Seri. J. of Korea Vol. 21(2), 1979

家蠶의 軟化病 바이러스에 關한 硏究

II. 軟化病 바이러스 Polypeptide의 性狀

姜 錫 權·金 槿 榮*

서울大學校 農科大學, *農村振興廳 蠶業試驗場

Studies on Flacherie and Ina-flacherie Viruses of the Silkworm, *Bombyx mori*

II. Some Properties of Polypeptide of Flacherie Virus

Seok Kwon Kang. Keun Young Kim*

College of Agriculture, Seoul National University

*Sericultural Experiment Station, Office of Rural Development

Summary

Purified preparations of flacherie virus capsid protein were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and amino acid composition was determined by amino acid analyzer.

Three polypeptide components, FP I, FP II and FP III were detected, and the molecular weights of these components were 37,500, 30,500 and 26,500 respectively. The FPIII was major polypeptide comprised about 68.4% of the total virus capsid protein.

Seventeen amino acids were detected by an amino acid analyzer from hydrolyzate of the virus capsid protein and the pattern of amino acid composition was similar to those of several other insect viruses.

緖 言

家蠶의 軟化病은 가장 被害가 큰 蠶病으로 알려져있다. Paillot가 1929年 本病은 傳染性이 있고 바이러스에 依한 것이라고 처음 지적한 이래 오랫동안 生理障害 및 細菌에 의한 疾病으로 간주되어 왔다.

1960年代에 와서 山崎등은 軟化病 症狀을 나타내는 病蠶 磨碎液의 限外 濾液을 健康蠶에 投與한 結果 높은 發病率을 나타냄을 發見하였다. 또 鮎澤(啓) 等은 單離된 起病性 因子는 免疫血淸에 의하여 中和되고 그 起病性 因子의 直徑은 30~32mm의 均一한 球型粒子이며 그것이 바이러스임을 證明하였다. Himeno 等은 庶糖密度勾配 遠心法에 의하여 바이러스를 精製하여 直徑 27mm, 沈降定數 180S의 球型粒子임을 報告하였다.

이와같은 軟化病 바이러스는 核多角體 바이러스나 細胞質多角體 바이러스와는 달리 封入體를 形成하지않으므로 그 純化, 精製가 어려워 바이러스 性狀이 長期間 究明되지 못하였다. 鮎澤(千), Himeno等 및 川瀨等(未發表)에 의한 精製法이 알려져 왔으나 收率이 낮고 純化가 完全치 못하였는데, 1977年 姜에 의해 純度가 높고 收率이 좋은 精製法이 確立되어 本 바이러스 性狀의 究明이 可能하게 되어, 本 바이러스의 性狀調査 結果 Picorna바이러스에 屬한다고 結論을 내렸다. 이에 對하여 筆者들은 바이러스 精製를 姜의 方法에 의하여 實施하고 그 바이러스 標品을 供試하여 本 바이러스의 Polypeptide 性狀에 對해 調査하였다.

材料 및 方法

1. SDS-Polyacrylamide gel 電氣泳動

姜의 바이러스 精製法에 의하여 精製한 바이러스 標品을 1% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1% β-mercaptoethanol, 10%庶糖溶液에 浮遊하고 100°C의熱

湯內에서 2分間 加熱 蛋白質을 溶解하여 SDS-Polyacrylamide gel 電氣泳動法(Acrylamide 및 Methylenebisacrylamide의 精製는 常法에 準했음)에 의하여 7.5%와 10% 濃度의 gel을 만들었다. gel 1 本當 바이러스 蛋白質 約 20μg(溶液量 50μl)을 注入하고, 7mA의 電流를 通하게하여 2.5時間 泳動했다. 泳動用 緩衝液은 0.1% SDS를 含有한 0.25M 인산 나트륨 緩衝液(pH 7.2)을 使用했다. 泳動後 gel의 染色은 20% 초산에 溶解한 0.5% Amido Black-10B를 채운 試驗管에 gel을 넣고 2~3時間 放置한 후 끓는 물에서 1時間 煮沸시켰다. 그 후 7% 초산溶液에서 脫色시켰다. 分子量 算出을 爲해 使用한 標準蛋白質은 Boehringer社製로 cytochrome-C(CYT-C, 分子量 12,400), chymotrypsinogen (CHY, 分子量 25,000), ovalbumin(OVA, 分子量 45,000) 및 bovine serum albumin(BSA, 分子量 67,000)이었으며 電氣泳動에 의해 分離된 各 polypeptide分子量은 gel濃度 7.5%와 10% 경우에 있어서 Weber-Osborn의 方法으로 算出해서 그 平均値를 取했다. 量的比率을 調査하기 위해서는 densitometer(島津 CS-900型)을 使用해서 610nm의 파장에서 densitogram을 얻어 各 band의 面積을 積分해 各 polypeptide의 band比率을 算出했다.

2. Amino酸 組成

精製한 軟化病 바이러스에서 SDS-Phenol法으로 核酸을 抽出한 후, 蛋白質 分劃을 遠心分離로 收去하여 ethanol: ethyl ether(1 : 1), ether順으로 3回 洗滌해서 desicator中에서 乾燥했다. 이 試料 3mg을 秤量해서 2ml의 6N鹽酸을 加해 105~110°C에 24時間 封管中에서 加水分解했다. 그것을 3,000rpm에 5分間 遠心分離해서 上淸液을 얻어 減壓下에서 乾燥하여 2ml의 0.01N 鹽酸에 溶解해서 JLC-5AH(JEOL) Amino酸 分析機에서 分析했다. 標準 amino酸으로서는 Ajinomoto 社製의 amino酸 混合物을 使用했다.

結 果

1. SDS-Polyacrylamide gel 電氣泳動

바이러스 蛋白質을 電氣泳動한 結果는 圖1과 같다. 즉 軟化病 바이러스의 蛋白質은 3개의 band(移動度가 작은 順으로 FPⅠ, FPⅡ 및 FPⅢ)로 分離했다. 이와

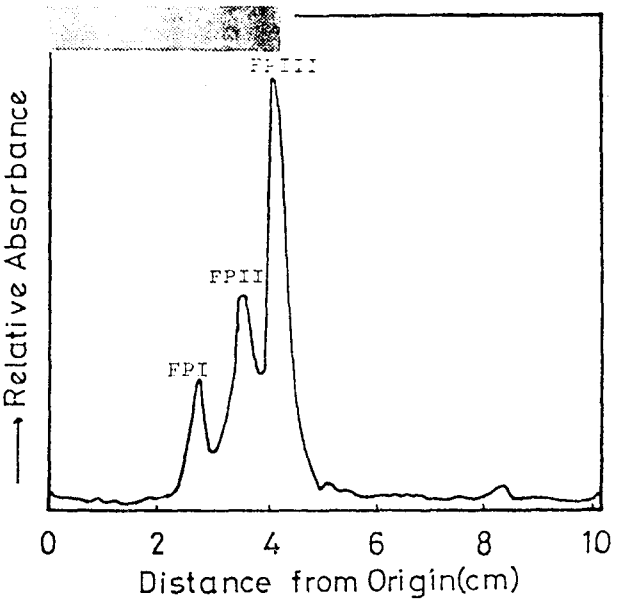

Fig. 1. Proteins of flacherie virus after electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels. Viruses are mixed in 1% SDS and 1% ß-mercaptoethanol containing 10% sucrose and desrupted in a water bath at 100°C for 2 min. Proteins of viruses are separated by electrophoresis as described in Materials and Methods. After electrophoresis the gels were stained with Amido Black 10B, destained 7% acetic acid and scanned with a 610nm filter in Shimadzu CS-900 type densitometer. Three protein components (FPI, FPII and FPIII) of flacherie virus were identified. Migration is from left to right.

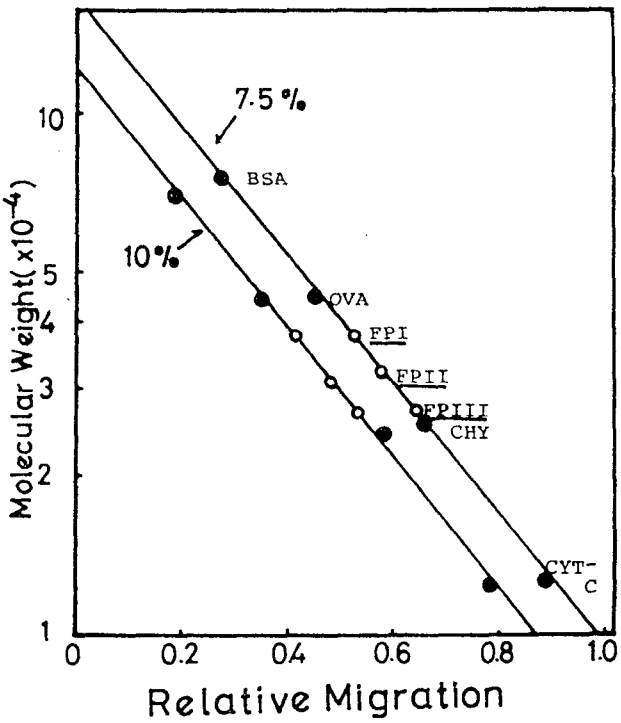

Fig. 2. Estimation of the molecular weights of the proteins of flacherie virus. After electrophoresis on 7.5% and 10% SDS-polyacrylamide gels, the relative mobilities of virus polypeptides were determined and the molecular weights were estimated by the method of Weber and Osborn (1969) from the plots of protein markers. Protein markers; Cytochrome C (12,400), Chymotrypsinogen (25,000), Ovalbumin(45,000), Bovine serum albumin(67.00)

같은 分離의 Pattern은 7.5%, 10%의 2가지 gel을 使用한 경우 同一했다. 또한 polypeptide量的 比率을 densitogram으로 算出한 結果 FP Ⅰ이 6.6%, FP Ⅱ가 25.0% 및 FP Ⅲ는 68.4%였다. 다음 이 3種類의 polypeptide分子量을 標準蛋白質과 比較한 結果 FP Ⅰ이 37,500, FP Ⅱ가 30,500 및 FP Ⅲ가 26,500으로 判明되었다(圖 2, 表 1).

Table 1. Structural polypeptides of flacherie virus

Virus	Component	Molecular weight[a]			%, Densitometric[b]
		7.5%	10%	Av.	
Flacherie	FPI	38,000	37,000	37,500	6.6
	FPII	30,000	31,000	30,500	25.0
	FPIII	27,000	26,000	26,500	68.4

a. Molecular weight determined by the method of Weber and Osborn (1969).
b. Gels stained with Amido Black 10B were scanned at 610nm, and the percentage of total protein in each peak was calculated.

2. Amino酸 組成

本 바이러스 蛋白質의 Amino酸 組成은 表2와 같다. 즉 17種의 amino酸이 檢出되었으며, 鹽基性 amino酸에 대한 酸性 amino酸의 比率은 1.5로 나타났다.

Table 2. Amino acid composition of flacherie virus protein[a]

Lysine	5.1
Histidine	2.8
Arginine	6.8
Aspartic acid	12.0
Threonine	5.6
Serine	6.6
Glutamic acid	9.8
Proline	3.0
Glycine	6.3
Alanine	5.0
Cystine	trace
Valine	5.8
Methionine	4.4
Isoleucine	6.9
Leucine	8.1
Tyrosine	3.9
Phenylalanine	7.9
Acidic/basic	1.5

a. Data expressed as g percentage of total recovered amino acids.

考 察

松井(1972)는 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動의 分析結果에서는 軟化病 바이러스의 蛋白質은 分子量 32,000의 polypeptide 1種類로 構成되었다고 示唆했다. 그러나 本 研研의 結果에서는 分子量 37,000(FP Ⅰ), 30,500(FP Ⅱ) 및 26,500(FP Ⅲ)에 相當하는 3種類의 band가 認定되었으며 그들의 量的比率은 各各 6.6%, 25.0% 및 68.4%였다. 本 研究와 松井의 경우 같은 方法으로 分析했으나 서로 다른 結果를 얻게 된 것은 現在 究明할 수 없으나 polypeptide의 溶解條件에 起因한 것이라고 추측된다. picorna group에 屬하는 바이러스의 蛋白質은 68,000의 分子量을 가진 polypeptide 1種類로 構成되어 있는 Calici바이러스를 除外하고는 分子量 30,000前後의 polypeptide 3種類와 分子量 10,000前後의 polypeptide 1種類, 合計 4種類의 polypeptide로 構成되어 있음이 明確하다고 했다(Brown and Hull, 1973). 本 研究에서는 10,000前後의 分子量을 가진 polypeptide는 認定할 수 없었으나, 分子量 30,000前後의 polypeptide 3種類로 構成된 것으로 볼 때 picorna group에 屬하는 것으로 推定된다. 또한 姜等의 家蠶 伊那株 바이러스와 比較 檢討해 볼 때에, 바이러스 核酸은 물론, 이번 軟化病 바이러스의 polypeptide로서 서로 異種의 바이러스임이 同時에 究明되었다.

amino酸 分析의 結果는 17種類의 amino酸이 分離되었으며, 그 結果는 Kawase等이 報告한 結果와 거의 一致되었다. 이와같은 結果는 他昆蟲 바이러스의그것과 類似한 것이었다(川瀨 1976).

摘 要

1. 軟化病 바이러스의 蛋白質을 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動으로 分析한 結果 分子量 37,500(FP Ⅰ), 30,500(FP Ⅱ) 및 26,500(FP Ⅲ)에 相當하는 3種類의 polypeptide가 얻어졌으며, 이들의 比率은 FP Ⅰ이 6.6%, FP Ⅱ가 25.0% 및 FP Ⅲ가 68.4%였다.

2. 軟化病 바이러스의 蛋白質을 amino酸 分析을 行한 結果, 17種의 amino酸이 分離되었으며, 이 amino酸 組成은 他昆蟲 바이러스의 amino酸 組成과 類似하였다.

參 考 文 獻

鮎澤啓夫・古田要二・倉田啓而・佐藤文子(1964) 蠶の傳染性軟化病ウイルスに關する研究, 日蠶試報 19, 223~239.

鮎澤千齋(1972) 蠶のウイルス性軟化病に關する研究 I. ウイルスの精製とその性狀, 日蠶雜 41, 338～344.

Brown, F., and Hull, R. (1973) Comparative virology of the small RNA viruses, J. gen. Virol., 20, 43～60.

Himeno, M., Onodera, K., and Tanami, Y. (1974) Properties of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*, J. Invertabr. Pathol. 23, 164～171.

姜錫權 (1977) 家蠶의 軟化病 바이러스에 關한 硏究 I. 軟化病 바이러스의 精製, 韓蠶誌 19(1), 25～32.

姜錫權・川瀨茂實(1978) 軟化病ウイルス(伊那株)の蛋白質の性狀について, 日蠶雜 47(1), 53～56.

姜錫權・中垣雅雄・清水孝夫・川瀨茂實(1978) 軟化病ウイルス(伊那株)の 純化とウイルス核酸の 性狀について, 日蠶雜 47(1), 39～46.

川瀨茂實(1976) ウイルスと昆蟲, 南江堂, 76～77, (東京)

Kawese, S., Suto, C., Ayuzawa, C. and Inoue, H. (1974) Chemical properties of infectious flacherie virus of the Silkworm, *Bombyx mori* L, (Lepidopterai Bombysidae), Appl. Ent. Zool. 9, 100～101.

松井正春(1972) 電氣泳動による軟化病ウイルス蛋白質の分析, 日蠶關東講集 23, 35.

Paillot A. (1929) La gattine et al flacherie vraie ou flacherie de pastuer, maladies infectieuse mixtes àultra-microbe et bacteries, Compt. Rend. Acad. Sci. 189, 308～310.

Weber, K., and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem. 244, 4406～4412.

山崎壽・酒井榮一・下平睦夫・山田たけを (1960) 傳染性のめる軟化病(F)に關する硏究, 長野蠶試報 61, 1～28.

山崎壽・山田たけを(1962) 傳染性のめる蠶の軟化病(F)に關する硏究(續報), 長野蠶試報 65, 1～73.