

Five Genes Regulated by *Oryctes rhinoceros nudivirus* Infection in the Intestinal Tube of *Allomyrina dichotoma*

Bo-Kyung Yoo^{1†}, Kisang Kwon^{2†}, Young Hwa Ko¹, Eun Ryeong Lee², Ji-Young Choi³ and O-Yu Kwon^{1*}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health & Welfare, Kyungwoon University, Gumi 39160, Korea

²Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea

³Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Received October 10, 2016 / Revised October 17, 2016 / Accepted October 17, 2016

Korean rhinoceros beetles (*Allomyrina dichotoma*), which can be found in broad-leaved forests in mountainous habitats and lives for around one year in wild. This beetle is currently popular as a pet and traditionally regarded as a medicine for liver-related diseases in Korea. It is reported that the economic losses in the mass-rearing facilities by virus infection have been increased since the 2010s in Korea. The causing virus for the *A. dichotoma* was firstly reported as an *Oryctes rhinoceros nudivirus* (OrNV) in 2015. We, here, observe that serious morphological changes in the intestinal tube from the OrNV-infected beetles, and report five genes, which are regulated by OrNV infection in the intestine; Krueppel-like factor 15 (Klf15), Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (ERAP2), U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (Snrnp200), Muscleblind-like protein 2a (mbnl2a), and MIMI_L93. The results may provide a clue to the early diagnosis and disease treatment during the mass-rearing facilities of the *A. dichotoma*.

Key words : *Allomyrina dichotoma*, infection, korean rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros nudivirus*

서 론

2016년 한국농촌경제연구원은 한국의 미래산업으로서 곤충분야의 결과를 발표하였다. '미래농업으로 곤충산업 활성화 방안'에 따르면 2015년 유용 곤충산업 시장규모는 약 3,039억~3,193억원 규모이다. 용도별로는 학습용이 49억4,000만원, 애완용 372억~496억원, 화분매개 432억원, 천적 30억~50억원, 식용 60억원, 사료용 60억원, 약용 20억~30억원, 행사 소재용 1,816억원이다. 향후 2020년에는 현재 수준보다 약 1.7배 성장한 약 5,500억원 규모에 이를 것으로 전망됐다. 그리고 '세계 주요국에서 친환경 농업의 중요성 대두로 화분매개, 천적곤충의 가치가 조명되고 있다'며, '우리나라 역시 친환경농업과 시설농업의 성장으로 천적곤충과 화분매개 곤충 시장의 성장 가능성이 크다'고 보고하였다[7, 15]. 곤충산업이 커지면서 항시 건강한 곤충의 대량사육이 요구되고 있다. 그러나 영세한 곤충사육농가가 곤충질병에 대한 직접적인 치료와 예방에는 무방비상태이다. 사육곤충에서 잘 나타나는 곤충질병으로는

virus에 의한 백강병, 녹강병, 고름병, bacteria에 의한 물렁물렁병등과 함께 fungus, 원충, 선충, 응애 등이 알려지고 있다. 국내에서도 곤충의 대량 집단사육에 의한 질병피해가 만성적으로 일어나고 있는 것이 보고되고 있다[10]. 그 동안에 농진청에서는 진단/판별 kit, 병 유발 유전자탐색, 친환경 방제법을 발전시켜오고 있다. 그러나 정밀한 진단 및 치료법이 개발이 만족할 수준은 아니다.

장수풍뎅이(Korean rhinoceros beetle, *Allomyrina dichotoma*)는 국내에서 사육되는 대표적인 산업곤충이다. 한국을 포함한 동남아시아 등지에 분포하는 장수풍뎅이의 체장은 30-85 mm로 매우 단단한 외피에 싸여있다. 몸색깔은 전체적으로 흑밤색을 띤다. 수컷은 반짝이는 광택이 나며 머리에 긴 뿔이 나 있는데, 그 길이가 몸길이의 절반 정도이다. 이들은 주로 낮에는 어두운 썩은 나무속 혹은 땅 속에 숨어 있다가 밤에 나와서 줄참나무, 상수리나무의 수액을 먹는다. 6-8월에 짝짓기를 한 다음에 썩은 부엽토에 30~70개의 알을 낳는다. 유충은 일생 중 두 번 탈피를 한 뒤 월동하였다가 다음해 초여름에 땅 속에서 번데기가 되었다가, 15~20일 뒤에 성충으로 우화한다[13]. 이들은 관상용으로 시판되고 있으며, 특히 애벌레는 건강보조식품으로도 주목을 받고 있다. 장수풍뎅이의 대량사육 시 발생하는 치명적인 질병의 원인이 *Oryctes rhinoceros nudivirus* (OrNV)인 것이 보고되었다[8]. 그러나 아직 정확한 발병기전과 치료방법을 알지 못하여 사육농가에 매년 심각한 경제적 손실이 발생하고 있다. 본 연구팀은 이 문제를 해결하기 위하여 OrNV에 감염된 장수풍뎅이의 장(intestine)에서 특

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-42-580-8206, Fax : +82-42-586-4800

E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이적으로 발현하는 유전자를 differential display-PCR방법으로 동정하였다. 이들 유전자에 대한 깊은 연구는 OrNV의 질병예찰과 치료에 도움을 줄 수 있는 실마리를 제공할 것이다. 이는 장수풍뎅이의 안정적인 대량생산을 통해서 생산성 향상과 소득증대 효과 및 균일화된 대량사육을 통해서 곤충식품원료의 품질관리 가능하게 할 것이다.

재료 및 방법

장수풍뎅이사육 및 장(intestine) 분리

본 연구에 이용된 장수풍뎅이는 표준 사육기준에 따라 사육된 3령 larvae를 경기도 시흥 아이빅스캠프(영농조합법인)로부터 구입한 후, 약 25°C, 40%의 습도 조건의 발효 톱밥에 보관하였다. 3령 larvae의 머리 부분을 해부침으로 고정시킨 후 표피를 아래에서 머리 방향으로 한 번에 가른다. Fat body를 제거한 후 장을 통째로 분리하여 장 내부의 톱밥 등의 내용물을 제거하고, 차가운 phosphate buffered saline (PBS)에 3회 세척하여 불순물질을 모두 제거 후 4% paraformaldehyde (PFA)로 고정 또는 total RNA를 분리하였다. OrNV에 감염된 조직도 동일한 방법으로 취급하였다.

장(intestine)의 염색

건강한 장수풍뎅이와 OrNV에 감염된 장수풍뎅이를 각각 4% PFA에 고정한다 다음에 물에 충분히 수세하여 저 농도에서 고농도의 에탄올에 순차적으로 담가 탈수시킨 후 자일렌을 이용하여 투명화 하였다. 그 다음 파라핀으로 포매하고 마이크로톰을 이용하여 4 µm 두께로 잘라 슬라이드에 올린 후 파라핀을 제거하였다. Hematoxylin과 eosin을 이용하여 염색한 후 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

RNA 분리

건강한 장수풍뎅이와 OrNV에 감염된 장수풍뎅이의 장을 분리하여 3 MM paper를 이용하여 수분을 제거한 다음에 1.5 ml tube에 넣고 500 µl의 RNA isolation buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 100 µl의 chloroform을 넣어 충분히 섞어주었다. 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 약 250 µl의 상등액을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 실온에서 10분 정도 침전반응 유도한 후 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하고, 75% ethanol을 500 µl로 세척하여 total RNA를 얻어 RNase-free water로 녹인 후 non-drop (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 정량하였다.

DD-PCR에 의한 선별

GeneFishing DEG kit (Seegene, Korea)를 사용하여 PCR-based differential display 방법으로 선별하였다. Total RNA 3 µg (각각의 건강한 장수풍뎅이와 OrNV에 감염된 장수풍뎅

이의 장에서 분리)과 dT-ACP1 oligomer를 섞어 80°C에서 3분 동안 열 변성 시킨 후, 10x buffer, dNTP, MML-V, RNase inhibitor 등이 포함된 용액과 혼합하여 42°C에서 90분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 주형으로 하여 dT-ACP2와 20가지의 arbitrary ACP를 이용하여 95°C에서 1분, 50°C에서 3분, 72°C에서 1분 동안 반응하여 double-strand cDNA를 합성하였다. 그런 다음 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 40회 반복한 후, 2% agarose gel에서 확인하였다. Target band를 위해서 Gel elution kit (ELPIS Biotech, Korea)를 이용하여 DNA를 회수한 후 pGEM-T easy vector (Promega, USA)를 이용하여 cloning 하였다. Plasmid miniprep kit (ELPIS Biotech, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 후 솔젠트 회사에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다(Solgent, Korea).

RT-PCR 확인

발현차이를 보인 유전자에 해당하는 primer를 이용하여 reverse transcription-PCR방법으로 건강한 장수풍뎅이와 OrNV에 감염된 장수풍뎅이의 장에서 분리한 total RNA를 대상으로 확인하였다. Total RNA 3 µg과 oligo-dT를 섞어 80°C에서 3분 동안 열 변성 시킨 후, 10x buffer, dNTP, MML-V, RNase inhibitor 등이 포함된 용액과 혼합하여 42°C에서 90분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 증폭시키기 위해서 해당 primer를 이용하여 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초로 28회 반응하여 전기영동으로 확인하였다. 사용된 primer는 다음과 같다. Klf15; F(5'-ACG CCA AGG CTT CGC ATT TA)/R(5'-CCA GGT GGT CAG ATC TTG CG), Snmp200; F(5'-CCC GCA CAT TAA GGC TTT GC)/R(5'-AAG TTG CAA CAA TGG CGA GG), ERAP2; F(5'-TGG TCA CGA TGA AGT GGT GG)/R(5'-GAT TAC CGA TGG GGA CCG AC), mbnl2a; F(5'-GGC ACT GTC ACT GTC TGC AT)/R(5'-TCA AAA ACG GAA AAG AAA CGA), MIM1_L93; F(5'-GCG GAC GTT AAT TGG AAA GA)/R(5'-TTG TCG AGC AGC ATT TTG AC).

결과 및 고찰

OrNV에 감염된 장수풍뎅이 3령 larvae는 정상적인 것에 비하여 체장의 변화는 없다. 그러나 육안으로도 감염된 것은 몸 전체가 투명하지 않으며 노란 색깔을 띤다. 가장 특징적인 것은 탈장(intestinal hernia)을 확인할 수 있다(Fig. 1A). 곤충의 장(intestine)의 가장 중요한 기능은 stomach으로 섭취물을 이동시켜서 분해하여 기초대사에 필요한 glucose, amino acids, DNA등 얻는 것이다. 이들은 곤충의 생육이 가능하게 영양분으로 곤충혈액(hemolymph)으로 흡수된다. 이처럼 곤충의 장은 대사의 가장 중심역할을 담당하는 기관이다. 탈장이 확인된 것은 OrNV 감염에 의해서 장에서 일어나는 기본대

사가 정상적으로 이루어지고 있지 않다는 것을 의미한다. 그 결과 정상적인 배출행위가 불량해져서 정상적인 투명한 몸 색깔이 노란색을 띠게 된다. 이때에 장의 구조적인 변화를 관찰하기 위하여 haematoxylin & eosin (H&E), phosphotungstic acid-hematoxylin (PTAH), Alcian blue 염색법으로 장을 염색하여 조직학적인 구조변화를 현미경하에서 관찰하였다. 일반적인 조직변화를 관찰할 수 있는 H&E염색결과, 정상적인 장 구조에서는 기저층에 있는 근육층(lamina muscularis)에 키가 큰 원주형세포들의 핵이 정상적으로 관찰되는 것에 비하여 OrNV에 감염된 장 구조에서는 원주형세포의 변화와 함께 핵들은 karyopyknosis와 karyorrhexis가 관찰된다. 이로 인하여 점막층(tunica muscularis)은 아주 얇아져 있다. 특히, 점액(mucin)을 분비하는 술잔세포(goblet cell)의 숫자가 현저히 감소되어 거의 관찰되지 않는다(Fig. 1B). 근육의 변화를 관찰할 수 있는 PTAH염색을 하였다. 점막층은 정상에 비하여 많은 조직적 변화가 관찰된다. 근육층 역시 섬유소, 아교섬유 등이 비정상적으로 응집된 형태를 가지고 있다(Fig. 1C). 점액물질을 염색하는 Alcian blue 염색법으로 장 조직을 염색하였다. 정상적인 점막층이 유지되지 않고 근육층의 발달된 형태이다. 점액은 산성단백질로 미세융모(microvillus)의 당질층(glycocalyx)에 보호막을 형성하여 상피(epithelium)표면을 윤활하게 하고 상피를 보호하는 역할을 담당하고 있다(Fig. 1C). 이처럼 OrNV감염에 의해서 장의 정상적인 기능이 유지될 수 없는 상태가 질병유발의 주요 원인인 것으로 생각된다.

장수풍뎅이가 OrNV에 감염되었을 때에 장에서 일어나는 분자기전을 이해하기 위하여 DD-PCR방법을 이용하여, 특이적으로 발현하는 유전자를 탐색하였다. GeneFishing DEG kit (Seegene, Korea)는 포유동물의 특이유전자탐색에 사용되는

것이지만, 곤충을 상대로 했을 때에도 잘 적용되는 것을 확인하였다. OrNV에 감염된 장과 비 감염된 장으로부터 total RNA를 얻어서 사용하였다. 그 결과 다수의 1차 결과를 얻었지만 reverse PCR결과 많은 false가 확인되었다. 그러나 Fig. 2의 결과에서 보는 것과 같이 5개의 유전자는 OrNV감염에 의해서 특이적으로 발현이 조절하는 것이 확인되었다. 즉, OrNV 감염에 의해서 Klf15, ERAP2, Snrnp200, mbnl2a는 유전자발현이 상승하고 MIML93는 유전자발현이 하강하였다. Krueppel-like factor 15 (Klf15)는 zinc-finger를 가진 전사인자에 속하며 다양한 세포기능을 가지게 하는 넓은 범위의 유전자조절에 관여한다. Klf15는 Wnt, Ras, TGFβ, Hippo, Notch, retinoid acid receptor, and hormone receptors와 같은 여러 종류의 신호전달에 의해서 조절된다. 특히 Klf15는 hepatitis B virus 침입과정에 novel transcriptional activator로 작용하는 것이 보고되어있다[4, 16]. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (ERAP2)는 처음에는 placental leucine aminopeptidase/insulin-regulated aminopeptidase의 homologue로 동정되었으며 endoplasmic reticulum luman에서 protease로 작용하는 것이 보고되었다. 특히 histocompatibility complex (MHC) class I의 항체형성 시 N-terminal processing에 중요한 작용하는 것과 더불어 다양한 생리현상과 병리적 상태에서도 관여한다. 최근 보고에 의하면 HIV-1 infection에 직접 관여하는 것이 알려지고 있다[2, 5]. U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (Snrnp200)는 비정상적인 세포주기 관여하는 것 복되어있지만, 그 이외의 생물학적인 기능연구결과는 거의 없는 상태이다[3]. Muscblind-like protein 2a (mbnl2a)는 pre-mRNA를 target으로 하여 activator 혹은 repressor로서 작용하는 보고가 있다. Troponin-T (TNNT2) pre-

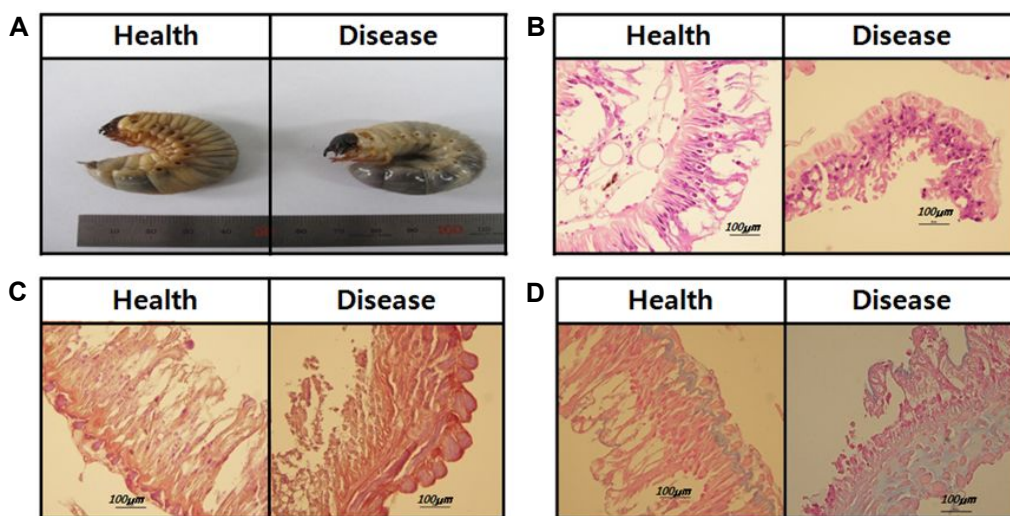


Fig. 1. Morphological changes caused by OrNV infection. (A) Visual comparison of both a OrNV-infected larva (left) and a healthy larva (right). The OrNV-infected larva appears more yellowish than the healthy one, and its abdomen is swollen with intestinal hernia. (B) Histological changes of intestine from the healthy (left) and from the OrNV-infected one (right) stained by H&E. (C) by PTAH and (D) by Alcian blue, respectively.

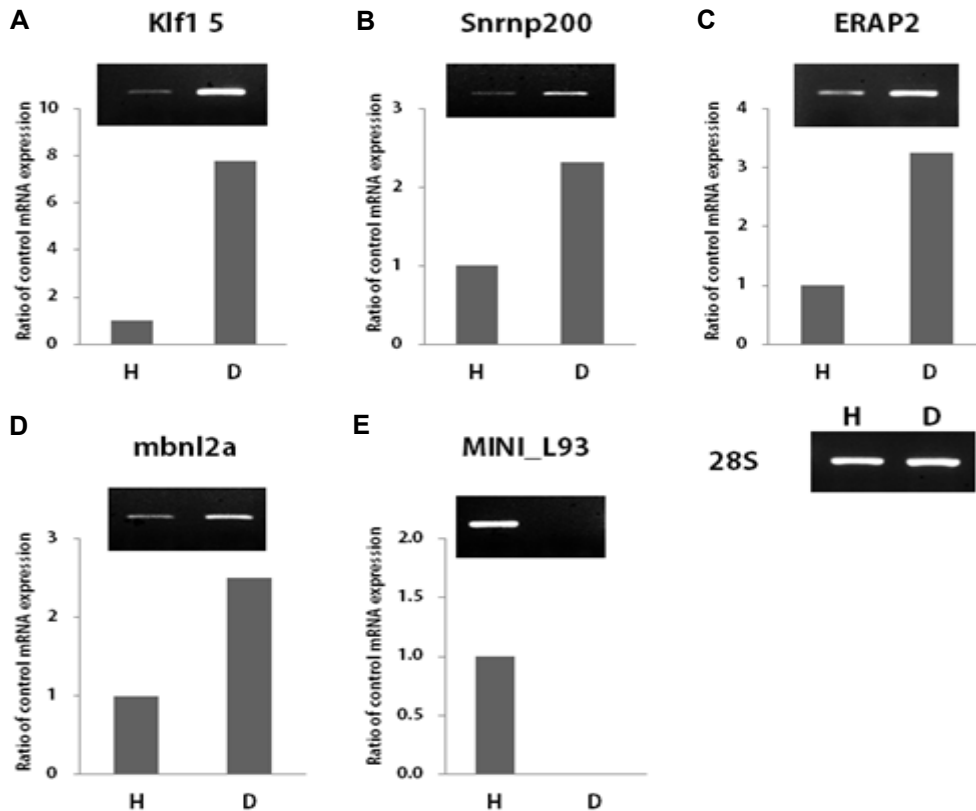


Fig. 2. Five genes regulated by OrNV infection in the intestine. H; healthy intestine, D; OrNV-infected intestine. Krueppel-like factor 15 (Klf15), U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (Snrnp200), Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (ERAP2), Muscleblind-like protein 2a (mbnl2a), GenBank# MIMI_L93.

mRNA에는 repressor로서 insulin receptor (IR) pre-mRNA에는 activator로서 작용한다[1, 6, 11]. Ankyrin은 red blood cell (RBC)의 유연한 구조형성에 중요한 단백질이다. 즉, RBC의 membrane cytoskeleton에 존재하는 spectrin-actin에 결합하여 모세혈관을 통과할 수 있는 유연한 구조에 세포내 integral membrane protein으로 작용한다. Ankyrin repeat는 가장 흔하게 볼 수 있는 amino acid motif로 protein-protein 상호결합에 중요한 작용을 한다. 많은 질병에서 비정상적인 ankyrin repeat protein이 확인되고 있다. 특히, ankyrin repeat domain 1 (ANKRD1)는 HCV infection에 요구되는 단백질이다. ANKRD1의 발현조절에 의해서 virus감염의 빈도를 조절할 수 있을 것 같다. 그러나 Putative ankyrin repeat protein L93 (MIMI_L93)에 관한 직접적인 연구결과는 전무한 상태이다[9, 12, 14].

본 연구 결과는 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)가 OrNV에 감염되면 장에서 조직적인 구조변화가 일어난 것을 관찰되었다. 이와 함께 장에서 특이적으로 발현이 상승하는 유전자로 Klf15, ERAP2, Snrnp200, mbnl2a와 하락하는 유전자로 MIMI_L93을 보고한다. 이 결과는 장수풍뎅이의 대량 사육사 발생하는 virus 질병의 조기진단과 치료에 새로운 기회를 제공할 수 있을 것으로 기대한다. 그리고 안정적인 대량 생산을

통해서 소득증대 효과 및 균일화된 식품원료로 인정받을 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01086401)의 지원에 의해 이루어진 것임

References

1. Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R. and Hsu, T. 2005. RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the muscleblind-like protein MLP1. *Nat. Cell Biol.* 7, 1240-1247.
2. Biasin, M., Sironi, M., Saulle, I., de Luca, M., la Rosa, F., Cagliani, R., Forni, D., Agliardi, C., lo Caputo, S., Mazzotta, F., Trabattoni, D., Macias, J., Pineda, J. A., Caruz, A. and Clerici, M. 2013. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 haplotypes play a role in modulating susceptibility to HIV infection. *AIDS* 27, 1697-1706.
3. Ehsani, A., Alluin, J. V. and Rossi, J. J. Cell cycle abnormalities associated with differential perturbations of the human U5 snRNP associated U5-200kD RNA helicase. 2013. *PLoS One* 29, e62125.

4. Gao, Y., Ding, Y., Chen, H., Chen, H. and Zhou, J. 2015. Targeting Krüppel-like factor 5 (KLF5) for cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **15**, 699-713.
5. Hattori, A. and Tsujimoto, M. 2013. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry, physiology and pathology. *J. Biochem.* **154**, 219-228.
6. Ho, T. H., Charlet-B, N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S. and Cooper, T. A. 2004. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* **23**, 3103-3112.
7. Kim, Y., Han, Y. and Park, Y. 2016. The Plan for Activation of Insect Industry. *Kor. Rural Econ. Inst.* R758.
8. Lee, S., Park, K. H., Nam, S. H., Kwak, K. W. and Choi, J. Y. 2015. First report of *Oryctes rhinoceros nudivirus* (Coleoptera: Scarabaeidae) causing severe disease in *Allomyrina dichotoma* in Korea. *J. Insect Sci.* **15**, DOI: 10.1093/jisesa/iev002.
9. Lux, S. E. 2016. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* **127**, 187-199.
10. Manley, R., Boots, M. and Wilfert, L. 2015. Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *J. Appl. Ecol.* **52**, 331-340.
11. Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N. J., Comai, L. and Reddy, S. 2006. Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J.* **25**, 4271-4283.
12. Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J. 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 311-316.
13. Suh, H. J., Kim, S. R., Lee, K. S., Park, S. and Kang, S. C. 2010. Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae. *J. Photochem. Photobiol. B.* **99**, 67-73.
14. Than, T. T., Tran, G. V., Son, K., Park, E. M., Kim, S., Lim, Y. S. and Hwang, S. B. 2016. Ankyrin repeat domain 1 is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry. *Sci. Rep.* **6**, 20819.
15. van Huis, A. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 563-583.
16. Zhou, J., Tan, T., Tian, Y., Zheng, B., Ou, J. H., Huang, E. J. and Yen, T. S. 2011. Krüppel-like factor 15 activates hepatitis B virus gene expression and replication. *Hepatology* **54**, 109-121.

초록 : 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)에 *Oryctes rhinoceros nudivirus* 감염에 의해서 유전자 발현이 조절되는 5개의 유전자

유보경^{1*} · 권기상^{2*} · 고영화¹ · 이은령² · 최지영³ · 권오유^{1*}

(¹충남대학교 의학전문대학원 해부학교실, ²경운대학교 임상병리학과, ³농진청 국립농업과학원 곤충산업과)

최근에 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)는 관상용으로 인기가 높으며, 애벌레는 건강보조식품으로 주목을 받고 있다. 장수풍뎅이의 대량사육 시 발생하는 질병의 원인이 *Oryctes rhinoceros nudivirus* (OrNV)인 것이 2015년에 처음 보고되었다. 그러나 아직 정확한 진단, 발병기전과 치료방법을 찾지 못하고 있으며 곤충 사육농가에 매년 심각한 경제적 손실을 입고 있다. 본 연구는 장수풍뎅이의 대량사육 시 발생하는 OrNV질병의 조기진단과 치료에 실마리를 제공하기 위하여 OrNV에 감염된 장수풍뎅이의 장(intestine)에서 유전자발현이 조절되는 Klf15, ERAP2, Snrnp200, mbnl2a, MIMI_L93를 보고한다.