

누에 핵多角體病 바이러스의 多角體 蛋白質 遺傳子の 위치 탐색 및 염기서열

禹秀東 · 金賢郁 · 朴範錫* · 姜錫權 · 梁在明** · 鄭仁植***
서울大學校 農業生物 新素材研究센터, *農村振興廳 遺傳工學研究所,
西江大學校 生物學科, *慶熙大學校 遺傳工學科

Location and Nucleotide Sequence of the *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus Polyhedrin Gene

Soo Dong Woo, Hyun Uk Kim, Beom Seok Park*, Seok Kwon Kang,
Jai Myung Yang** and In Sik Chung***

Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

*Agriculture Biotechnology Institute, R.D.A., Suwon, Korea

**Department of Biology, Seo Kang University, Seoul, Korea

***Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon, Korea

Abstract

The location of the polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus(BmNPV) was determined by using a cloned polyhedrin gene from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus(AcNPV) as a hybridization probe. The 7.4 Kb PstI fragment DNA of BmNPV was cloned to plasmid pUC19 vector. A fragment containing this gene was mapped and sequenced in its entire polyhedrin reading frame. Nucleotide sequences comparison of the polyhedrin of the BmNPV to that of previously reported by Iatrou(1985) revealed that the sequence varied in 10 base. Comparison of the amino acid sequence of the two structured gene revealed that coding sequence varied 74 valine to isoleucine, 76 asparagine to serine and 155 methionine to valine.

Key words : *Bombyx mori*, nuclear polyhedrosis virus, polyhedrin gene, sequence

緒 論

핵다각체병 바이러스(Nuclear Polyhedrosis Virus : NPV)의 cryptogram은 D/2 : 80~100/8~15 : U or U0/E : I/O 로 double-stranded DNA genome을 함유하고 있으며, 11~25종의 구조 단백질로 구성된 nucleocapsid가 envelope에 둘러 싸여 20~50×200~400 nm 크기의 막대형 바이러스 입자를 형성하고 있다(Kelly 1985). 바이러스 입자는 분자량 약 28~33 kD인 결정성 단백질(polyhedrin)로 구성된 다각체에

매립되어 있는데, 다각체는 직경이 0.5~15 μm로 야외 환경에서 바이러스 입자의 활성을 보호 유지하며 다른 개체로의 전염원이 된다. 다각체 단백질은 감염말기 세포에서 다량 합성되며 바이러스 감염과 복제에는 불필요 하기 때문에 외래 유전자의 삽입이 용이하다. Baculovirus expression vector system(BEVS)은 이러한 NPV의 특징을 이용하여 유용물질을 생산하기 위한 것으로 현재 *Autographa californica* NPV(AcNPV)와 *Bombyx mori* NPV(BmNPV)를 이용한 두 가지의 vector가 개발되어 이용되고 있다(Maeda et

al. 1985). BEVS는 진핵세포계를 이용함으로써 생산된 물질의 활성이 크고, 생성된 이중단백질도 면역학적으로나 기능적으로 동일하여 현재 그 연구가 활발히 진행되고 있다(Hoofft van Iddenkinge *et al.* 1983).

따라서 본 연구는 농업 및 의약산업 등에 필요한 유용물질을 유전공학적인 기법에 의해서 생산할 수 있는 expression vector system을 국내에서 개발하기 위하여 BmNPV의 다각체 단백질 유전자를 탐색, 클로닝하고 sequencing을 통하여 그 구조를 연구하였다.

사 사

1991년도 한국과학재단 연구비 지원에 의해 연구된 것의 일부임

材料 및 方法

공시충 및 바이러스

누에핵다각체병 바이러스(BmNPV)는 국내에서 분리하여 본 실험실에서 보존중이던 것을 공시하였다. 바이러스 증식은 동방유량(주)의 인공사료로 사육한 누에를 이용하여 수행하였다.

다각체 단백질의 분리 및 전기영동

부분정제된 다각체를 0.01% SDS용액에 부유시키고 sonication하여 40~65%(W/W) sucrose density gradient를 작성, 24,000 rpm(Hitachi, SRP-28SA)에서 30분간 원심분리하여 순수한 다각체를 얻었다. 이렇게 얻어진 다각체를 Wood 방법(Wood 1980)을 변형하여 정제하고 100°C에서 20분간 가열한 후, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 다각체 침전물을 얻었다. 이 침전물을 알칼리용액(0.1 M Na₂CO₃, 0.17 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 10.9)에 부유시켜, 37°C에서 15분간 용해시킨 후, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 용해되지 않은 다각체를 제거하고, 다시 상청액을 55,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 virion을 제거한 후 다각체 단백질 용액을 얻었다. 단백질의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli 방법(Laemmli 1970)에 따라 이 다각체단백질 용액에 2배 농도의 sample buffer(0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)를 혼합하여, 100°C에서 10분간 가열한 뒤 10% 농도의 SDS-polyacrylamide gel에 의한 전기영동을 행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

바이러스 DNA 분리

정제된 다각체를 알칼리용액(0.1 M Na₂CO₃, 0.17 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 10.9)에 부유시켜 37°C에서 1시간 처리하고 침전물을 제거한 후, 1% SDS, proteinase K 0.5 mg/ml(Sigma)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 1시간 처리한 후 phenol/chloroform 방법으로 정제하고 냉에탄올로 DNA 침전을 얻어 TE buffer로 100 µg/ml의 농도로 만들어 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Southern blot 분석

다각체 단백질 유전자의 위치를 탐색하기 위한 southern blot 분석은(Southern 1975), 바이러스 DNA에 여러 가지 제한효소를 각각 처리한 뒤, 0.7% agarose gel에서 전기영동하고 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl 용액에서 denature시켜, 0.5 M Tris·HCl, 1.5 M NaCl(pH 7.4)용액에서 중화시킨 뒤, 20×SSPE transfer buffer를 통하여 DNA fragment를 nitrocellulose filter에 옮기고, vacuum dry oven에서 80°C, 2시간 건조시켰다. 건조된 nitrocellulose filter를 42°C에서 2시간 동안 prehybridization용액(3 ml 20×SSPE, 0.5 ml 10% SDS, 1 ml 50×Danhardt's 용액, 5 ml formamide, 0.01 ml carrier DNA, 0.9 ml DW)에서 반응시킨 뒤, nick translation에 의해 ³²P-dATP 동위 원소로 label된 AcNPV EcoRI-I fragment의 HindIII 0.93 Kb probe가 포함된 hybridization용액으로 42°C에서 15시간 반응시켰다. Hybridization이 끝난 nitrocellulose filter는 -70°C에서 X-ray film에 노출한 후 현상시켰다.

다각체 단백질 유전자의 클로닝 및 제한효소 지도 작성

Southern blot 분석에서 탐색된 다각체 단백질 유전자를 포함하고 있는 DNA fragment를 electroelution하여, CIP처리된 pUC19 plasmid에 T4 DNA ligase로 16°C에서 16시간동안 ligation시켜, *E. coli* JM 109와 DH5 α 균주에 CaCl₂ 처리방법(Mandel & Higa 1970)으로 transformation시켰다. Transformation 후 colony를 배양하고 plasmid를 추출하여 제한효소 처리로 클로닝을 확인하였다. 클로닝된 다각체 단백질 유전자를 포함하고 있는 DNA fragment에 여러 가지 제한효소를 처리하고, 전기영동하여 제한효소지도를 작성하였다.

염기서열 결정

DNA sequencing은 USB의 Sequenase® v.2.0

kit를 사용하였다. 재조합 플라스미드 DNA 16 μ 에 NaOH가 0.2N 되게하여 denaturing 시킨 후, 에탄올로 침전 시켰다. 이 DNA를 7 μ ddH₂O에 녹인 후, 여기에 5 \times reaction buffer 2 μ l, primer 1 μ l를 각각 첨가하고 65 $^{\circ}$ C에서 2분간 다시 denature한 후, 상온에서 30분간 DNA와 primer를 annealing 시켰다. 상기의 10 μ l template-primer에 0.1 M DTT 1 μ l, diluted labeling mixture 2 μ l, ³²P-dATP 0.5 μ l(10 μ Ci/ μ l), diluted sequenase 2 μ l를 넣어 상온에서 5분간 labeling 반응한 후, 각각의 2.5 μ l ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP termination mixture에 3.5 μ l씩 transfer 하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 termination반응 시켰다. 여기에 4 μ l stop buffer를 넣어 반응을 정지시킨 다음, 75 $^{\circ}$ C에서 2분간 boiling한 후, 2 μ l씩 6% buffer-gradient polyacrylamide gel에 loading하고 1,700V로 4시간 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 고정액(10% acetic acid, 10% methanol)에 15분간 넣어둔 후에 2시간동안 물에 세척하여 37 $^{\circ}$ C에서 완전하게 건조하여 autoradiography하였다.

結果 및 考察

다각체 단백질의 유전자 탐색

BmNPV의 다각체 단백질 유전자를 가진 DNA fragment를 탐색하기 위해 AcNPV EcoRI-I fragment내의 HindIII 0.93 Kb를 probe로하여 southern hybridization을 행한 결과 PstI-F fragment(약 7.4 Kb)에 hybridization됨으로써 다각체 단백질 유전자의 위치를 확인 할 수 있었다(그림 1).

다각체 단백질 유전자는 Summers *et al.*(1980)이 AcNPV에서 EcoRI-I fragment 7.6 Kb에 존재한다고 밝혔고, 그 후 Hooft van Iddekinge *et al.*(1983)이 염기서열을 결정하였으며, Maeda *et al.*(1985) 및 Iatrou *et al.*(1985)에 의해서 BmNPV 다각체 단백질 유전자의 염기서열도 분석되었다.

다각체 단백질 유전자의 클로닝 및 제한효소지도 작성

Southern hybridization에 의해 탐색된 다각체 단백질 유전자를 포함하고 있는 7.4 Kb DNA fragment를 pUC19 plasmid DNA에 ligation시켜서 *E. coli*에 클로닝하고, 다시 제한효소 처리를 하여 클로닝 여부를 확인하여 pBmP-F라 명명 하였다. pBmP-F에서 다각체 단백질을 coding하는 최소단위의 유전자를 포함하는 fragment를 탐색하기 위하여 다시 southern hybridization을 행함으로써 다각체 단백질 유전자가

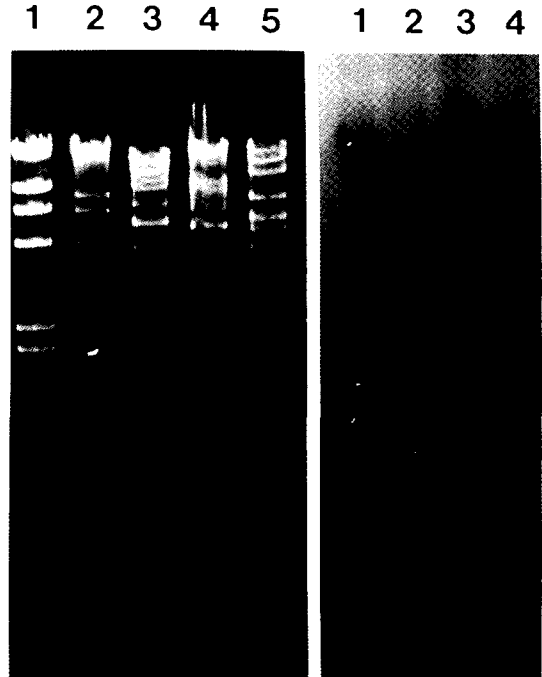


Fig. 1. Southern hybridization of BmNPV DNA restriction endonuclease digests. BmNPV DNA was digested with a variety of restriction enzymes, and hybridized to labeled HindIII 0.93 Kb fragment(containing polyhedrin gene) of AcNPV DNA.

The order of the digests was as follows: (left panel) 1, lambda DNA cleaved with HindIII; 2, BamHI; 3, EcoRI; 4, HindIII; 5, PstI; (right panel) 1, BamHI; 2, EcoRI; 3, HindIII; 4, PstI.

pBmP-F의 PstI과 HindIII 3.5Kb fragment에 존재하는 것으로 밝히고 subcloning하여 pBmP-H로 명명 하였다. 제한효소 지도는 pBmP-H에 여러 가지 제한효소를 처리하고 전기영동에 의해 작성하였다(그림 2).

다각체 단백질 유전자 분석

다각체 단백질 유전자가 존재한다고 생각되어진 pBmP-H를 enzyme site에 따라 deletion 시킨 후 염기서열을 분석한 결과 구조 유전자를 포함한 1,259 bp의 염기서열을 결정하였다. 이렇게 결정된 염기서열을 Iatrou 등(1985)이 보고한 기존의 BmNPV 다각체 단백질 유전자와 비교한 결과 10개의 염기서열에서 차이를 보였으며, 아미노산 분석 결과 74 valine이 isoleucine으로 76 asparagine이 serine으로 그리고 155 methionine이 valine으로 변경된 결과를

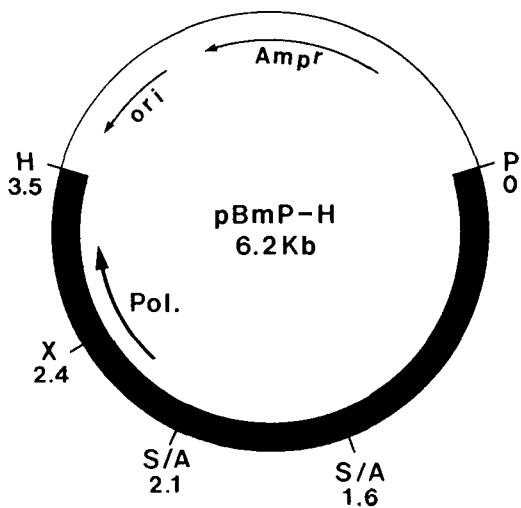


Fig. 2. Restriction endonuclease map of the pBmP-H. Abbreviations : H, HindIII; P, PstI; X, XbaI; S, Sall; A, Accl; Pol, polyhedrin gene.

보였다(그림 3, 4). 이러한 염기서열의 차이는 본 실험에 사용된 국내분리주 BmNPV가 Iatrou 등(1985)이 보고한 BmNPV와는 다른 variant로 인한 결과라 생각되어진다.

AcNPV의 다각체 단백질의 염기서열은 Hooft van Iddekinge *et al.*(1983)에 의해서 전체 염기서열 1,143 bp 중에서 다각체 단백질 coding영역은 ATG로 시작하여 TAA로 끝나는 총 732 bp로 구성되어 있고, 이 염기서열로부터 총 244 아미노산 서열이 결정됨으로써 분자량이 28,872 dalton임이 밝혀졌다. 또한 다각체 단백질의 번역 개시점(ATG의 A를 +1)으로부터 77 bp와 109 bp 상류(-77과 -109)에 "TATA" 및 "CAAT" box에 해당하는 "TAATTAAAAT"와 "TATCAATAT"가 존재하는 외에, -127과 -141에 "CACAAACT"의 반복배열도 관찰되었으며, 다각체 단백질 mRNA는 57b인 번역되지 않는 leader 부분을 가지고 있다는 것도 보고 되었다.

BmNPV 다각체 단백질 유전자에 대해서는 Maeda *et al.*(1985)과 Iatrou *et al.*(1985)에 의해 규명되었으며, AcNPV와 BmNPV 다각체 단백질 유전자간에는 염기배열상 86%의 상동성이 인정된다고 보고 하였다. 그의 *Spodoptera frugiperda* NPV(Gonzalez *et al.* 1989), *Orygia pseudotsugata* NPV(Leisy *et al.* 1986)등 많은 NPV 다각체 단백질 유전자에 관하여도 연구되어져서, 이들 다각체 단백질 유전자간에는 homology가 상당히 높은 것으로 나타났다.

BmNPV	AAATAATAACCATCTCGAAATAAATAAGTATTTACTGTTTGTACAGTTTGTGTAATAAAAAACCT	-76
BmNPV	
AcNPVG.....	
BmNPV	ATAAAT-	-6
BmNPV	
AcNPVA	
BmNPV	ATGCCGAATFATTCATACAACCCACCACCTCGGGCTACTACGTGTACGACAAATAATATTACAAAACCT	70
BmNPV	
AcNPVG.....CGT.....C..G..C.....T.	
BmNPV	TGGCGGCTCTCATCAAAAACGCCAAGCGCAAGAACCTAATCGAACATGAAAAGAGGAGGAGCAATG	140
BmNPV	
AcNPV	..A..T..CCG..T.....G.....T.....T..CGC.....G..TC..A...GCTACCT	
BmNPV	GGATCTTCTAGCAACTACATGGTTGCGGAAGTCCCTTTTAGGACCGGGCAAAAACAAAACCTACC	210
BmNPV	XbaI	
AcNPV	C..C..C.....C..A..G..T..G.....T..CG..G.....C.....G.....C..T	
BmNPV	CTTTTAAAGAAATTCGCGAGTGTGAACCCGATACCATGAAGTAACTGGTCAACTGGAGCGCAAGAGT	280
BmNPVG.....A	
AcNPV	..C..C..C..AA..C..T..G.....T.....C..G.....C..TG.....TGA..AA..A.....	
BmNPV	TTTTGCGTGAACCTTGGACCCGTTTGTGTGAGGACAGCTTCCCATGTAACGACCAAGAGGTGATGGA	350
BmNPV	..C.....	
AcNPV	..CTACA..G.....C..CA..G..A.....T.....A.....	
BmNPV	CGTTCCTCTGTCGCCAACCTCAAAACCCACGCGCCCAACAGGTGTCAAGTTCCTCGCTCAACCGCT	420
BmNPV	
AcNPV	T..T..T.....T..T..T.....A..GCGT.....TA..A.....C..T..T.....A.....G..C.....	
BmNPV	CTTAGTGGGACGAAGACTACGTGCCCCACGAATACAGAATTGTGAAGCTCTCACTGTCGGCATGA	490
BmNPVA	
AcNPV	..GC..T..C..CCC.....T..A..T..T..C..G..T..G..CG..C.....T..A..GG.....GC.....	
BmNPV	ACACCGAATACAGAATTAGTCTGCTTAAAGGGCGGCGCTGCCAATCATGAACATCCACAGCGAGTA	560
BmNPVG.....C..C..C.....G.....	
AcNPVG.....C..T..TCT.....	
BmNPV	CACCAACTCGTTCGAGTCGTTGTGAACCGCGCATATGGGAACTTCTACAAACCCATCGTTTACATC	630
BmNPV	
AcNPVACA...CA..CG..T..T.....C.....G.....	
BmNPV	GGCACAGACTCTGCCGAAGAGGAAATCCTAATGAGGTTCCTCTCGTTTCAAATAAAGGAGTTTG	700
BmNPV	
AcNPV	..T..C.....T.....G.....T..CC...A'...C..G..G.....G.....	
BmNPV	CACCAGACCGCCTCTGTTCCTACTGGTCGGCATAATA	738
BmNPVA.....	
AcNPVG.....	
BmNPV	AACACATATATGTTATAGTACATTTAATGCGTGTAGATTCGTACTGTTGATTAGACACAATT	808
BmNPV	
BmNPV	GTTGTACGTATTTTAATAACTATTAATTTATAATCTTTAGGGTGTATGTAGAGCGAAAATCAATG	878
BmNPV	
AcNPV	A TTTTCAGCGTCTTGTATCTGAATTTAAATATAAATCTCAATAGATTGTGAAAATAGTTTTCGATTG	948
BmNPV	
AcNPV	GTTTCAACAAAGGTTGTTTTTCACCAACCTGGCTGGACTATCTAATGGATTTCCTCAACACCACAC	1018
BmNPV	
AcNPV	GACTTTCCAAATCTGTAGCGCAACTAGCTTTGTGATATCTGCTGTGTTTGTGTTTGTAAATAAGA	1088
BmNPVT.....	
AcNPV	TTCCAGCTCGTTCAAAATATATGCGCTTTGTATTTTTCCTACTGCTGTTAGTGTACAAATGACTC	1158
BmNPVTC.....	
BmNPV	GACGTAACACGTTAAATAAAGCTT	1183
BmNPV	HindIII	
AcNPV	

Fig. 3. Nucleotide sequences of the polyhedrin gene and surrounding region. Dots indicate the same nucleotide sequence. Sequence of BmNPV in lower line is that of previously reported by Iatrou(1985).

다각체 단백질 유전자의 발현에 중요하다고 생각되는 5'-말단의 promoter 영역은 AcNPV와 BmNPV 간에는 상당한 차이가 있으나, promoter와 번역개시



Fig. 4. Comparison of two *BmNPV* polyhedrin sequences. The polyhedrin sequence predicted from the gene sequence(upper line) is compared to that previously reported by Iatrou(1985:lower line). Dots indicate the same amino acids.

의 methionine(ATG) 사이에 71염기는 완전히 보존되고 있으며, 이 conserved sequence는 다각체 단백질 유전자가 강력하게 발현하는데 있어서 중요한 역할을 한다고 추정하고 있다.

Baculovirus expression vector system을 국내에서 개발하기 위한 연구로서 본 실험은 *BmNPV*의 다각체 단백질 구조 유전자의 염기서열을 결정하였으며, 앞으로 transfer vector제작과 reporter gene(ex: β -galactosidase)의 곤충 배양세포에서 발현실험을 통하여 새로운 BEVS를 개발함으로써 농업 및 의약산업 등에 필요로 하는 유용한 단백질의 생산이 기대된다.

摘 要

유용물질을 생산할 수 있는 곤충 baculovirus expression vector system의 국내 개발을 위하여, *BmNPV*의 다각체 단백질 유전자를 탐색, 클로닝하고 그 구조를 분석한 결과는 다음과 같다.

1. *AcNPV*의 다각체 단백질 유전자를 포함하고 있는 *EcoRI*-I fragment내의 0.93 Kb를 probe로 하여 southern 분석한 결과, *BmNPV*의 다각체 단백질 유전자는 *Pst*I-F fragment(7.4 Kb)에 위치하였다.

2. *BmNPV*의 다각체 단백질 유전자를 포함하는 *Pst*I-F fragment를 *E. coli*에 클로닝시켜서 *pBmP-F*라 명명하고, 다시 southern 분석을 통해 subcloning하여 *pBmP-H*라 명명하였으며 *pBmP-H*의 제한효소 지도를 작성하였다.

3. *pBmP-H*의 염기서열분석결과 구조유전자를 포함한 1,259 bp의 염기서열이 결정되었다. Iatrou 등이 보고한 *BmNPV* 다각체 단백질 유전자의 염기서열과 비교한결과 10개의 염기서열에서 차이를 보였으며, 74 Val이 Ile로, 76 Asn이 Ser으로 155 Met이 Val로 아미노산 변경된결과를 보였다.

引 用 文 獻

Gonzalez, M. A., G. E. Smith and M. D. Summers (1989) Insertion of the SfMNPV polyhedrin gene into an AcMNPV polyhedron deletion mutant during viral infection. *Virology*. **170** : 160-175.

Hooft van Iddekinge, B. J. L., G. E. Smith and M. D. Summers (1983) Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **131** : 5561-5565.

Iatrou, K., K. Ito and H. Witkiewicz (1985) Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **54** : 436-445.

Kelly, D. C. (1985) The structure and physical characteristics of baculoviruses. In *Viral Insecticides for Biological Control*. Edited by K. E. Shermann & K. Maramorosch, Academic Press, pp.469-488.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*. **227** : 680-685.

Leisy, D., M. Nesson, M. Pearson, G. Rohrmann and G. Beaudreau (1986) Location and nucleotide sequence of the *Orygia pseudotsugata* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. *J. Gen. Virol.* **67** : 1073-1079.

Luckow, V. A. and M. D. Summers (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*. **6** : 47-55.

Maeda, S. (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.* **34** : 351-372.

Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto, and M. Furusawa (1985) Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* **315** : 592-594.

Mandel, M. and A. Higa (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53** : 159-162.

Smith, G. E., M. J. Fraser, and M. D. Summers (1983) Molecular engineering of the *Autographa californica*

- nuclear polyhedrosis virus genome : deletion mutations within the polyhedron gene. *J. Virol.* **46** : 584-593.
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** : 503-517.
- Summers, M. D., G. E. Smith, J. D. Knell and J. P. Burand** (1980) Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedrosis virus recombinants. *J. Virol.* **34** : 693-703.
- Vlak, J. M. and G. E. Rohrman** (1985) The nature of polyhedrin. In *Viral Insecticides for Biological Control*. Edited by K. E. Shermann & K. Maramorosch. Academic Press, pp.489-542.
- Wood, H. A.** (1980) Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus protein. *Virology.* **103** : 392-399.