

폴리드나바이러스 유래 시스타틴 유전자 발현 형질전환 담배 제작

김영태 · 김은성 · 박영진 · 김용균*

안동대학교 생명자원과학과

Construction of a Transgenic Tobacco Expressing a Polydnviral Cystatin

Yeongtae Kim, Eunsung Kim, Youngjin Park and Yonggyun Kim*

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

ABSTRACT: CpBV (*Cotesia plutellae* bracovirus) is a polydnvirus and encodes a cystatin (CpBV-CST1) gene. Its overexpression suppresses insect immunity and alters insect developmental processes. This study aimed to construct a genetically modified (GM) tobacco to further explore the physiological function of the viral cystatin and to apply to control insect pests. To this end, the transgenic tobacco lines were screened in expression of the target gene and assessed in insecticidal activity. A recombinant vector (pBI121-CST) was prepared and used to transform a bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*. The transformed bacteria were used to generate transgenic tobacco lines, which were induced to grow callus and resulted in about 92% of shoot regeneration. The regenerated plants were screened by PCR analysis to confirm the insertion of the target gene in the plant genome. In addition, the expression of the target gene was assessed in the regenerated plants by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The qRT-PCR analysis showed that the transgenic line plant expressed the target gene about 17 times more than the control tobacco, indicating a stable insertion and expression of the target gene in the transgenic tobacco line. The insecticidal activity was then analyzed using the screened transgenic tobacco lines against the teneral 1st instar larvae of the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*. Though there was a variation in the insecticidal efficacy among transgenic lines, T9 and T12 lines exhibited more than 95% mortality at 7 days after feeding treatment. These results suggest that CpBV-CST1 is a useful genetic resource to be used to generate GM crop against insect pests.

Key words: Cystatin, Transgenic line, Insect resistance, Polydnvirus, *Helicoverpa assulta*

초록: 폴리드나바이러스의 일종인 CpBV (*Cotesia plutellae* bracovirus) 바이러스 게놈에 포함된 시스타틴(CpBV-CST1) 유전자의 과발현이 곤충의 면역 및 발육을 교란한다. 이 연구는 바이러스 유래 시스타틴의 생물적 기능의 심화 연구와 해충저항성 작물 개발을 위해 담배형질전환체를 구축하는 데 목적을 두었다. 이를 위해 형질전환체를 대상으로 목표유전자의 발현분석과 곤충에 대한 발육억제에 대한 생물검정을 수행했다. 시스타틴 유전자를 pBI121 운반체에 재조합한 pBI121-CST를 제작하고, 이를 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens*) 세균 매개에 의한 담배 형질전환 및 재분화를 유도하여 약 92%의 높은 신초 재분화율을 나타냈다. 이들 재분화된 개체 가운데 담배 genomic DNA에 시스타틴 유전자가 삽입된 형질전환 추정 개체를 PCR 분석법으로 선별하였다. 다시 quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 분석을 통해 이들 목표유전자의 발현을 분석하였다. qRT-PCR 결과는 형질전환 추정 개체가 비형질전환체에 비해 유전자 발현이 약 17 배 높게 나타나 형질전환계통에서 목표유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 확인했다. 선별된 형질전환담배를 대상으로 갓 부화한 담배나방(*Helicoverpa assulta*) 1령 유충에 대한 살충효과를 확인하였다. 살충력에 있어서 형질전환계통간의 차이가 있었다. 특히 T9와 T12계통은 섭식 후 7 일차 조사에서 95% 이상의 살충효과를 보였다. 이상의 결과들은 CpBV-CST1이 해충저항성 작물 개발에 필요한 유용 유전자 자원으로서 활용될 수 있음을 제시하고 있다.

검색어: 시스타틴, 형질전환체, 해충저항성, 폴리드나바이러스, 담배나방

다양한 곤충생리교란 유용유전자가 내부기생봉에서 발견되고 있다(Burke and Strand, 2014). 특별히 내부기생봉이 가지고

있는 기생인자 가운데 폴리드나바이러스는 곤충의 면역 및 발육을 억제하는 다수의 유전인자를 보유하고 있다(Kim, 2006). 국내에 서식하는 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 자신의 공생 바이러스인 CpBV (*Cotesia plutellae* bracovirus)를 통해 기주인 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 면역 및 발육을 억제한다

*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received October 8 2014; Revised January 5 2015

Accepted January 10 2015

다(Kim et al., 2007). CpBV가 피기생체에서 발현하는 유전자 가운데 시스타틴(cystatin: CST)은 이러한 곤충생리교란 인자로서 주목받고 있다. CpBV 바이러스 계놈은 4 개의 시스타틴 유전자를 가지고 있으며, 이 가운데 3 개가 피기생체에서 발현된다고 보고되었다(Kim et al., 2013). 특별히 CpBV-CST1의 과발현은 비기생 배추좀나방의 면역과 발육을 억제하였다. 이를 단백질 수준에서 증명하기 위해 CpBV-CST1을 세균에서 발현시켜 재조합 단백질을 형성하여 분리하였고, 분리된 CpBV-CST1 단백질은 배추좀나방의 경구독성을 나타내는 살충효과를 보였다(Kim et al., 2014). 이러한 결과는 이 CpBV-CST1 유전자를 작물에서 발현시킬 경우 해충 억제에 유효할 것으로 예견되었다.

최근 다양한 생물종의 유전체 분석과 기능유전체 연구들이 광범위하게 이루어짐에 따라 기존의 육종기술, 조직배양기술과 새로운 분자유종 기술들이 결합되어 형질전환체를 이용한 유전자 기능 분석 연구들이 활발히 진행되고 있다. Herrera-Estrella et al. (1984)이 Tumor-inducing (Ti) plasmid vector를 이용한 담배 및 패튜니아 형질전환체를 처음으로 제작한 이후 외래 유전자 도입에 의한 병해충저항성, 내재해성, 기능성 작물 개발이 증가되고 있다.

현재 이용되고 있는 식물형질전환 기술은 기존의 교잡육종이나 조직배양에서 불가능했던 유전형질을 단시간에 도입시켜 형질전환체를 확보할 수 있다. 식물체에 외래유전자를 도입하는데 주로 이용되는 형질전환 방법으로는 Ti 플라스미드나 다른 종류의 운반체를 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens*)과 유전자총(particle bombardment)으로 유전자를 도입시키거나, 애기장대에 주로 이용되는 화아침지(floral dip)에 의한 형질전환 등이 있다. 해충저항성을 주기 위한 작물형질전환에 이용되는 목표유전자는 기능성 단백질을 코딩하는 유전자(Porta et al., 2011)와 특정 유전자의 발현을 억제하여 생리적 장애를 유발하는 double strand RNA와 같은 유전자 자체 특성을 이용하는 것(Park et al., 2014)을 포함하게 된다. 이와같은 식물형질전환 기술을 기반으로 시스타틴 유전자를 활용한 병해충저항성 작물개발을 위한 연구들은 해충(Lecardonnell et al., 1999; Carrillo et al., 2011; Smid et al., 2013), 선충(Chan et al., 2010) 그리고 미생물(Senthilkumar et al., 2010) 등 병원체 전반을 대상으로 이루어지고 있으나 대부분 식물 유래의 시스타틴 유전자를 이용하였으며 미생물 유래의 시스타틴을 이용한 연구 역시 이루어지고 있다(Smid et al., 2013).

이 연구에서는 해충저항성 작물을 개발하기 위한 예비단계로서 곤충 면역과 발육을 교란하는 바이러스 유래 시스타틴 유전자를 해충 방제에 응용하는데 궁극적 목적을 두었다. 이를 위

해 담배를 대상 작물로 이 유전자의 형질전환체를 구축하는 과정을 시도하고, 이를 통해 바이러스 시스타틴 유전자의 작물체를 통한 살충효과를 검정하였다.

재료 및 방법

식물재료

형질전환체 제작의 식물재료로 *Nicotiana tabacum* cv. KY14 담배종자를 사용하였으며 70% 에틸알코올로 1 분간 표면살균을 한 후 25% sodium hypochlorite 용액에 15 분간 침지하고 멸균수로 3 회 세척하여 발아배지[4.4 g/L MS 배지(Murashige and Skoog, 1962), 20 g/L sucrose, 8 g/L phyto agar, pH 5.8]에 치상하고 25°C, 2,000 lux, 24 시간 명조건조로 발아시키고 6-9 주 생장된 잎을 형질전환용 식물재료로 사용하였다.

운반체 제작 및 아그로박테리움내 도입


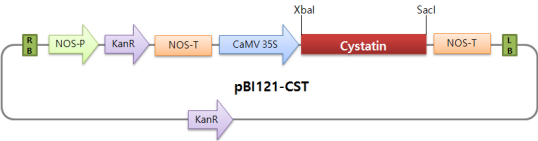
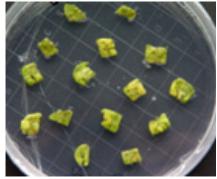
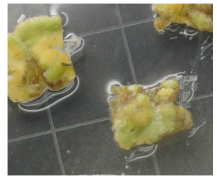
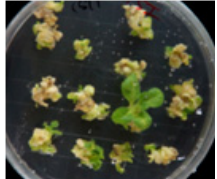

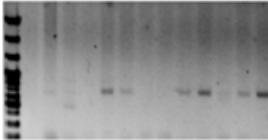

식물체 발현 운반체를 제작하기 위해 바이러스 시스타틴 cDNA (Kim et al., 2013)를 이용하여 제한효소 *Xba*I 인식서열(밑줄표시)이 부가된 정방향 프라이머(5'-GCTCTAGAATGTGCAAGGAATATCGAGT-3')와 *Sac*I 인식서열(밑줄표시)이 부가된 역방향 프라이머(5'-CGAGCTCTTAATTTGAATCATCAATTTCA-3')로 94°C 30 초, 54°C 30 초, 72°C 1 분 조건으로 35 회 반복 PCR을 실시하여 open reading frame (ORF) 영역을 증폭하고 그 PCR 산물을 pCR2.1 클로닝벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 subcloning하고 플라스미드를 분리하여 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하였다. 발현 운반체를 제작하기 위해 pBI121 운반체내의 right board와 left board 영역 내에 존재하는 CaMV 35S promoter 하류의 *Xba*I 부위와 nopaline synthase terminator (NOS-T) 상류의 *Sac*I 부위를 제한효소로 절단하여 리포터 유전자로 이용되는 β-glucuronidase (GUS) 유전자 ORF 영역을 제거하고 그 부위에 시스타틴 유전자를 삽입하여 재조합시키고 대장균에 형질전환하였다. 시스타틴 유전자가 삽입된 클론을 선발하여 식물체 발현용 운반체, pBI121-CST를 제작하였다. pBI121-CST 운반체를 아그로박테리움에 도입하기 위하여 MicroPulser electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 아그로박테리움 LBA4404 (Takara, Otsu, Shiga, Japan) electro-cells 20 μl에 운반체 1 ng을 혼합하고, 1 mm cuvette에 주입하여 1.25 KV의 전기충격을 가한 후 SOC 배지(Sambrook et al., 1989)를 첨가하여 30°C, 100 rpm으로 1 시간 진탕배양하고 50 μl/ml kanamycin과 100

μg/ml streptomycin이 함유된 LB 고체배지(Sambrook et al., 1989)에 30°C, 2 일간 배양한 후 시스타틴 프라이머(Kim et al., 2013)로 PCR을 수행하여 시스타틴 유전자가 삽입된 균총을 선별하고 형질전환에 사용하였다.

형질전환 및 재분화

담배형질전환 전체 개요는 Table 1에서 나타나고 있다. 재조합 pBI121-CST 운반체로 형질전환된 아그로박테리움을 kanamycin (50 mg/L)이 함유된 LB 액체배지 5 ml에 접종하였다. 이후 28°C,

Table 1. Construction overview of transgenic tobacco plant expressing a viral cystatin

Step	Treatment	Outcome	Elapsed time
Culturing host plant	Germination of tobacco seeds on MS media		6-9 weeks
Vector construction and bacterial transformation	Recombinant vector (pBI121-cystatin) and transformation to agrobacterium (LHA4404)		1-2 weeks
Transfection to host plant	Transformation of target gene to host plant by co-culturing tobacco and agrobacteria		2 days
Regeneration and screening	Induction callus formation under MS media supplemented with selectable antibiotics		1 week
	Induction of shoot growth on antibiotics-MS medium and successive culturing		6-8 weeks
	Induction of root growth on antibiotics-MS medium		4-8 weeks
Confirmation of transgenic line	Detection of target gene on genome and plant cultivation	 	1 week

200 rpm 조건으로 2 일간 배양하고 4,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 성장된 아그로박테리움 침전물을 수거하고 멸균시킨 40 ml의 캘러스유도 액체배지[4.4 g/L MS 배지, 20 g/L sucrose, 2 ml/L α -naphthalene acetic acid (NAA, 1 mg/ml), 500 μ L/L 6-benzylaminopurine (BAP, 1 mg/ml), pH 5.8]에 현탁시켰다. 발아배지에서 성장한 담배 잎을 약 0.5-1 cm 크기로 절단한 엽절편을 아그로박테리움 현탁액에 넣고 20 분간 진탕 접종한 후 엽절편의 현탁액을 멸균 여과지를 이용하여 제거시키고 캘러스유도 액체배지에 8 g/L phyto agar를 첨가한 고체배지에 치상하여 28°C, 암상태에서 2 일간 공동 배양하였다. 형질전환된 아그로박테리움과 함께 배양된 담배잎 절편을 항생제 cefotaxime (250 mg/ml이 함유된 캘러스 선발배지에 치상하고 28°C, 암상태에서 7 일간 배양하여 생존한 개체를 선별하여 신초유도배지[4.4 g/L MS 배지, 20 g/L sucrose, 100 μ L/L α -naphthalene acetic acid (NAA, 1 mg/ml), 500 μ L/L 6-benzylaminopurine (BAP, 1 mg/ml, 8 g/L phyto agar, 1 ml/L cefotaxime (250 mg/ml), pH 5.8]로 이식하고 2 주 간격으로 3-4 회 계대 배양하여 신초신장이 양호한 개체들을 발근배지(호르몬이 첨가되지 않은 신초유도배지)로 이식하여 4-8 주 동안 발근을 유도하고 이에 따라 재분화된 개체 뿌리를 수세한 후, 원예용 배양토에 식재하여 1 주일 간 순화과정을 거쳐 온실에서 생육시켰다.

유전자 삽입 및 발현 분석

재분화체 및 비형질전환체 담배 잎에서 Amani et al. (2011)의 방법으로 게놈 DNA를 추출하여 주형으로 사용하고 시스타틴 유전자의 담배 게놈 내 삽입을 확인하기 위한 프라이머로 운반체 제작에 사용한 시스타틴 유전자 프라이머 짝을 사용하였고, CaMV 35S 프로모터 및 시스타틴 유전자 삽입 확인용으로 CaMV 35S 프로모터 영역의 정방향 프라이머(5'-GCTCCTCAAAATGCCATCA-3')와 운반체 제작에 이용한 시스타틴 유전자의 역방향 프라이머를 이용하여 운반체 제작과 동일한 PCR 조건으로 증폭, 목표유전자의 삽입을 확인하였다. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실시하기 위하여 형질전환 개체 및 비형질전환 개체 잎에서 Trizol (Ambion, Austin, TX, USA)을 사용하여 전체 RNA를 추출하고 RT-mix kit (Intron, Seoul, Korea)로 합성한 cDNA와, 시스타틴 유전자 프라이머 짝과 SYBR Green Realtime PCR master mix (Toyobo, Osaka, Japan)를 혼합하여 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 제조사가 제시한 방법으로 qRT-PCR을 수행하였다. 각 시료는 3 반복 처리하여 94°C에서 10 분간 반응시키고 94°C 1 분, 50°C 30 초,

72°C 40 초간 40 회 반복으로 PCR을 실시했으며 β -actin을 대조로 사용하였다. 사용된 β -actin 유전자 프라이머의 서열은 5'-TGGCACCACACCTTCTAC-3'과 5'-CATGATCTGGGT CATCTTCT-3'이었다. 유전자의 상대적 발현량 분석을 위해 comparative CT ($\Delta\Delta$ CT) 방법 (Livak and Schmittgen, 2001)을 사용하였다.

형질전환체의 생물검정

PCR 분석에서 시스타틴 유전자가 삽입된 형질전환 개체와 비형질전환 개체의 잎을 이용하여 갓 부화한 담배나방(*Helicoverpa assulta*) 1령 유충에 대한 생물검정을 실시했다. 형질전환체에 대한 담배나방유충의 살충력을 확인하기 위해 시험곤충들은 6 시간동안 절식시켰다. 형질전환체 잎을 일정크기로 절단하여 직경 10 cm 페트리디쉬에 치상하여 담배나방의 섭식을 유도하였다. 각 잎별 10 마리의 담배나방 유충이 처리되었으며 각 3 반복으로 7 일간 살충효과를 조사하였다. 또한 비형질전환체 잎을 대조구로 하여 이와 동일한 방법으로 진행하였다.

결과

형질전환체 선별

형질전환에 사용하기 위해 제작한 pBI121-cystatin 운반체의 아그로박테리움 내 도입 여부를 확인하기 위하여 PCR을 실시한 결과, 예상되는 크기의 밴드를 확인하여 운반체가 아그로박테리움에 정상적으로 도입되었음을 확인하였다(Fig. 1). pBI121-cystatin 운반체가 도입된 아그로박테리움으로 담배잎 절편체에 접종한 후 10 일경부터 잎 절편체가 신장하면서 캘러스 형성이 관찰되기 시작하여 약 3 주부터 신초신장이 왕성하게 진행되었고 6-8 주 경에 대부분의 신초가 재분화 되었다(Fig. 2A-D). 신초의 재분화율은 110 개의 절편체에서 102 개가 재분화되어 92%로 높은 분화율을 나타내었다(Table 2). 신장이 양호한 재분화체들을 발근배지로 이식하여 약 20 개 이상 발근이 된 재분화체를 선별하여 배양토에 생육시킨 결과 100%의 생존율을 보였고 정상적인 식물체로 성장하였으며, 생육양상은 비형질전환체와 차이를 나타내지 않았다.

형질전환체내 목표유전자의 발현 분석

형질전환 추정 개체의 게놈 DNA에 시스타틴 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위해 재분화체 14 개를 선별하고 시스타틴 유

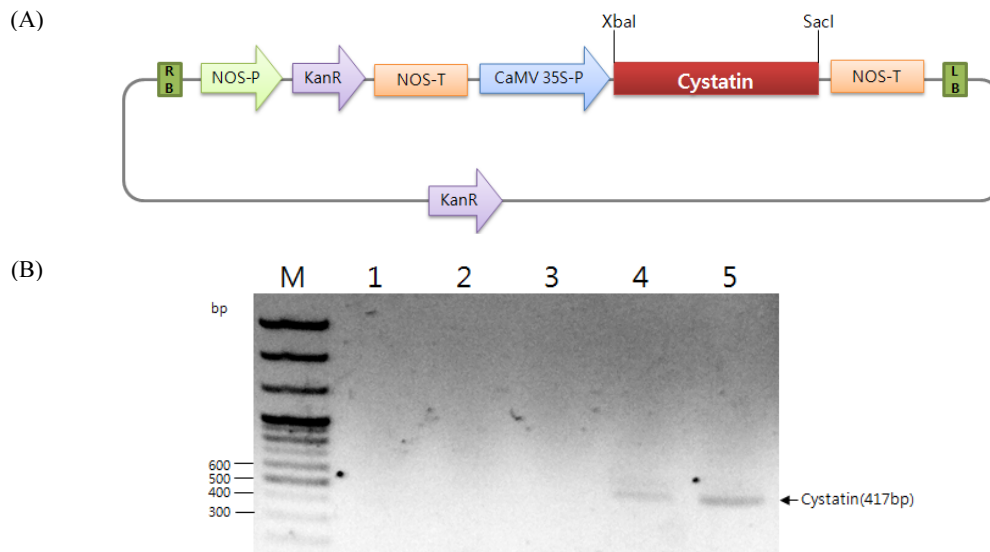


Fig. 1. Preparation of recombinant bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Physical map of cystatin expression cassette in pBI121. The GUS ORF was replaced by cystatin cDNA (417 bp) using *XbaI* and *SacI* restriction enzyme sites between CaMV 35S promoter and nopaline synthase terminator (NOS-T). RB: right border of T-DNA, NOS-P: nopaline synthase promoter, KanR: resistance to kanamycin, LB: left border of T-DNA. (B) PCR amplification of cystatin cDNA in agrobacterium cells harboring pBI121-cystatin construct. M: 100 bp DNA ladder, Lanes 1-5: putative transformed colonies.

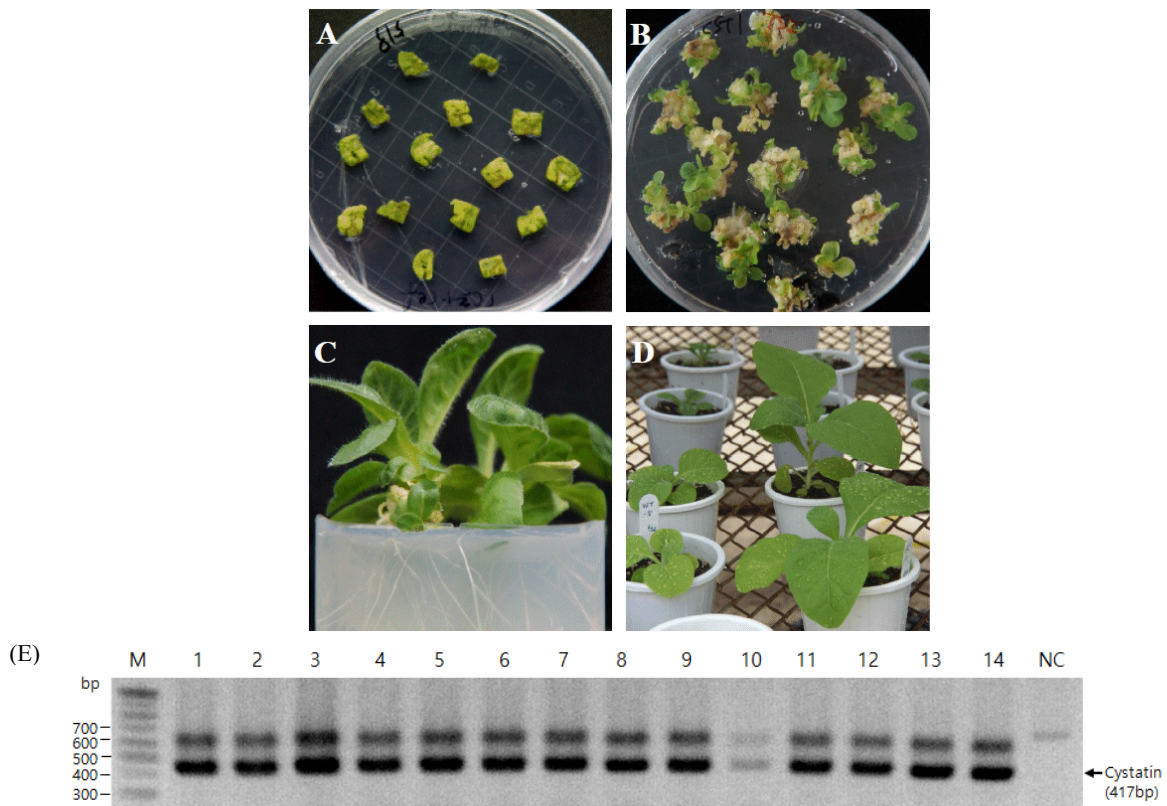


Fig. 2. Construction of transgenic tobacco plants with a recombinant *Agrobacterium tumefaciens* expressing bacterial cystatin. Pictures show the processes of the production of tobacco transgenic plants with a viral cystatin gene construct. (A) Tobacco leaf discs co-cultivated with agrobacterium carrying pBI121-CST1 construct. (B) Shoot regeneration from the agrobacterium-infected leaf discs on shoot induction MS medium. (C) Rooting of shoot on MS medium without growth regulators. (D) Transgenic tobacco plants growing in potting soil. PCR analysis of putative cystatin transgenic tobacco plants. (E) PCR amplification of cystatin gene using cystatin primers. M: 100 bp DNA ladder, Lane 1-14: putative transgenic tobacco plants, NC: non-transformed plant.

Table 2. Regeneration of tobacco plant expressing viral cystatin

No. of agrobacterium-infected leaf discs	No. of regenerated shoots	No. of transgenic plants ^a
110	102	14

^aScreening by PCR analysis of target gene

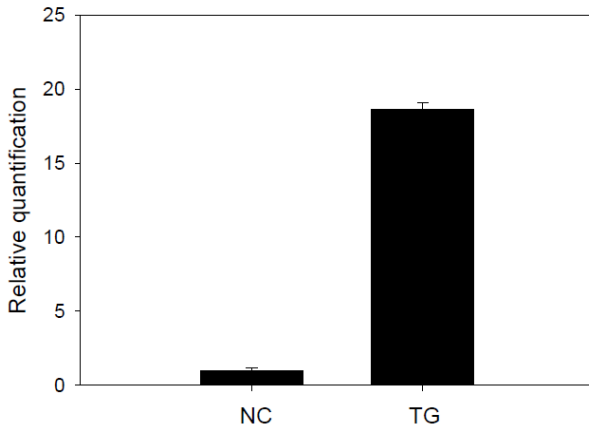


Fig. 3. Determination of relative amount of cystatin gene in putative transgenic plant using quantitative real-time RT-PCR. The expression levels were normalized against beta actin levels. NC: Non-transgenic plant, TG: Putative transgenic plant.

전자의 삽입을 확인하기 위해 PCR을 수행한 결과, 14 개체 모두 예상되는 크기의 밴드가 나타나 담배의 게놈 DNA에 시스타틴의 DNA가 정상적으로 삽입되어 형질전환이 이루어진 것으로 추정하였다(Fig. 2E). 형질 전환체의 시스타틴 유전자 발현 수준을 분석하기 위하여 PCR을 통해 시스타틴 유전자가 삽입이 확인된 개체를 선발하여 qRT-PCR을 실시하여 비형질전환 개체와 상대적인 발현수준을 비교하는 정량 분석을 한 결과, 형질전환 추정개체가 대조구에 비해 약 17 배의 유전자 발현수준이 높게 나타났다(Fig. 3). 이는 시스타틴 유전자가 담배 게놈에 삽입되어 안정적으로 발현되고 있음을 제시한다.

형질전환체의 생물검정

PCR을 통해 시스타틴 유전자의 삽입이 확인된 형질전환체에 대한 담배나방 유충 섭식조사를 수행하여 통계적으로 유의한 살충효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 섭식 후 7 일차 조사에서 T9와 T12계통은 95% 이상의 살충효과를 보였으며, 3 일차에서도 40% 이상의 살충효과를 나타내어 계통간의 차이가 있음을 확인했다.

(A)



(B)

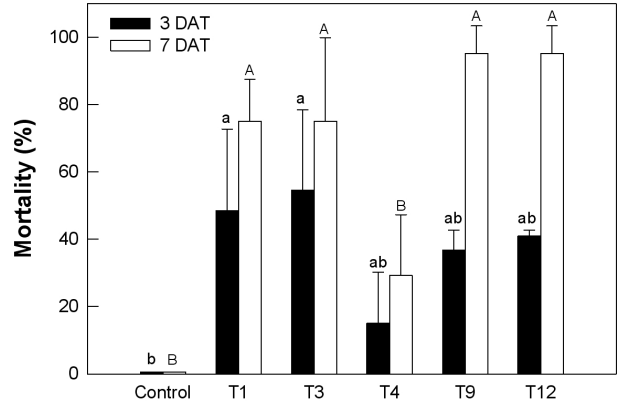


Fig. 4. Bioassay of transgenic plants against neonate 1st instar larvae of *Helicoverpa assulta*. (A) Leaves of non-transgenic (left) and transgenic (right) tobacco leaves after feeding of the larvae. (B) Effects of different transgenic plant lines on larval mortality. Each treatment was replicated three times with 10 larvae per replication. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

고찰

이 연구는 곤충의 생리 교란효과가 밝혀진 폴리드나바이러스 유래 CpBV-CST1 유전자의 살충효과를 형질전환담배를 제작하여 확인하였다. 이러한 결과는 이 바이러스 유전자가 식물 세포에서 발현되어 생리적 기능을 발휘한 것으로 해석된다. 따라서 담배 기주식물에서 발현된 CpBV-CST1 단백질인 시스타틴이 곤충의 섭식 작용을 통해 소화관으로 유입되었고, 여기에서 살충효과를 발휘하였을 것으로 추정된다. Kim et al. (2014)은 CpBV-CST1의 재조합단백질을 세균에서 생성하여 섭식 처리한 결과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 성장을 억제한 것으로 보고하였다. 유사하게 담배에서 발현된 이 단백질이 담배나방의 생육을 억제하여 살충효과를 나타낸 것으로 이해된다.

일반적으로 시스타틴은 파파인과 같은 캐텡신(cathepsin) 단백질분해효소에 대한 경쟁적 가역억제자이며 시스테인 단백질분해효소 억제자(cysteine protease inhibitor)에 속하게 된다

(Rawlings and Barrett, 1990). 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. 여기에 시스타틴은 체내 캐셉신 효소활성을 조절하며 또한 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 그람 음성세균에 대해서 항생 능력을 보였다(Agarwala et al., 1996). 증증열성혈소판감소증후군 병원 바이러스를 매개하는 작은소창집드기(*Haemaphysalis longicornis*)에서는 이 시스타틴이 원생동물 병원체의 증식을 억제하는 항생 효과를 나타냈다(Zhou et al., 2006). 따라서 폴리드나바이러스 유래 시스타틴에 의해 피기생체의 캐셉신 활성을 교란하는 것은 피기생체 기주에게는 불리하지만, 숙주 기생봉에는 유리한 환경을 초래할 수 있다.

이 연구에서 보고된 담배에서 발견된 CpBV-CST1 단백질의 담배나방에 대한 살충효과는 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 세포외 조직의 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 세포외조직의 분해 및 재구성을 유도하게 된다(Zhang et al., 2013). 따라서 담배에서 발견되

어 곤충 체내로 들어온 CpBV-CST1은 세포 밖에서 작용하는 캐셉신에 대해 억제 작용을 발휘하여 유충 탈피와 용화 과정동안 조직 재구성을 막아 발육을 억제 및 살충효과를 나타낸 것으로 해석된다.

이 연구는 곤충 생리를 교란하는 유전자인 CpBV-CST1 유전자를 담배게놈에 삽입하여 형질전환담배를 구축하는 것을 보여 주었다. 현재 곤충병원성 세균인 *Bacillus thuringiensis*에서 유래된 Cry 독소단백질을 이용하여 다양한 작물에 대한 형질전환체를 상용화하고 있고 이를 재배하는 면적이 기하급수적으로 증가하고 있다(Tabashnik et al., 2013). 그러나 다른 화학농약과 마찬가지로 이들 비티에 대한 해충의 저항성 발달이 실내는 물론이고 야외 농작물 재배지에서 보고되고 있다. 이에 대한 대책 가운데 일환으로 곤충의 생리작용을 교란하는 다양한 유용유전자의 발굴이 필요하며, 이를 이용하여 비티에 대한 한계를 극복하는 새로운 형질전환체의 개발이 시급해질 수 있다. 이때 CpBV-CST1은 대안으로 새로운 형질전환 작물체를 개발하는 데 이용될 수 있다. 이를 위해 본 연구에서 보여준 형질전환 생리적 유용효과를 다시 차세대에서 안정적으로 발현되는 것을 보여주는 후속 연구가 필요하다.

사 사

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

Literature Cited

- 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, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *J. Biochem.* 119, 85-94.
- Amani, J., Kazemi, R., Ali Reza Abbasi, A.R., Ali Hafez Salmanian, A.H., 2011. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iran. J. Biotech.* 9, 69-71.
- Attardo, G.M., Strickler-Dinglasan, P., Perkin, S.A.H., Caler, E., Bonaldo, M.F., Soareo, M.B., El-Sayed, N., Aksoy, S., 2006. Analysis of fat body transcriptome from the adult tsetse fly, *Glossina morsitans*. *Insect Mol. Biol.* 15, 411-424.
- Burke, G.R., Strand, M.R., 2014. Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal. *Mol. Ecol.* 23, 890-901.
- Carrillo, L., Martinez, M., Ramessar, K., Cambra, I., Castañera, P., Ortego, F., Díaz, I., 2011. Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by

- altering their cysteine-proteases. *Plant Cell Rep.* 30, 101-112.
- Chan, Y., Yang, A., Chen, J., Yeh, K., Chan, M., 2010. Heterologous expression of taro cystatin protects transgenic tomato against *Meloidogyne incognita* infection by means of interfering sex determination and suppressing gall formation. *Plant Cell Rep.* 29, 231-238.
- 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.
- Dubin, G., 2005. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 653-669.
- Hauerland, 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., Gledie, 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.
- Herrera-Estrella, L., Van den Broeck, G., Maenhaut, R., Van Montagu, M., Schell, J., 1984. Light-inducible and chloroplast associated expression of a chimeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector. *Nature* 310, 115-120.
- 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., Choi, J., Je, Y., 2007. *Cotesia plutellae* bracovirus genome and its function in altering insect physiology. *J. Asia Pac. Entomol.* 10, 181-191.
- Kim, Y., Hapat, 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.
- Kim, Y., Eom, S., Park, J., Kim, Y., 2014. Inhibitory effects of a recombinant viral cystatin protein on insect immune and development. *Kor. J. Appl. Entomol.* 53, 331-338.
- 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 cathepsin 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.
- 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.
- Lecardonnell, A., Chauvin, L., Jouanin, L., Beaujean, A., Prévosta, G., Sangwan-Norreeld, B., 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.* 140, 71-79.
- 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.
- Liu, J., Shi, G.P., Zhang, W.Q., Zhang, G.R., Xy, W.H., 2006. Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol. Biol.* 15, 823-834.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- 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.
- Park, Y., Ahn, S., Vogel, H., Kim, Y., 2014. Integrin β subunit and its RNA interference in immune and developmental processes of the Oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*. *Dev. Comp. Immunol.* 47, 59-67.
- Porta, H., Jimenez, G., Cordoba, E., Leon, P., Soberon, M., Bravo, A., 2011. Tobacco plants expressing the Cry1AbMod toxin suppress tolerance to Cry1Ab toxin of *Manduca sexta* cadherin-silenced larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 513-519.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1990. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J. Mol. Evol.* 30, 60-71.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Senthilkumar, R., Cheng, C.P., Yeh, K.W., 2010. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotech. J.* 8, 65-75.
- 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.
- Smid, I., Gruden, K., Gasparic, M. B., Koruza, K., Petek, M., Pohleven, J., Brzin, J., Kos, J., Zel, J., Sabotic, J., 2013. Inhibition of the growth of Colorado potato beetle larvae by

-
- macrocytins, protease inhibitors from the parasol mushroom. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12499–12509.
- Tabashnik, B.E., Brévault, T., Carrière, Y., 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat. Biotech.* 31, 510-521.
- 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.