al., 2001; Hegedus et al., 2002), 소화(Koo et al., 2008), 해독작용(Shindo and Van Der Hoorn, 2008) 및 면역작용(Saito et al., 1992; De Gregorio et al., 2001; Levy et al., 2004) 등 다양한 생리 작용에 관여한다. 따라서 바이러스 유래 시스타틴에 의해 피기생체의 캐셉신 활성을 교란하는 것은 피기생체 기주에게는 불리하지만, 숙주 기생봉에는 유리한 환경을 초래할 수 있다. 본 연구 결과는 이러한 가설을 뒷받침해여 주고 있다.

첫째로, 재조합단백질인 rCpBV-CST1은 시스타틴 활성을

보였다. 즉, rCpBV-CST1을 첨가할 경우 파파인 효소의 단백질분해 능력을 약 75% 이상 억제하는 효과를 나타냈다. 그러나 다른 종류의 캐셉신에 대한 억제 능력은 본 연구에서 밝혀지지 않았다. 본 CpBV-CST1과 유사한 시스타틴이 CcBV에 존재하고, 이 시스타틴(CST1)이 *Manduca sexta*의 26/29 kDa 캐셉신을 억제하는 것으로 제시하였다(Serbielle et al., 2009). 아직 배추좀나방의 캐셉신은 분석되지 않았으나, CpBV-CST1도 피기생체의 캐셉신을 억제할 수 있을 것으로 본 연구 결과는 의미하고 있다.

둘째로, rCpBV-CST1 단백질은 파밤나방의 소낭형성 면역반응을 억제하였다. 혈구 소낭형성 반응은 세포성 면역반응의 일환으로 비교적 다수로 침입한 소형의 병원체에 대해서 혈구들이 연합하여 병원체의 증식을 막는 반응이다(Lavine and Strand, 2002). 나비목의 경우 소낭형성은 먼저 과립혈구에 의해 인식되고, 이후 부정형혈구의 혈구 활착 반응 및 멜라닌형성 반응에 의해 이뤄지게 된다(Ratcliffe and Rowley, 1979). Song et al. (2008)은 프루텔고치벌의 기생에 따라 배추좀나방의 캐셉신 B형의 단백질 수준이 올라간다고 보고하였다(Song et al., 2008). 일반적으로 캐셉신은 세포내 라이소좀에 위치하고 있고, 특별한 조건에서 세포 밖으로 방출되게 된다(Brix et al., 2008). 세포 밖으로 방출된 캐셉신은 extracellular matrix (ECM)를 분해 및 재구성에 관여하거나 사이토카인 또는 보체(complement)를 분해하는 기능을 담당한다(Dickinson, 2002). 쉬파리류(*Sarcophaga peregrina*)가 분비하는 캐셉신 L형은 유충의 멜라닌을 유기하는 데, 이는 간접적 영향으로캐셉신의 기저막 단백질 분해에 의한 혈구세포의 멜라닌반응으로 해석되어 진다(Tang et al., 2007; Li et al., 2008). 흥미롭게도, *C. marginiventris*에 기생된 *Heliothis virescens*에 이 캐셉신 L을 처리한 결과 멜라닌반응이 일어나지 않았다(Nusawardani et al., 2005). 즉, 이 기생봉이 지니는 PDV에 의해 시스타틴이 발현되어 방출되어 캐셉신 L의 멜라닌 유기 반응을 억제한 것으로 해석된다. 따라서 프루텔고치벌 기생에 따라 캐셉신 B가 방출되더라도 CpBV-CST류에 의해 활성이 억제되어 기생봉(또는 바이러스)을 공격하는 멜라닌반응에 대처하게 된다고 해석된다. 따라서 직간접적으로 소낭형성에 영향을 주는 캐셉신에 대해서 rCpBV-CST1의 억제 작용에 의해 면역반응이 줄어든 것으로 해석된다.

셋째로, rCpBV-CST1 단백질의 섭식 처리는 배추좀나방의 유충 발육 및 용화로의 변태를 억제하였다. 일부 높은 농도 처리의 대조구에서 나타난 억제효과는 본 연구에서 사용된 대조구가 IPTG로 가발현하지 않은 동일한 세균 추출액으로 일부 rCpBV-CST1의 발현이 진행된 것으로 해석된다. 이러한 rCpBV-CST1의 억제효과 이 단백질이 소화관 내에 존재하는 캐셉신 소화효소에 대한 직접적 억제 작용으로 해석해 볼 수 있다. 즉, 단백질 분해효소로서 캐셉신에 대한 억제 작용은 영양소 결핍으로 이어져 유충 발육 억제를 초래할 수 있다. 다음으로 캐셉신에 의해 진행되는 곤충의 탈피과정이다. 왕담배나방(*H. armigera*)의 경우 캐셉신 L이 탈피 때 발현이 증가하고 이 캐셉신 활성을 억제할 경우 탈피가 억제된다는 사실을 밝혔다(Liu et al., 2006). 캐셉신의 탈피과정 관여는 표피층분리 또는 탈피 행동에서 단백질 분해 기능의 필요성으로 이해되고 있다. 또한 이 캐셉신 L의 활성은 변태 과정 동안 조직 재분화에 관여하는 것으로 나타났다(Zhang et al., 2013). 유충 말기에서 용기간 동안 완전변태류의 경우 지방체를 포함한 다양한 유충 조직이 성충 조직으로 재분화가 일어나고, 이 과정에서 ECM의 재구성이 필요하게 된다(Haunerland and Shirk, 1995). 변태 과정 중 엑다이손 호르몬의 영향에 의해 Relish 전사인자를 발현 및 유기시키고, 이 인자는 다시 캐셉신 L의 발현 및 세포외 방출을 유도하고, 이 효소는 ECM의 분해 및 재구성을 유도하게 된다(Zhang et al., 2013). 따라서 처리된 rCpBV-CST1은 세포외에서 작용하는 캐셉신에 억제 작용을 통해 유충 기간 탈피와 용화 과정동안 조직 재구성을 막아 발육을 억제하는 것으로 해석된다. 그러나 이 후자의 설명은 rCpBV-CST1이 소화관 벽을 통과하여 혈강으로 흡수되었다는 가정 하에서 일어나는 것으로 이에 대한 후속 연구가 필요하다.

이상의 결과는 재조합단백질 rCpBV-CST1이 시스타틴 활성을 보이며 곤충의 면역 및 발육을 억제하는 기능을 가지고 있다는 것을 보여 주었다. 특별히 이 단백질의 섭식 처리에 의해 대상 곤충의 발육 억제 효과는 이 단백질을 이용한 해충 방제의 응용 가능성을 제시하고 있다. 즉, 이 단백질을 발현하는 재조합 벡큘로바이러스 또는 형질전환작물로 응용이 가능할 것으로 예상된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업과 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(PJ009020)에 의해 지원되었다.

Literature Cited

Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., Nathanson, C.M., 2003. Cystatins. Biochem. Soc. Symp. 70, 179-199.

Agarwala, K.L., Kawabata, S., Hirata, M., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Iwanaga, S., 1996. A cysteine protease inhibitor stored in the large granules of horseshoe crab hemocytes: purification, charac-

terization, cDNA cloning, and tissue localization. J. Biochem. 119, 85-94.

Attardo, G.M., Strickler-Dinglasan, P., Perkin, S.A.H., Caler, E., Bonaldo, M.F., Soareo, M.B., El-Sayeed, N., Aksoy, S., 2006. Analysis of fat body transcriptome from the adult tsetse fly, *Glossina morsitans*. Insect Mol. Biol. 15, 411-424.

Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., Jordans, S., 2008. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. Biochimie 90, 194-207.

Chen, Y., Gao, F., Ye, X., Wei, S., Shi, M., Zheng, H., Chen, X., 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis* bracovirus reveals the complexity of a polydnavirus genome. Virology 414, 42-50.

Cho, W.-L., Tsao, S.-M Hays, A.R., Walter, R., Chen, J.-S., Snigirevskaya, E.S., Raikhel, A.S., 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. J. Biol. Chem. 274, 13311-13321.

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

Desjardins, C., Gundersen-Rindal, D., Hostetler, J., Tallon, L.J., Fadrosh, D.W., Fuester, R.W., Pedroni, M.J., Haas, B.J., Schatz, M.C., Jones, K.M., Crabtree, J., Forberger, H., Nene, V., 2008. Comparative genomics of mutualistic viruses of *Glyptapanteles* parasitic wasps. Genome Biol. 9, R138.

Dickinson, D.P., 2002. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13, 238-275.

Dubin, G., 2005. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. Cell Mol. Life Sci. 62, 653-669.

Espagne, E., Douris, V., Lalmanach, G., Provost, B., Cattolico, L., Lesobre, J., Kurata, S., Iatrou, K., Drezen, J.M., Huguet, E., 2005. A virus essential for insect host-parasite interactions encodes cystatins. J. Virol. 79, 9765-9776.

Goh, H.G., Lee, S.G., Lee, B.P., Chois, G.M., Kim, J.H., 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Kor. J. Appl. Entomol. 29, 180-183.

Haunerland, N.H., Shirk, P.D., 1995. Regional and functional differentiation in the insect fat body. Annu. Rev. Entomol. 40, 121-145.

Hegedus, D., O'Grady, M., Chamankhah, M., Baldwin, D., Gleddie, S., Braun, L., Erlandson, M., 2002. Changes in cysteine protease activity and localization during midgut metamorphosis in the crucifers root maggots (*Delia radicum*). Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1585-1596.

Homma, K., Kurata, S., Natori, S., 1994. Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) and its involvement in the differentiation of imaginal disc. J. Biol. Chem. 269, 15258-15264.

Kim, Y., 2006. Polydnavirus and its novel application to insect pest control. Kor. J. Appl. Entomol. 45, 241-259.

Kim, Y., Hepat, R., Kim, Y., 2013. A copy of cystatin from the diamondback moth *Plutella xylostella* is encoded in the polydnavirus *Cotesia plutellae* bracovirus. J. Asia Pac. Entomol. 16, 449-455.

Koo, Y.D., Ahn, J.E., Salzman, R.A., Moon, J., Chi, Y.H., Yun, D.J., Lee, S.Y., Koiwa, H., Zhu-salzman, K., 2008. Functional expression of an insect cathespin B-like counter-defence protein. Insect Mol. Biol. 17, 235-245.

Kurata, S., Saito, H. Natori, S., 1992. The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. Dev. Biol. 153, 115-121.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1295-1309.

Lecaille, F., Kaleta, J., Bromme, D., 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. Chem. Rev. 102, 4459-4488.

Levy, F., Rabel, D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Ehret-Sabatier, L., 2004. Peptidomic and proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. Biochimie 86, 607-616.

Li, H., Tang, H., Sivakumar, S., Philip, J., Harrison, R.L., Gatehouse, J.A., Bonning, B., 2008. Insecticidal activity of a basement membrane-degrading protease against *Heliothis virescens* (Fabricius) and *Acyrthosiphon pisum* (Harris). J. Insect Physiol. 54, 777-789.

Liu, J., Shi, G.P., Zhang, W.Q., Zhang, G.R., Xy, W.H., 2006. Cathepsin L function in insect moulting: moleculoar cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Insect Mol. Biol. 15, 823-834.

Nusawardani, T., Ruberson, J.R., Obrycki, J.J., Bonning, B., 2005. Effects of a protease-expressing recombinant baculovirus insecticide on the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Cresson). Biol. Control 35, 46-54.

Olsson, S.L., Ek, B., Bjork, I., 1999. The affinity and kinetics of inhibition of cyteine proteinases by intact recombinant bovine cystatin C. Biochim. Biophys. Acta 1432, 73-81.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., 1979. Role of hemocytes in defence against biological agents, in: Gupta, A.P. (Ed.) Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 331-414.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1990. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. J. Mol. Evol. 30, 60-71.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J., 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. Biochem. J. 378, 705-716.

Saito, H., Kurata, S., Natori, S., 1992. Purification and characterization of a hemocyte proteinase of *Sarcophaga*, possibly participating in elimination of foreign substances. Eur. J. Biochem. 209,

939-944.

SAS Institute, Inc., 1989. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 ed. SAS Institute, Cary, NC.

Seo, S.Y., Jeon, M.Y., Chun, W.S., Lee, S.H., Seo, J.A., Yi, Y.G., Hong, Y.P., Kim, Y., 2011. Structure-activity analysis of benzylideneacetone for effective control of plant pests. Kor. J. Appl. Entomol. 50, 107-113.

Serbielle, C., Moreau, S., Veillard, F., Voldoire, E., Bézier, A., Mannucci, M.A., Volkoff, A.N., Drezen, J.M., Lalmanach, G., Huguet, E., 2009. Identification of parasite-responsive cysteine proteases in *Manduca sexta*. Biol. Chem. 390, 493-502.

Shindo, T., Van Der Hoorn, R.A., 2008. Papain-like cysteine protease: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. Mol. Plant Pathol. 9, 119-125.

Song, K.H., Jung, M.K., Eum, J.H., Hwang, I.C., Han, S.S., 2008. Proteomic analysis of parasitized *Plutella xylostella* larvae plasma. J. Insect Physiol. 54, 1271-1280.

Tang, H., Li, H., Meng Lei, S., Harrison, R.L., Bonning, B.C., 2007. Tissue specificity of a baculovirus-expressed, basement smembrane-degrading protease in larvae of *Heliothis virescens*. Tissue Cell 39, 431-443.

Turk, B., Turk, V., Turk, D., 1997. Structural and functional aspect of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. Biol. Chem. Hopp. Seyler. 378, 141-150.

Turk, V., Bode, W., 1991. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. Fed. Eur. Biol. Soc. Lett. 285, 213-234.

Uchida, K., Ohmori, D., Ueno, T., Nishizuka, M., Eshita, Y., Fukunaga, A., Kominami, E., 2001. Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. Dev. Biol. 237, 68-78.

Yamamoto, Y., Watabe, S., Kageyama, T., Takahashi, S., 1999. Purification and characterization of *Bombyx* cysteine proteinase specific inhibitors from the hemolymph of *Bombyx mori.* Arch. Insect Biochem. Physiol. 41, 119-129.

Zhang,Y., Lu, Y.X., Liu, J., Feng, Q.L., Xu, W.H., 2013. A regulatory pathway, ecdysone-transcription factor Relish-cathepsin L, is involved in insect fat body dissociation. PLOS Genetics 9, e1003273.

Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X., Fujisaka, K., 2006. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 527-535.