

폴리드나바이러스 유래 CpBV-ELP1 발현 담배의 내충성

김은성 · 김용균*
안동대학교 생명자원과학과

Insect Resistance of Tobacco Plant Expressing CpBV-ELP1 Derived from a Polydnavirus

Eunseong Kim and Yonggyun Kim*

Department of Bio-Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

ABSTRACT: Polydnaviruses (PDVs) are a group of double-stranded DNA viruses symbiotic to some endoparasitoid wasps. *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV) is a PDV symbiotic to an endoparasitoid wasp, *C. plutellae*, parasitizing young larvae of *Plutella xylostella*. An early expressed gene, *CpBV-ELP1*, plays an important role in the parasitism by suppressing host cellular immunity by its cytotoxic activity against hemocytes. This study aimed to test its oral toxicity against insect pest by expressing it in a recombinant tobacco plant. A recombinant CpBV-ELP1 protein was produced using a baculovirus expression system and secreted to cell culture medium. The cell cultured media were used to purify CpBV-ELP1 by a sequential array of purification steps: ammonium sulfate fractionation, size exclusion chromatography, and ion exchange chromatography. Purified rCpBV-ELP1 exhibited a significant cytotoxicity against *Spodoptera exigua* hemocytes. CpBV-ELP1 was highly toxic to the fifth instar larvae of *S. exigua* by injection to hemocoel. It also showed a significant oral toxicity to fifth instar larvae of *S. exigua* by a leaf-dipping assay. *CpBV-ELP1* was cloned into pBI121 vector under CaMV 35S promoter with opaline synthase terminator. Resulting recombinant vector (pBI121-ELP1) was used to transform *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The recombinant bacteria were then used to induce callus of a tobacco (*Nicotiana tabacum* Xanthi) leaves and subsequent generation (T1) plants were selected. T1 generation tobacco plants expressing CpBV-ELP1 gave significant insecticidal activities against *S. exigua* larvae. These results suggest that *CpBV-ELP1* gene can be used to control insect pests by constructing transgenic crops.

Key words: Polydnavirus, Transgenic plant, Cytotoxicity, Insecticidal activity, *Spodoptera exigua*, GM crop

초 록: 폴리드나바이러스(polydnavirus: PDV)는 일부 내부기생충에 공생하는 이중나선형 DNA 바이러스 분류군이다. *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV)는 프루텔고치벌(*C. plutellae*)에 공생하는 일종의 PDV이다. 프루텔고치벌은 어린 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 유충에 기생한다. 기생 초기에 발현하는 CpBV-ELP1 유전자는 혈구세포에 세포독성을 발휘하면서 기주의 세포성 면역을 억제하여 기생에 중요한 역할을 담당하고 있다. 본 연구는 이 유전자를 담배 식물에서 발현하여 해충에 대한 경구독성을 분석하는 데 목적을 두었다. 재조합 CpBV-ELP1 단백질이 배큘로바이러스 발현시스템을 통해 합성되어 세포배양액에 분비되었다. 수거된 세포배양액은 일련의 단백질 분리과정(ammonium sulfate 단백질 분획, size exclusion 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피)을 통해 CpBV-ELP1 단백질을 분리하는 데 이용되었다. 분리된 rCpBV-ELP1 단백질은 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 혈구에 대한 뚜렷한 세포독성을 보였다. CpBV-ELP1은 파밤나방 5령충에 대해서 혈강 주입하여 살충력을 나타냈고, 엽침지법을 이용하여 경구독성을 갖고 있는 것을 확인하였다. CpBV-ELP1 유전자를 CaMV 35S 유전자 프로모터와 opaline synthase 유전자 전사종결신호를 갖는 pBI121 벡터에 클로닝하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세균에 형질전환을 유도하였다. 형질전환된 세균은 담배(*Nicotiana tabacum* Xanthi)잎에 감염하여 캘러스를 유도하게 하였고 이후 차세대(T1)를 확보하였다. T1 세대 담배는 파밤나방에 대한 해충저항성을 갖고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 CpBV-ELP1 유전자가 형질전환작물을 통해 해충방제에 응용될 수 있다는 것을 제시하고 있다.

검색어: 폴리드나바이러스, 형질전환식물, 세포독성, 살충력, 파밤나방, GM 작물

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received October 7 2016; Revised November 13 2016

Accepted December 12 2016

폴리드나바이러스(polydnavirus: PDV)는 이중나선형 DNA 바이러스로서 일부 맵시벌상과(Ichneumonoidea) 내부기생봉에 공생한다(Kim, 2006). PDV는 곤충 바이러스의 분류군으로 브라코바이러스(bracovirus: BV)와 이크노바이러스(ichnovirus: IV)의 두 개 속(genera)으로 구성된다(Webb et al., 2000). BV와 IV는 바이러스 입자 구조에서 차이를 보이고, 바이러스 게놈 구성에서 상이하다(Webb et al., 2006). 이들의 기주 기생봉도 차이를 보여 BV는 고치벌과(Braconidae), IV는 맵시벌과(Ichneumonidae)의 기생봉에 각각 공생한다. 이들의 공통조상은 아직 밝혀지지 않았지만, BV의 경우는 배쿨로바이러스와 유사한 nudivirus의 조상형에서 기원된 것으로 밝혀졌으나(Bézier et al., 2009), IV의 경우는 이와는 다른 조상형을 가지고 있을 것으로 추정되어(Volkoff et al., 2010) 이들은 각각 서로 독립적으로 기원되어 수렴진화를 겪었을 것으로 추정하고 있다(Herniou et al., 2013).

PDV 증식은 기주 기생봉의 게놈에 자신의 게놈을 두는 프로바이러스(provirus) 형태로 기주 세대와 함께 세대를 이어가는 수직 전파형태를 보인다(Stoltz et al., 1990; Bézier et al., 2013). PDV의 수평전파는 기주 게놈에서 자신의 일부 게놈을 복제하여 바이러스 입자로 형성하면서 야기된다(Wyler and Lanzrein, 2003). 한편 PDV의 게놈은 두 부분으로 구성되어 복제 과정 동안 복제되어 바이러스 입자에 들어가는 피복(encapsidated) 게놈과 바이러스 입자에 들어가지 않는 비피복(unencapsidated) 게놈으로 구분된다(Strand and Burke, 2013). 피복게놈은 바이러스 병원성 유전자를 함유하는 반면, 비피복게놈은 바이러스의 복제에 관여하는 유전자로 구성된다(Strand and Burke, 2015). PDV의 복제는 기주 기생봉 암컷 난소의 난소받침의 표피세포에서 일어나며, 복제된 바이러스 입자는 측수란관 내강으로 축적된다(Kim and Ryu, 2007). 이러한 PDV의 수평전파 과정 중에 나타난 바이러스 입자는 기주 기생봉이 피기생체의 혈강에 자신의 알을 산란할 때 함께 피기주로 침입하게 된다.

PDV 바이러스 입자는 피기생체에서 다양한 조직에 감염을 일으키게 된다. 주로 혈강의 혈구세포에 감염하여 혈구의 면역 기능을 저하시켜 기주 기생봉을 피기생체 면역 반응으로부터 보호하게 한다. 또한 지방체 및 다양한 조직에 감염을 일으켜 기주가 영양분을 이용하는 것을 막아 기생봉의 발육에 유리한 조건을 만들게 된다. 또한 기주 내분비계를 교란하여 용으로 변태를 억제하게 한다. 따라서 PDV의 유전자 발현은 피기생체의 다양한 생리를 교란하여 기생봉의 생존과 발육을 도모하게 하는데 필수적 기생요소가 된다.

프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 고치벌과에 속한 내부기생봉으로 배추좀나방(*Plutella xylostella*)과 미국흰불나방

(*Hyphantria cunea*)의 어린 유충에 특이적으로 기생한다(Kim et al., 2004). 이 고치벌의 기생은 피기생체 기주에게 면역저하는 물론이고 발육지연을 유도한다(Ibrahim and Kim, 2006; Kwon et al., 2010). 이러한 생리적 변화는 프루텔고치벌이 갖고 있는 PDV, 기형세포, 난소단백질의 적어도 3가지 기생인자가 관여하고, 이들이 상호 협력적으로 작용하여 궁극적으로 기생을 성공적으로 이루게 한다(Basio and Kim, 2006). 이 가운데 PDV는 프루텔고치벌의 난소받침 부위에서 최초로 발견되었으며 *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV)라 명명되었다(Bae and Kim, 2004). CpBV의 피복게놈 크기는 약 540 bp로서 157개의 open reading frames (ORFs)을 포함하고 있다(Chen et al., 2011). 최근 CpBV의 비피복게놈이 프루텔고치벌의 전장서열 분석으로 밝혀지고 있고, 이들 사이의 상호 게놈 구성이 일부 분석되었다(Kim and Kim, 2016).

CpBV의 피복게놈은 피기생체인 배추좀나방에서 발견되어 다양한 생리적 변화를 유발한다. 이 게놈의 많은 ORF가 진핵생명체 및 타 바이러스 유전자들과 유사한 유전자군으로 형성되어 있는데, 이 가운데 가장 구성 유전자가 많은 PTP (protein tyrosine phosphatase) 유전자군은 혈구세포의 단백질에 인산화 정도를 변경하여 면역억제를 유발하는 것으로 밝혀졌다(Ibrahim and Kim, 2008). 유사한 PDV인 MdBV (*Microplitis demolitor* bracovirus)의 경우 이들 PTP가 세포활착에 관여하는 세포막단백질의 인산화를 억제하여 세포성면역 반응을 억제하는 것으로 밝혔다(Pruijssers and Strand, 2007). 다음으로 가장 많은 유전자군은 BEN (BANP, E5R and NAC1)으로 피기생체의 항바이러스에 관여하는 체액성면역을 억제하여 바이러스 자신을 보호하고 기주 기생봉을 보호하는 역할을 담당한다(Ali and Kim, 2012). 기주 생리 교란을 위해 CpBV는 또한 기주의 유전자 발현을 전사과정에서 억제하는 CpBV-H4가 발견되었다(Gad and Kim, 2008, 2009). 진핵생명체의 히스톤 H4와 아미노산 서열에서 높은 상동성을 보이거나 CpBV-H4는 N 말단 부위에 37개의 긴 꼬리 구조를 갖는 데 이 부위의 9개 lysine 아미노산은 이 기생인자가 기주 염색사 구조를 변경하여 유전자 발현을 에피제네틱 방식으로 조절하는 데 핵심적 역할을 담당하게 된다(Hepat et al., 2013). CpBV-H4가 다양한 기주 유전자의 발현을 조절하지만, 특히 인슐린 유사 펩타이드 유전자 발현을 억제하여 기주의 발육을 지연시키고, 염색사 리모델링 인자인 SWI/SNF와 lysine demethylase의 발현을 억제하여 기주 발육에 따른 유전자 발현 변화를 억제하는 것으로 밝혀졌다(Kumar et al., 2016a,b). 두 유사 단백질인 CpBV-15α와 CpBV-15β는 진핵생명체의 번역초기인자인 eIF5와 eIF4A와 유사한 구조를 지니고 있다(Lee and Kim, 2008). 이들 기생인자는 기

주 mRNA의 번역을 억제하는 데 특히 CpBV-15β의 경우는 기주 전사체의 5'-UTR 구조를 구분하여 바이러스 전사체는 기주 번역기구에 의해 발현되게 하나, 기주 mRNA 가운데 기생에 불리한 유전자들은 선택적으로 번역억제를 유도하게 된다 (Surakasi et al., 2011; Prasad et al., 2014).

Cotesia 속에 속한 기생봉의 PDV에서 기생초기에 높게 발현되는 EP1 (early expressed protein 1) 유전자가 발견되었다 (Harwood et al., 1994). 이와 상동성이 높은 유전자가 CpBV 피복계놈에서 7개가 발견되었으며 이들을 ELP (EP1-like protein)로 명명되었다(Choi et al., 2005; Chen et al., 2011). 이 가운데 가장 발현량이 높고 지속적으로 발현되는 유전자가 ELP1으로 이 유전자의 발현은 혈구세포의 치사를 유발하는 세포독성을 지녔다(Kwon and Kim, 2008). 최근 CpBV 유전자를 이용하여 해충 방제에 이용하는 방안 가운데 내충성 작물 육종이 실현 가능한 전략으로 입증되었다(Kim et al., 2016). 본 연구는 CpBV-ELP1 유전자의 살충력을 검증하여 작물육종의 유전자원으로 응용 가능성을 분석하기 위해 진행되었다. 이를 위해 이 단백질의 순수 분리를 통해 생리 교란 및 살충력을 분석하였고, 이를 기반으로 담배를 이용하여 형질전환 작물을 제작하여 응용 가능성을 검증하였다.

재료 및 방법

파밤나방 증식 및 조직 추출

이 연구에 사용한 파밤나방은 안동지역 파밭에서 채집한 유충을 항생제가 빠진 Goh et al. (1990)의 인공사료를 먹이로 약 10년간 실내 누대 사육한 집단을 이용하였다. 형질전환 담배를 섭취를 통해 생물검정한 발육시기는 1령 유충이고 단백질 혈장 주입에 따라 독성을 분석할 시기는 5령 유충이다. 혈구 조직시료는 5령 유충을 대상으로 복부 다리를 절단한 후 빠져나오는 혈림프를 수거하여 1,500 x g의 원심력으로 혈장을 제거하고 가라앉은 침전물을 다시 0.7% NaCl이 포함된 100 mM 인산완충용액(phosphate buffer saline: PBS)으로 현탁시켜 준비하였다.

세포배양

Sf9 세포주(IPLB-Sf21-AE)는 *Spodoptera frugiperda*의 번데기 난소 조직에서 유래되었으며, 5% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Daegu, Korea) 및 antibiotic-antimycotic 복합체(Cat. No. 15240-062, Gibco, Grand Island, NY, USA)를 첨가한 TC100 곤충세포배양액(Cat. No. LM505-01, Hyclone)에서 배양

되었다. Sf9세포는 25 cm² tissue culture flask (Cat. No. 156340, Nunc, Roskilde, Denmark)를 이용하여 28°C 조건에서 증식되었다.

암 세포주로서 MCF-7 (Korean Cell Line Bank (KCLB) No. 30022)과 MDA-MB-231 (KCLB No. 30026)은 인체 유방암 유래이다. 반면에 LOVO (KCLB No. 10229), HC116 (KCLB No. 10247), SW480 (KCLB No. 10228)은 모두 대장암 유래이다. 이들 세포들은 모두 10% FBS와 항생제(100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 (1:1, v/v)를 이용하여 배양하였다. 세포배양은 75 cm² tissue culture flask (Cat. No. 156499, Nunc)를 이용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 이뤄졌다.

재조합 배콜로바이러스 및 과발현

CpBV-ELP1은 Jung et al. (2006)의 방법으로 배콜로바이러스에 재조합되었다. Budded virus 형태의 배콜로바이러스 현탁액(10⁷ plaque-forming unit/mL)을 25 cm² tissue culture flask에 미포화(subconfluent) 상태로 증식된 Sf9 세포에 2시간 접종하고, 다시 새로운 TC100 세포배양액으로 치환하여 72시간 배양하여 상등액을 수거하였다. 이러한 방법으로 전체 1 L의 배양액을 모아 단백질 분리에 이용하였다.

CpBV-ELP1 단백질 분리

Ammonium sulfate 분리. CpBV-ELP1의 과발현을 통해 얻어진 세포배양 상등액은 차등적 ammonium sulfate (Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea) 농도(0-25, 25-50, 50-75, 75-100%)로 단백질을 분리하였다. 각 염농도에서 30분간 얼음 속에서 반응시키고, 이후 13,500 x g에서 10분간 원심분리하여 농도별 단백질 침전물을 얻었다. 이후 상등액은 다음 단계의 염농도 침전 반응으로 이어지게 하였다. 각 농도 구획별로 분리된 단백질은 Bradford (1976) 방법을 이용하여 전체 단백질량을 분석하였고, 10% SDS-PAGE를 통해 단백질 구성을 분석하였다.

Size-exclusion 크로마토그래피. 컬럼(길이 1.5 m × 직경 1 cm) 내부의 고정상은 100 kDa 이상의 단백질 크기를 배척할 수 있는 수지(Sephadex G-100, Sigma-Aldrich Korea)를 이용하였다. 이동상은 0.01% Triton-X100을 포함한 PBS를 이용하였다. Ammonium sulfate의 25-50%, 50-75%, 75-100% 침전물을 혼합하여 분리될 시료로 준비하였다. 이 단백질 시료를 대상으로 size-exclusion 크로마토그래피의 분획 채취는 2 mL의 부

피로 분리될 단백질 시료가 고정상으로 모두 이동한 후 총 75개의 분획을 얻었다. 단백질이 검출된 분획 시료들을 바탕으로 10% SDS-PAGE로 목표 단백질을 추적하였다.

이온교환 크로마토그래피. 위와 동일한 컬럼을 이용하여 음이온 교환수지(DEAE, Sigma-Aldrich Korea)를 이용하였다. 분리 초기에 이동상도 동일한 PBS 용액을 이용하였으나, 흡착된 단백질을 분리시키기 위해 0.5 M NaCl을 포함한 PBS가 20번 분획을 받은 이후에 이용되었다. 목표 단백질의 추적은 10% SDS-PAGE를 이용하였다.

CpBV-ELP1의 살충력 생물검정

단백질 분리된 CpBV-ELP1의 살충력 검정은 혈강 주입과 경구 섭식실험을 통해 이뤄졌다. PBS에 서로 다른 농도(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 µg/mL)로 희석한 단백질을 각 파밤나방 5령충(5령으로 탈피 후 1일) 개체 마다 2 µL의 부피로 미세주사위(Hamilton, Reno, NV, USA)를 이용하여 복부 첫 번째 다리를 통해 혈강에 주입하였다. 처리된 개체는 인공사료로 상기의 사육조건에 사망 유무를 관찰하였다. 살충율은 처리 5일 후에 산출하였다. 섭식 처리는 배추잎(3 × 3 cm) 크기로 자르고 서로 다른 농도의 CpBV-ELP1 용액(0, 0.25, 0.5, 1, 2 µg/mL)에 5분간 침지하였다. 처리된 배추잎을 파밤나방 5령충(5령으로 탈피 후 1일)에게 24시간 섭식하게 하고, 이후에 처리되지 않은 건전 잎을 매일 공급하여 주었다. 사망율은 초기 처리일로 부터 5일 경과 후 분석하였다. 혈강주입 및 경구처리하는 모두 반복 당 10마리로 3반복으로 진행하였다.

형질전환 작물체의 생물검정은 담배잎을 3 × 3 cm 크기로 자른 후 파밤나방 1령충을 사용하여 10마리씩 3반복으로 처리하였다. 살충율은 매 24시간 간격으로 조사하였다.

CpBV-ELP1의 세포독성

파밤나방에 대한 혈구치사효과. 파밤나방 5령충(5령으로 탈피 후 3일)을 대상으로 순수 분리된 CpBV-ELP1 단백질(1 µg/µL)을 2 µL 주입한 후 25°C에서 24시간 경과시켰다. 처리된 개체들로 부터 혈림프를 채취하고 hemocytometer (Marienfeld, Germany)를 이용하여 총혈구수를 계수하였다. 이때 총혈구수는 1 mL에 존재하는 전체 혈구수로 표기하였다. 대조구로서 CpBV-ELP1 단백질을 희석할 때 사용한 PBS를 처리하였다. 각 처리는 3반복으로 실시되었다.

인체 암세포주에 대한 세포활성분석. 세포활성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Cat. No. M-2128, Sigma-Aldrich Korea, Korea) 염색약을 이용하여 분석되었다. 처리될 세포 10,000개/50 µL를 96 well plate 각각에 분주하였다. CpBV-ELP1 단백질 시료는 세포 배양액으로 희석하였으며, 50 µL의 용량으로 세포 현탁액에 첨가 후 37°C에서 24시간 처리하였다. 이후 20 µL의 MTT (5 mg/mL)를 첨가하여 28°C에서 5시간 처리하였다. 이후 다시 70 µL의 25% sodium dodecyl sulfate를 첨가한 후 상온에서 16-18시간 방치하여 형성된 formagen을 용해시켰다. 이후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포별 및 처리 농도별 3반복으로 실시되었다.

CpBV-ELP1 발현 담배 제작

CpBV-ELP1 유전자의 판독틀(open reading frame: ORF) 영역을 Bam HI 인식서열이 첨가된 정방향 프라이머(5'-GGATCCATGTTCAACAAAGTAGTC-3')와 Sma I 인식서열이 부가된 역방향 프라이머(5'-CCCGGGCTATTGCAGCCGATACTAGGA-3')를 사용하여 증폭하였다. 이때 사용된 PCR 조건은 94°C에서 5분 동안 초기 변성반응 후, 94°C에서 30초, 50°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분의 일련의 반응 주기로 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 반응을 추가하였다. 얻어진 PCR 산물을 pCR2.1 클로닝벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 삽입하여 증식된 재조합 플라스미드를 분리하여 제한 효소 Bam HI와 Sma I으로 절단하였다. 한편 삽입될 pBI121 (GSL Biotech, Chicago, IL, USA) 벡터는 CaMV 35S 프로모터 아래의 Bam HI 부위와 opaline synthase terminator (NOS-T) 위의 Sma I 부위를 제한효소로 절단하여 리포터 유전자로 이용되는 β-glucuronidase (GUS) 유전자의 ORF 영역을 제거하여 이 부위에 CpBV-ELP1 유전자를 삽입하여 재조합벡터(pBI121-ELP1)를 제조하였다. pBI121-ELP1를 뿌리혹세균(*Agrobacterium tumefaciens*)에 전기충격으로 형질전환하였다. 이때 *A. tumefaciens* LBA4404 (Takara, Otsu, Shiga, Japan) 세포(electro-cells) 20 µL에 상기 pBI12-ELP1 DNA 1 ng을 혼합하고, 1.25 KV의 전기충격(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 가한 후 SOC 배지(Sambrook et al., 1989)를 첨가하여 30°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 진탕 배양하였다. 형질전환된 세균을 kanamycin과 streptomycin이 함유된 Luria-Bertani (LB) 고체배지(Sambrook et al., 1989)를 사용하여 30°C에서 2일 동안 배양하였다. 선발된 균총은 다시 DNA 염기서열로 벡터와 삽입체 ORF의 방향을 확인한 후 LB 액체배지를 사용하여 28°C에서 2일 동안 200 rpm으로 배양하였다. 이후 얻어진 세균은

캘러스(callus) 유도 액체배지(배지 1 L 기준: 4.4 g MS 배지, 20 g sucrose, 2 mg α -나프탈렌 아세트산(NAA), 0.5mg 6-벤질아미노퓨린(BAP), pH 5.8) 40 ml에 재현탁하였다. *Nicotiana tabacum* Xanthi 잎 조각을 아그로박테리움 현탁액에 20분 동안 침지시킨 후 28°C, 암조건 하에서 2일 동안 phyto agar (8g/L)를 포함하는 캘러스 유도 배지에서 증식시켰다. 그 후 캘러스 선택배지(1 L 기준: 4.4 g MS 배지, 20 g sucrose, 0.1 mg NAA, 0.5 mg BAP, 8 g phyto agar)로 옮겨서 28°C, 암조건 하에서 7일 동안 증식하였다. 발아(shooting)를 유도하기 위하여, 담배 캘러스를 슈팅배지(1 L 기준: 4.4 g MS 배지, 20 g sucrose, 0.1 mg NAA, 0.5 mg BAP, 8 g phyto agar, 250 mg cefotaxime)에 놓아두었다. 발아를 유도한 후 뿌리형성(rooting)을 유도하기 위하여, 발아된 담배를 루팅배지(1 L 기준: 4.4 g MS 배지, 20 g sucrose, 8 g phyto agar, 250 mg cefotaxime)에 3주 동안 증식시켰다. 이후 원예용 상토에 1주 동안 적응시킨 후 온실에 옮겨져 성장시켰다. T0 세대(형질전환 첫세대)의 담배를 자가 수정하여 T1 세대(형질전환 2 세대) 종자를 얻었다.

형질전환 담배의 CpBV-ELP1 발현 분석

Kim et al. (2016)에 기술된 방법을 이용하여 형질전환된 담배의 CpBV-ELP1 발현 분석은 게놈 DNA를 대상으로 PCR 방법으로 진행하였고, 다시 RNA 추출하여 RT-qPCR 그리고 최종적으로 단백질의 발현은 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 진행되었다. ELISA를 위해 Kwon and Kim (2008)에 제작된 항체를 이용하였다. 표준 단백질은 본 연구에서 분리된 CpBV-ELP1 단백질을 정량화하여 이용하였다.

결과

CpBV-ELP1 단백질 분리

배큘로바이러스 발현시스템으로 합성된 CpBV-ELP1 단백질을 일련의 단백질 분리 기술을 이용하여 분리하였다(Fig. 1). CpBV-ELP1은 signal peptide를 가지고 있으며, 이 단백질이 Sf9 세포 배양용액으로 분비되어 나오는 것을 확인하였다. 이

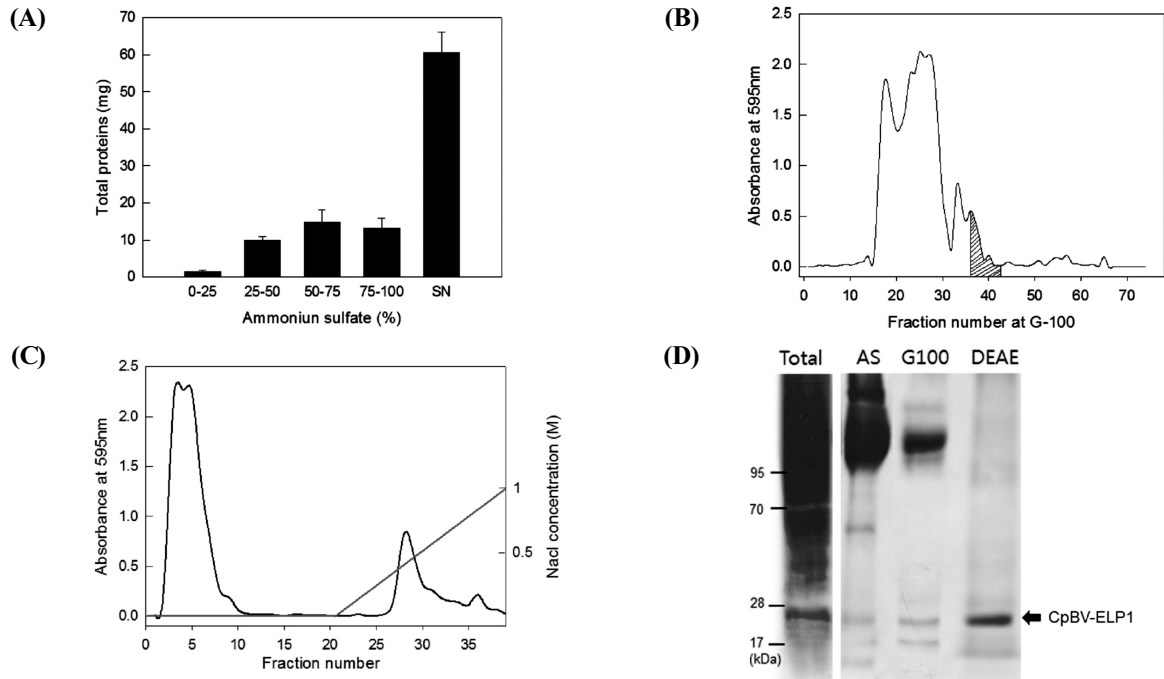


Fig. 1. Purification of CpBV-ELP1. *CpBV-ELP1* was expressed in Sf9 cells using a baculovirus. Cultured broth was fractionated with a series of purification steps. (A) Ammonium sulfate protein fractionation. Each fraction was measured in protein amount per 1 L culture broth. 'SN' stands for supernatant. Three replications were performed and the error bars above means indicate standard deviations. (B) Size exclusion chromatography of 25-100% ammonium sulfate precipitates. Proteins were separated on Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich Korea). Shaded area indicates fractions containing CpBV-ELP1. (C) Ion exchange chromatography using DEAE resin to further fractionate proteins containing CpBV-ELP1 obtained from size exclusion chromatography. Straight line indicates change of NaCl concentrations for elution. (D) 10% SDS-PAGE of proteins in different protein purification steps. 'Total' represents original cultured broth containing CpBV-ELP1. 'AS' stands for 25-100% ammonium sulfate fractions. 'G100' stands for size exclusion chromatography fractions (#31-40). 'DEAE' stands for ion exchange chromatography fractions (#28-29).

배양액(약 120 mg/L)을 모아 ammonium sulfate (AS)를 이용하여 단백질 분획을 시도하였다(Fig. 1A). AS 농도별로 네 가지 서로 다른 분획에서 25-50%, 50-75%, 75-100% 분획에서 살충력을 나타냈다. 또한 이들 분획은 모두 CpBV-ELP1의 기대 분자량인 27 kDa 크기의 단백질 밴드를 보유하고 있었다. 이후의 단백질 분리는 이 27 kDa 단백질 밴드를 추적하였다. AS 세 분획(25-100%: 약 45 mg)을 모아서 size exclusion 크로마토그래피를 이용한 단백질 분리 기술을 적용하였다(Fig. 1B). 이들 통해 얻어진 75개의 분획 가운데 31-40번 분획들이 27 kDa 단백질 밴드를 보유하고 있었다. 이들 10개의 분획 단백질을 모아 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다(Fig. 1C). CpBV-ELP1은 DEAE에 흡착되었고, 이를 0.5 M NaCl로 분리하였다. 이를 통해 27 kDa 단백질 포함하고 비표적 단백질 적은 28, 29번 분획을 모아 최종 CpBV-ELP1 분리 단백질 약 1.5 mg을 얻었다(Fig. 1D).

CpBV-ELP1 단백질 세포독성

파밤나방을 대상으로 CpBV-ELP1의 혈구세포에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 2A). 파밤나방 5령 가운데 탈피 후 3일 경과된 유충이 가장 높은 혈구밀도를 지닌다(Park and Kim, 2012). 이 시기를 대상으로 2 µg의 순수 분리된 CpBV-ELP1을 주입시킨 결과 처리 후 24시간이 경과하였을 때 뚜렷한 총혈구수 감소가 관찰되었다. 대조구의 경우 8.2×10^6 cells/mL의 총혈구수를 보였으나, CpBV-ELP1을 처리하게 되면 4.0×10^6 cells/mL의 낮은 총혈구수 밀도를 보였다.

혈구세포에 대한 세포독성을 갖는 CpBV-ELP1이 다른 세

포들에 대해서도 이러한 독성을 갖는지를 규명하는 것은 이 유전자의 살충기작을 이해하는 데 도움이 된다. 이에 5 종류의 서로 다른 인체 암세포에도 영향을 주는 지를 분석하였다(Fig. 2B). CpBV-ELP1은 모든 암세포에 대해서 세포독성을 보였다. 특히 대장암 세포주인 HC116와 LOVO가 높은 감수성을 나타냈다.

CpBV-ELP1 단백질 살충력

CpBV-ELP1의 세포독성 효과는 이 단백질이 살충력을 가질 수 있다는 것을 내포하였다. 이를 분석하기 위해 서로 다른 농도의 CpBV-ELP1 단백질을 파밤나방 5령충 혈강에 주입하였다(Fig. 3A). CpBV-ELP1은 농도가 증가함에 따라 살충력이 증가하는 양독반응을 보였다. CpBV-ELP1의 주입 농도가 1 µg 이상에서 최대 살충력을 나타냈다. 경구독성 작용이 혈강에 주입한 농도에 비해 1,000배 높은 농도에서 일어났다(Fig. 3B). 이러한 경구독성은 5령충의 경우 최대 약 50% 까지 나타났다.

형질전환 식물체 (Xanthi-ELP1)의 살충력 검증

CpBV-ELP1을 발현하는 담배가 제작되었다(Fig. 4). 이 바이러스 단백질의 발현을 확인하기 위해 각 발현체별로 게놈 DNA를 추출하여 PCR로 확인하였다. 선발된 10개체는 모두 CpBV-ELP1을 발현하는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 반면에 비형질전환체는 CpBV-ELP1의 판별 617 bp 증폭물이 나타나지 않았다. RT-PCR을 이용하여 이들 형질전환체 담배가 CpBV-ELP1 유전자를 발현하는 지를 검증하였다(Fig. 4B). 분석된 10개체는

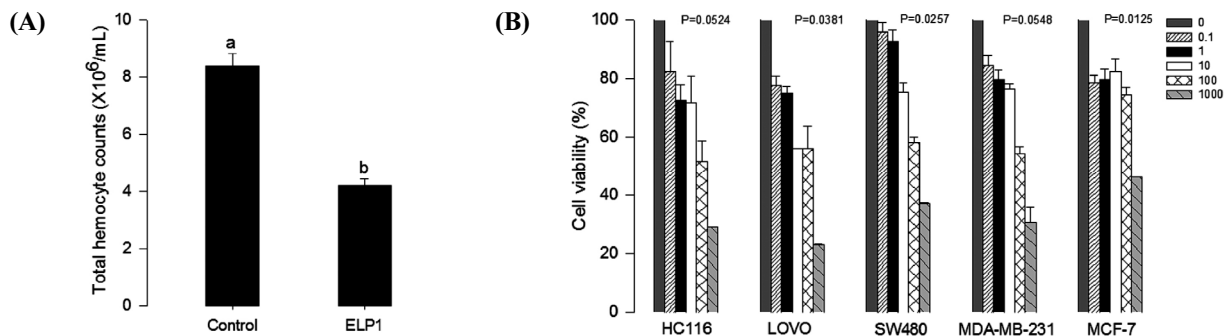


Fig. 2. Cytotoxicity of CpBV-ELP1. (A) Effect of CpBV-ELP1 on hemocytes of *S. exigua*. Purified CpBV-ELP1 protein (1 µg/µL) was injected to each larva (3 days after 5th instar molting) in 2 µL volume. After 24 h at 25 °C, hemolymph was collected and total hemocytes were counted. Each treatment was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). (B) Effect of CpBV-ELP1 on human cancer cell lines (see Materials and methods). About 10,000 cells in 50 µL were seeded in each well of 96 microplate and added with 50 µL of different concentrations of CpBV-ELP1 in TC100 culture medium. After 24 h culture at 37 °C. MTT assay was performed to assess cell viability. Each treatment was replicated three times. Error bar indicates standard deviation. P values indicate Type I errors among different concentration treatments.

모두 이 바이러스 유전자를 발현하였다. 다시 이들 CpBV-ELP1을 발현하는 형질전환체 담배 잎에 있는 CpBV-ELP1 단백질의 함량을 알아보기 위해 ELISA 방법으로 분석한 결과 이들 모두는 대조구(비형질전환체)가 나타내는 기저 신호에 비해 높은 단백질 함유 신호를 나타냈다(Fig. 4C). 그러나 이들 형질전환체 사이에 CpBV-ELP1의 함유량은 상이한 것으로 나타났다. ELISA 신호를 기준으로 8번 개체가 가장 높은 CpBV-ELP1 단백질을 발현한 것으로 나타났다. 이들 개체를 파밤나방 1령충에 섭식시켜 살충력을 검증하였다(Fig. 4D). CpBV-ELP1을 발

현하는 형질전환 담배 모두는 파밤나방에 살충력을 나타냈으며, 이 가운데 4번과 10번 개체가 가장 살충력이 높은 것으로 나타났다.

고찰

해충에 대한 내충성을 주는 형질전환작물을 개발하는 데 이용될 외래 유전자는 대상 해충에 대해서 경구 독성을 가져야 한다. 이를 증명하기 위해 본 연구는 먼저 이 단백질을 배컬로바

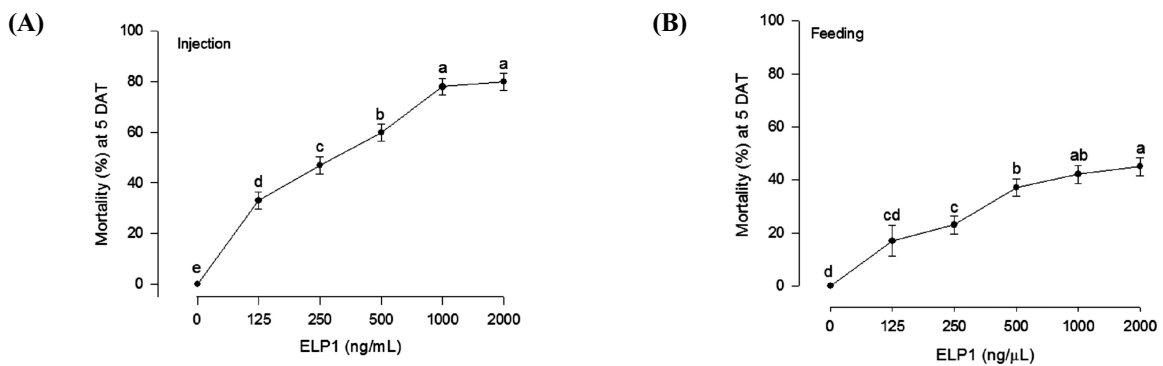


Fig. 3. Insecticidal activity of CpBV-ELP1 against fifth instar larvae of *S. exigua*. (A) Injection assay. Different concentrations of CpBV-ELP1 were diluted in PBS. Each larva (1 day after 5th instar molting) was injected in 2 μ L volume. (B) Feeding assay. Cabbage leaves were dipped in different concentrations of CpBV-ELP1 and were used to feed the fifth instar larvae for 24 h. Mortality was measured at 5 days after treatment (DAT). Each treatment used 10 larvae and was replicated three times.

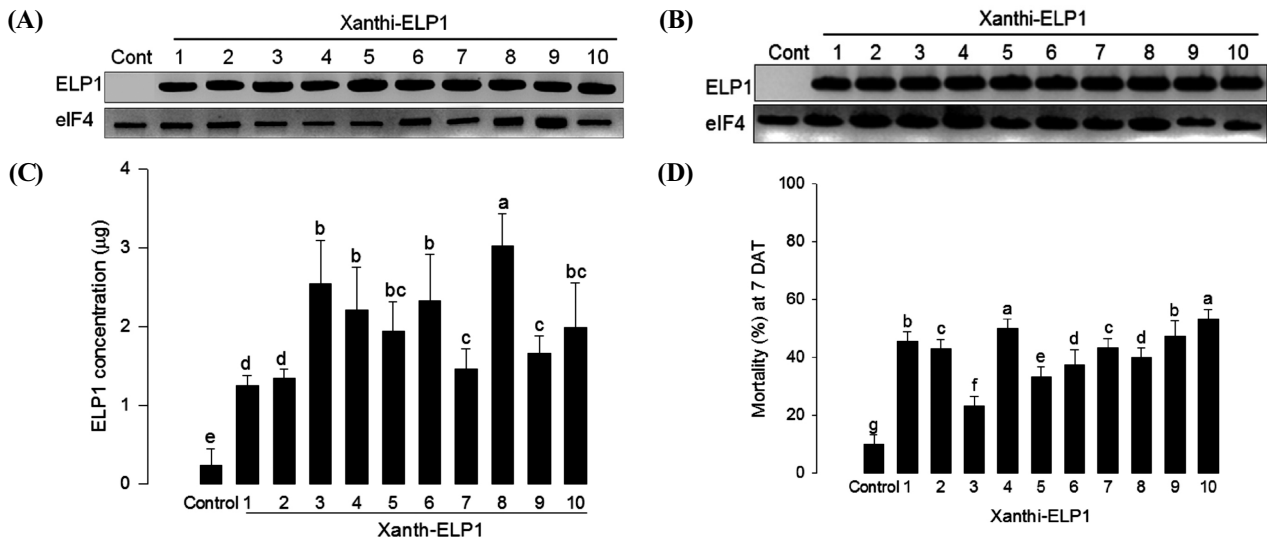


Fig. 4. Insect resistance of a transgenic tobacco (Xanthi variety) expressing *CpBV-ELP1* (Xanthi-ELP1). (A) Genomic PCR of *CpBV-ELP1* ('ELP1') from randomly chosen 10 T1 tobacco plants. (B) RT-PCR of ELP1 from the 10 T1 tobacco plants. 'eIF4' is a positive control gene for PCR. (C) ELISA assay to quantify ELP1 protein in 1 g of tobacco leaves. (D) Insecticidal activity of the 10 T1 tobacco plants against 1st instar larvae of *S. exigua*. Mortality was measured after 7 days after initial feeding treatment (DAT). Each treatment used 10 larvae and was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). 'Cont' or 'Control' represents nontransgenic Xanthi tobacco plants.

이러스를 이용하여 과발현 및 순수 분리를 진행하였다. 일련의 단백질 분리 과정을 통해 본 연구는 CpBV-ELP1이 충분히 농축된 분획을 얻었다. 이를 통해 얻어진 단백질은 혈강주입 및 경구를 통해 살충력을 분석하였다. 혈강주입의 경우는 파밤나방 5령충을 대상으로 개체 당 1 µg 이상에서 80% 이상의 높은 살충력을 나타냈다. 경구처리에서도 CpBV-ELP1은 살충력을 주었으나, 혈강 주입에 비해 매우 높은 농도로 처리가 필요하였다. CpBV-ELP1의 경구독성에 대해 아직 정확한 독성기작은 파악되지 않았으나 이 단백질의 세포독성에 기인된 것으로 추정된다. 본 연구는 이 단백질이 곤충의 혈구세포는 물론이고 인체의 암세포주에 대해서 세포독성이 있는 것을 보여 주었다. 이 단백질은 기생초기에 다량으로 합성되어 기주 혈림프에 존재한다(Harwood et al., 1994). Kwon and Kim (2008)은 이 혈강에 존재한 단백질이 다양한 조직의 세포 내부로 침입이 가능한 것으로 보여 주었다. 본 연구는 여기에 이 단백질이 높은 세포 독성효과가 있는 것을 보여 주었다. 따라서 경구 처리로 소화관으로 들어간 CpBV-ELP1은 소화관의 상피세포를 침입하였을 것이고, 여기서 세포독성을 발휘한 것으로 독성 작용을 추정하여 볼 수 있다.

경구독성을 지닌 CpBV-ELP1을 담배를 대상으로 형질전환 작물을 제작하였다. 뿌리혹세균인 아그로박테리움을 이용한 형질전환은 높은 효율의 유전자 도입을 주었다. T1 세대로 선발된 10개의 담배 개체 모두는 이 도입유전자를 발현하였으며, 모두 파밤나방 1령충에 대해서 살충력을 나타냈다. 그러나 살충력은 최대 50%를 넘지 못했다. 모든 폴리드나바이러스 유래 유전자의 도입이 유사한 살충력을 보이는 것은 아니다. 최초로 폴리드나바이러스를 이용하여 형질전환담배를 제작한 것은 이 크노바이러스가 보유하고 있는 Cys-motif 유전자이다(Maiti et al., 2003). 이전의 유사한 Cys-motif 유전자가 기형세포에서 유래된 TSP14으로 높은 경구독성으로 형질전환된 담배가 나방류 해충에 대해 높은 살충력을 발휘하였다. 반면에 유사한 브라코바이러스에서 유래된 ankyrin 유전자로 형질전환된 담배는 50% 미만의 살충력을 주었다(Di Lelio et al., 2014). 대조적으로 CpBV-CST 유전자로 형질전환된 담배는 100%의 살충력을 나타냈다(Kim et al., 2016). 이러한 결과는 물론 대상 해충이 달라지면 상이한 살충력 결과를 줄 수 있기에 대상 해충을 겨냥한 살충유전자의 탐색이 형질전환작물을 개발하는 데 필수적이라는 것을 제시하고 있다. 향후 본 연구에서 개발된 형질전환 작물을 대상으로 적용 해충 범위를 분석하는 연구가 진행될 필요가 있다.

사 사

본 연구는 학부 유전학 수업에 형질전환 재료를 확보하기 위해 2016년도 안동대학교 학생교육지도비로 지원되었다.

Literature Cited

- Ali, R., Kim, Y., 2012. A novel polydnviral gene family, BEN, and its immunosuppressive function in larvae of *Plutella xylostella* parasitized by *Cotesia plutellae*. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 389-397.
- Bae, S., Kim, Y., 2004. Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 39-44.
- Basio, N.A.M., Kim, Y., 2006. Additive effect of teratocyte and calyx fluid from *Cotesia plutellae* on immunosuppression of *Plutella xylostella*. *Physiol. Entomol.* 31, 341-347.
- Bézier, A., Annaheim, M., Herbinière, J., Wetterwald, C., Gyapay, G., Bernard-Samain, S., Wincker, P., Roditi, I., Heller, M., Belghazi, M., Pfister-Wilhem, R., Periquet, G., Dupuy, C., Huguet, E., Volkoff, A.N., Lanzrein, B., Drezen, J.M., 2009. Polydnviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science* 323, 926-930.
- Bézier, A., Louis, F., Jancek, S., Periquet, G., Thézé, J., Gyapay, G., Musset, K., Lesobre, J., Lenoble, P., Dupuy, C., Gundersen-Rindal, D., Herniou, E.A., Drezen, J.M., 2013. Functional endogenous viral elements in the genome of the parasitoid wasp *Cotesia congregata*: insights into the evolutionary dynamics of bracoviruses. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 368, 20130047.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chen, Y.F., Gao, F., Ye, X.Q., Wei, S.J., Shi, M., Zheng, H.J., Chen, X.X., 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis* bracovirus reveals the complexity of a polydnviral genome. *Virology* 414, 42-50.
- Choi, J.Y., Roh, J.Y., Kang, J.N., Shim, H.J., Woo, S.D., Jin, B.R., Li, M.S., Je, Y.H., 2005. Genomic segments cloning and analysis of *Cotesia plutellae* polydnviral using plasmid capture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 487-493.
- Di Lelio, I., Caccia, S., Coppola, M., Buonanno, M., Di Prisco, G., Varricchio, P., Franzetti, E., Corrado, G., Monti, S.M., Rao, R., Casartelli, M., Pennacchio, F., 2014. A virulence factor encoded by a polydnviral confers tolerance to transgenic tobacco plants against lepidopteran larvae, by impairing nutrient absorption. *PLoS ONE* 9, e113988.
- Gad, W., Kim, Y., 2008. A viral histone H4 encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus inhibits hemocyte spreading behavior of the

- diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Gen. Virol. 89, 931-938.
- Gad, W., Kim, Y., 2009. N-terminal tail of a viral histone H4 encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus is essential to suppress gene expression of host histone H4. Insect Mol. Biol. 18, 111-118.
- Goh, H.G., Lee, S.G., Lee, B.P., Choi, K.M., Kim, J.H., 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. Korean J. Appl. Entomol. 29, 180-183.
- Harwood, S.H., Grossovsky, A.J., Cowles, E.A., Davis, J.W., Beckage, N.E., 1994. An abundantly expressed hemolymph glycoprotein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polydnavirus gene product. Virology 205, 381-392.
- Hepat, R., Song, J., Lee, D., Kim, Y., 2013. A viral histone H4 joins to eukaryotic nucleosomes and alters host gene expression. J. Virol. 87, 11223-11230.
- Herniou, E.A., Huguet, E., Thézé, J., Bézier, A., Periquet, G., Drezen, J.M., 2013. When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnaviruses. Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. 368, 20130051.
- Ibrahim, A.M., Kim, Y., 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 AM, Kim Y. 2008. Transient expression of protein tyrosine phosphatases encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus inhibits insect cellular immune responses. Naturwissenschaften 95, 25-32.
- Jung, S., Kwoen, M., Choi, J.Y., Je, Y.H., Kim, Y., 2006. Parasitism of *Cotesia* spp. enhances susceptibility of *Plutella xylostella* to other pathogens. J. Asia Pac. Entomol. 9, 255-263.
- Kim, E., Kim, Y., 2016. Translational control of host gene expression by a Cys-motif protein encoded in a bracovirus. PLoS ONE 11, e0161661.
- Kim, E., Kim, Y., Yeam, I., Kim, Y., 2016. Transgenic expression of a viral cystatin gene CpBV-CST1 in tobacco confers insect resistance. Environ. Entomol. 45, 1322-1331.
- Kim, Y. 2006. Polydnavirus and its novel application to insect pest control. Korean J. Appl. Entomol. 45, 241-259.
- Kim, Y., Bae, S., Lee, S., 2004. Polydnavirus replication and ovipositional habit of *Cotesia plutellae*. Korean J. Appl. Entomol. 43, 225-231.
- Kim, Y., Ryu, S., 2007. Ultrastructure of *Cotesia plutellae* bracovirus in its replication at wasp ovarian calyx. J. Asia Pac. Entomol. 10, 357-361.
- Kumar, S., Gu, X., Kim, Y., 2016a. A viral histone H4 suppresses insect insulin signal and delays host development. Dev. Comp. Immunol. 63, 66-77.
- Kumar, S., Venkata, P., Kim, Y., 2016b. Suppressive activity of a viral histone H4 against two host chromatin remodeling factors: lysine demethylase and SWI/SNF. J. Gen. Virol., In press.
- Kwon, B., Kim, Y., 2008. Transient expression of an EP1-like gene encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppresses the hemocyte population in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Dev. Comp. Immunol. 32, 932-942.
- Kwon, B., Song, S., Choi, J.Y., Je, Y.H., Kim, Y., 2010. Transient expression of specific *Cotesia plutellae* bracoviral segments induces prolonged larval development of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Insect Physiol. 56, 650-658.
- Lee, S., Kim, Y., 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.
- Maiti, I.B., Dey, N., Pattanaik, S., Dahlman, D.L., Rana, R.L., Webb, B.A., 2003. Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). Plant Biotechnol. J. 1, 209-219.
- Park, J., Kim, Y., 2012. Change in hemocyte populations of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, in response to bacterial infection and eicosanoid mediation. Korean J. Appl. Entomol. 61, 349-356.
- Prasad, S.V., Hepat, R., Kim, Y., 2014. Selectivity of a translation-inhibitory factor, CpBV15 β , in host mRNAs and subsequent alterations in host development and immunity. Dev. Comp. Immunol. 44, 152-162.
- Pruijssers, A.J., Strand, M.R., 2007. PTP-H2 and PTP-H3 from *Microplitis demolitor* bracovirus localize to focal adhesions and are antiphagocytic in insect immune cells. J. Virol., 81, 1209-1219.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Stoltz, D.B., 1990. Evidence for chromosomal transmission of polydnavirus genomes. Can. J. Microbiol. 36, 538-543.
- Strand, M.R., Burke, G.R., 2013. Polydnavirus-wasp associations: evolution, genome organization, and function. Curr. Opin. Virol. 3, 587-594.
- Strand, M.R., Burke, G.R., 2015. Polydnaviruses: from discovery to current insights. Virology 479-480, 393-402
- Surakasi, V.P., Nalini, M., Kim, Y., 2011. Host translational control of a polydnavirus, *Cotesia plutellae* bracovirus, by sequestering host eIF4A to prevent formation of a translation initiation complex. Insect Mol. Biol. 20, 609-618.
- Volkoff, A.N., Jouan, V., Urbach, S., Samain, S., Bergoin, M., Wincker, P., Demetere, E., Cousserans, F., Provost, B., Coulibaly, F., Legeai, F., Béliveau, C., Cusson, M., Gyapay, G., Drezen, J.M., 2010. Analysis of virion structural components reveals vestiges of the ancestral ichnovirus genome. PLoS Pathog. 6, e1000923.
- Webb, B.A., Beckage, N.E., Hayakawa, Y., Krell, P.J., Lanzrein, B., Stoltz, D.B., Strand, M.R., Summers, M.D., 2000. Family polydnaviridae. in: van Regenmortel, M.H.V., Faquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lennon, S.M., Maniloff, J.M., Mayo, A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R.,

-
- Wickner, R.B. (Eds.), Virus taxonomy. Academic Press, New York. pp. 253-260.
- Webb, B.A., Strand, M.R., Dickey, S.E., Beck, M.H., Hilgarth, R.S., Kadash, K., Kroemer, J.A., Lindstorm, K.G., Rattanadechakul, W., Shelby, K.S., Thoetkiattikul, H., Turnbull, M.W., Witherell, R.A., Barney, W.E., 2006. Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. *Virology* 347, 160-174.
- Wyler, T., Lanzrein, B., 2003. Ovary development and polydnavirus morphogenesis in the parasitic wasp *Chelonus inanitus*. II. Ultrastructural analysis of calyx cell development, virion formation and release. *J. Gen. Virol.* 84, 1151-1163.