

Nuclear polyhedrosis virus 의 polyhedrin 아미노산 및 polyhedrin gene 염기서열 분석

이 근 광

군산대학교 해양산업대학 수족병리학과

H. cunea nuclear polyhedrosis virus (HcNPV) 의 polyhedrin 아미노산 및 polyhedrin gene 의 염기서열을 분석하였다. Polyhedrin 은 SDS-PAGE 상에서 3 개의 polypeptide band 가 나타났고 주요 polypeptide 는 약 25 Kd 의 분자량을 갖고 있었다. 또한 polyhedrin 은 17 개의 다른 아미노산으로 구성되어 있었다. HcNPV DNA 를 *EcoRI* 효소로 절단하여 α ³²P 로 labelling 된 *Autographa californica* (AcNPV) polyhedrin gene cDNA 의 probe DNA 를 이용하여 hybridization 한 결과 polyhedrin gene 은 *EcoRI* 절편들중 H 절편에 양성반응을 나타냈다. 또한 polyhedrin gene 을 포함하고 있는 *EcoRI*-H 절편을 pUC8 벡터에 cloning 한 다음 이를 hPE-H 라고 이름하였다. HcNPV genome DNA 의 promoter 부위를 sequence 한 결과 TATA box 의 염기배열은 polyhedrin gene 전사 개시위치로부터 위쪽으로 -79 bp 의 5' flanking 부위에서 발견되었다. polyhedrin gene 내 CAAT box 는 TATA box 측면 염기 배열에서 나타나지 않았고, 4 개의 tandem repeat 5'-CTAATAT-3' 와 5'-TAAATAA-3'의 염기는 polyhedrin gene 내 전이 개시 위치로부터 위쪽으로 -141 과 -108 bp 또는 -83 bp 부위에 존재하였으며, 다른 하나는 전이 개시 위치로부터 아래쪽으로 -52 bp 부위에서 발견되었다. 그리고 polyhedrin gene 내 전이 개시 위치로부터 위쪽으로 -141 bp 부위는 다량의 AT (78%) 염기가 존재하였다. 또한 polyhedrin 의 개시 coding region 은 ATG 였고 종결 coding region은 TAA 였다.

Key Words : Nuclear polyhedrosis virus, Nucleotide sequence, Polyhedrin gene, Southern hybridization, Promoter

Baculovirus 중 nuclear polyhedrosis virus 는 무척추동물의 유충세포 및 수중의 무척추동물 (Chang *et al.*, 1992; Lightner and Redman, 1981) 에 특이적으로 감염하여 질병을 유도하며, 이들 바이러스는 핵속에서 다면체 (polyhedra inclusion body, PIB) 를 형성하는 특성을 갖고 있다 (Smumers and Arnott., 1969; Goodwin *et al.*, 1970). 이들 바이러스에 대한 연구는 활발

하여 최근에는 NPV 의 PIB 구성 단백질인 polyhedrin gene 의 강력한 프로모터 (promoter) 를 이용하여 진핵세포 발현 운반체 (expression vector) 를 개발하여 사람 α , β 인터페론 (Maeda *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1983), 대장균 β -galactosidase (Pennock *et al.*, 1984), 사람 c-myc 단백질 (Miyamoto *et al.*, 1985), hepatitis β -표면 항원 (Choe *et al.*, 1987), lepidopteran

세포에서 세균의 CryIVD 모기 살충 단백질을 발현 시키는 (Pang *et al.*, 1992) 등의 연구를 해 왔다.

본 연구에서는 앞에서 언급한 연구자들과 동일한 baculovirus 중 다른 종인 *H. cunea* NPV (HcNPV) 의 외래 유전자 발현 벡터의 개발을 위한 기초전략으로 HcNPV polyhedrin 의 아미노산 분석 및 DNA genome 상에서 polyhedrin gene 의 위치를 확인하고, polyhedrin gene 의 promoter 부위 일부 염기를 확인 하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 균주

NPV (Lee and Lee, 1988) 의 증식은 Lee and Kim (1994) 의 방법에 따랐으며, 형질전환을 위한 숙주세포로는 *E. coli* JM 83 과 *E. coli* XLI-blue 균주를 사용하였고, 운반체로는 pUC8 과 pBluscript SK (+) 을 사용하였다. Probe DNA 는 AcNPV 의 polyhedrin gene cDNA 단편이 삽입된 재조합 plasmid pMA-VI1 clone 을 사용하였다 (Adang and Miller, 1982). 재조합 plasmid 인 hPE-H clone 과 pMA-VI1 의 증식은 Adang and Miller (1982) 의 방법에 따랐다.

2. Polyhedrin SDS-PAGE 및 아미노산 분석

다량의 polyhedrin 을 얻고 아미노산 분석을 위한 시료제작은 Summers and smith (1978) 방법을 이용하였으며, polyhedrin 의 SDS-PAGE 는 Laemmli (1970) 방법에 의하였다. 아미노산 분석은 아미노산 분석기 (Varion LC Star) 로 분석하였다.

3. DNA 의 정제 및 플라스미드 DNA 추출

HcNPV DNA 추출은 Cochran 등 (1982) 의 방

법에 의하였으며, plasmid DNA 추출은 Maniatis 등 (1989) 의 방법을 사용하였다.

4. Nick translation 에 의한 probe 의 제조

Nick translation 은 제조원 Promega Co. 의 Nick translation protocol 에 따라 실시 하였다. 순수 분리한 cDNA 단편 9 μ l (약 1 μ g), nucleotide 혼합물 (300 μ M dATP, 300 μ M dGTP, 300 μ M dTTP) 10 μ l, 10 \times 반응 완충액 (50 mM Tris-HCl, 100 mM MgSO₄, pH 7.2) 5 μ l, 효소 혼합물 (DNase I, 0.2 ng/ μ l), DNA polymerase I (1 unit/ μ l) 5 μ l, 증류수 16 μ l, α -³²P dCTP 5 μ l (50 μ Ci) 를 혼합하여 총 반응액을 50 μ l 로 한 후, 16 $^{\circ}$ C 의 항온 수조에서 2 시간 반응시키고, 반응정지액 (0.25 M EDTA, pH 8.0) 5 μ l 를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C 에서 30 분간 효소를 불활성화시켰다. Labelling 된 DNA 만을 순수정제하기 위하여, TE 완충액 (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0,) 으로 부풀린 Sephadex G-50 을 column (0.5 \times 12 cm) 에 채워 반응액을 올린 후, TE 완충액 (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.6) 으로 유출하였다. 첫 튜브에는 500 μ l, 다음 10 개 튜브에는 100 μ l 씩 모은 뒤, 액체 섬광 계수기 (LKB 1217 Racketa, Finland) 로 방사능을 측정하여, 그 값이 10⁷ cpm (counter per minute) 이상 되는 용액만 -20 $^{\circ}$ C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. Southern hybridization 에 의한 DNA 단편상의 polyhedrin gene 의 위치 확인

HcNPV DNA 를 EcoRI 효소로 절단한 후, polyhedrin gene 위치를 확인하기 위하여 AcNPV polyhedrin gene 의 cDNA probe 를 이용하였으며, 위치 확인은 Southern 방법 (1975) 에 의하였다.

또한 확인된 절편은 Cochran 등 (1982) 의 방법에 따라 pUC8 벡터에 cloning 하였다.

결과 및 고찰

6. Polyhedrin gene promoter 부위 염기서열 결정

HcNPV DNA *EcoRI*-H (7.30 Kb) 단편을 *AcNPV* polyhedrin gene 의 cDNA probe 를 이용하여 Southern hybridization 하여 polyhedrin gene 의 위치를 확인하고, promoter 부위의 염기서열을 결정하기 위하여 pBluescript sk (+) 의 *EcoRI* site 에 *EcoRI*-H 단편을 클로닝 하여, 다시 promoter 부위를 함유하고 있는 clone 을 만들기 위해서 이를 제한효소 *BamHI* 과 *EcoRI* 으로 절단한 후, self-ligation 하여, *E. coli* XL1-Blue 에 형질전환 시킨 뒤, Ampicillin (50 µg/ml) 이 첨가된 nutrient agar (bacto peptone 5 g, beef extract 3 g, agar 15 g per liter, pH 7.0) 에 증식 시킨후, X-gal 이 함유된 배지에서 promoter 부위를 함유하고 있는 4.13 Kb 의 clone 을 찾아낸 후, 이를 다시 37 °C 에서 16 시간 배양한 다음, plasmid DNA 를 분리하여 이를 다시 *SalI* 으로 절단한 후, self-ligation 시켜 양말단이 *SalI* 과 *BamHI* 부위를 갖는 clone DNA 를 얻어 염기서열 결정에 사용하였다.

염기서열 결정에 사용한 primer 로는 P1 (3'-CTAATAAGTATGGCAGGG-5'), P2 (3'-CAACATGCTTGGCAATTG-5'), P3 (3'-CCACATATCMTGGCGACG-5') 와 pBluescript SK (+) T7 primer 를 사용하였다. 염기서열 결정은 sequenase kit (U. S. Biochemical) 를 이용하여 dideoxy nucleotide chain termination 방법 (Sanger *et al.*, 1977) 에 의하여 실시하였고, nucleotide 와 아미노산 분석은 DNAsis software 컴퓨터 프로그램 (LKB) 으로 분석하였다.

1. Polyhedrin 분석

HcNPV polyhedrin 을 SDS-PAGE 한 결과 3 개의 polypeptide band 중 polyhedrin 은 분자량이 약 25 kd 인 single polypeptide 로 구성되어 있었으며, 또한 polyhedrin 의 polymer 로 생각되는 단백질의 분자량은 약 72 와 66 kd 이었다 (Fig. 1).

Kozlov 등 (1975) 은 *Bombyx mori* 와 *Galleria mellonella* NPV 의 PIB 단백질은 242 개의 아미노산으로 구성되며, SDS-PAGE 로 분석한 결과 28 Kd 의 분자량을 갖는 것으로 보고하였다. 또한 Summers 와 Smith (1978) 는 SDS (1%) 가 들어있는 상태하에서 PAGE 하여 여러종류의 바이러스가 생산해낸 polyhedrin 의 분자량을 측정 한 결과 *Autographa californica* NPV 는 30 Kd, *Anticarsa gemmatilis* multiple-NPV (MNPV) 경우 29 Kd, *Heliothis armigera* MNPV 경우 28 Kd 인 single polypeptide 로 구성되었다고 보고하기도 하였다. 또한 여러학자들 Carstens 등 (1979), Summers and Smith (1978), Wood (1980) 는 *AcNPV* PIB 단백질의 분자량은 28~33 Kd 으로 보고하여 본 연구에서 나타난 HcNPV polyhedrin 의 분자량은 이들 보다 약간 작은 분자량을 갖는 것으로 나타났으나 single polypeptide 로 구성된것은 같았다.

또한, polyhedrin 의 아미노산은 약 17 종류 이상의 아미노산으로 구성되어 있으며 Argine (6.36%), Serine (2.69%), Aspartic acid (10.02%), Glutamic acid (10.02%), Threonine (3.55%), Glycine (12.47%), Alanine (2.93%), Proline (5.13%), Methionine (10.51%), Valine (4.88%), Phenylalanine (5.86%), Isoleucine (3.91%), Leucine (6.96%), Histidine (2.20%), Lysine (8.06%), Tyrosine

Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of polyhedrin isolated from Hc nuclear polyhedrosis virus. The molecular weight standards used in lane A are phosphorylase b (94Kb), ovalbumin (43Kb), carbonic anhydrase (30Kb).

(3.66%) 로 구성 되어 있었으며, 그중 Gly 이 12.47% 로 가장 높았고, 다음으로 Met, Asp, Glu 순으로 나타났다. 이외의 아미노산 Ala, Arg, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Tyr, Ser 의 함량은 거의 비슷하였고, Cys 은 0.73% 로 가장 적었다. 이와 같은 결과는 Cibulsky 등 (1977), Summers and Smith (1978) 은 baculovirus 의 polyhedrin 을 구성하고 있는 아미노산 조성은 aspartic acid 와 glutamic acid 가 가장 많은 것으로 보고하고 있어 이와 유사한 경향이었다. 또한 Kozlov 등 (1975) 이 분석한

BmNPV 와 GmNPV 의 polyhedrin 아미노산 조성과 비교해 볼때 이들을 구성하고있는 아미노산 함량순과도 거의 비슷하였으나 단지 Gly 함량이 HcNPV 가 2 배 정도 많이 존재하는 것으로 나타났다.

2. DNA 게놈 제한효소 단편 상에서 polyhedrin gene 위치 확인

Adang and Miller (1982) 에 의하여 제조된 AcNPV polyhedrin gene 의 cDNA 단편을 본 실험에서는 HcNPV polyhedrin gene 의 위치 확인을 위한 표지 DNA 로 이용하였다. 순수 분리한 740 bp 의 AcNPV polyhedrin gene cDNA 단편을, nick translation 방법을 이용해 α -³²P dCTP 로 labeling 한 후, HcNPV DNA의 EcoRI 제한효소 단편들과 hybridization 한 결과는 Fig. 2 와 같다. DNA 를 EcoRI 으로 절단하여 hybridization 시킨 경우, 약 7.24 kb 의 H 단편에서 양성 반응이 나타나 이 단편에 polyhedrin gene 의 일부가 함유되었음을 추정할 수 있었다.

Polyhedrin gene 에 대한 연구는 활발하여 Vlak 등 (1981) 은 AcNPV 의 mRNA 를 *in vitro* 전이시켜 hybridization 방법으로 33 Kd 의 polyhedrin 을 암호하는 유전자가 AcNPV DNA 를 제한효소 EcoRI 으로 절단하여 생기는 단편 중 I-단편에 존재하는것을 밝혀 AcNPV 와는 다른 것으로 나타났다.

또한 Adang and Miller (1982) 는 AcNPV mRNA 를 이용하여 virion 단백질을 암호하는 유전자의 위치를 결정하였고, Smith 등 (1983) 은 polyhedrin gene 의 위치를 조사하여, DNA 조작에 의한 AcNPV polyhedrin gene 을 결실시켜 PIB 를 형성하지 못하는 돌연변이체를 분리해 냈으며, Summers 등 (1980) 은 AcMNPV SI 과 RoMNPV 의 polyhedrin, 바이러스 구조 단백질 및 제한효소 단편들의 분석결과, AcMNPV 의 경

갖는 H 단편에 polyhedrin gene 이 함유 되어 있음을 확인 한 후, 이 단편만을 pUC8 운반체에 연결하여 *E. coli* JM 83 숙주에 형질전환 시켜 clone 체를 얻은 후, plasmid 를 분리하여 확인한 결과 polyhedrin gene 을 함유하고 있는 H 단편이 cloning 되었음을 확인 하였다 (Fig. 3).

Fig. 2. Southern hybridization of α -³²P labeled AcNPV polyhedrin gene cDNA to fragments of Hc NPV DNA. Lane A is *Eco*RI digest of HcNPV genomic DNA. Lane B represent the hybridized DNA fragment to the probe DNA.

우에는 polyhedrin gene *Eco*RI - I 단편에 존재하고 RoMNPV 의 경우에는 *Eco*RI - G 또는 Q 단편에 위치하고 있다고 추정하였다.

이러한 NPVs 의 polyhedrin gene 의 크기는 대략 1.1~1.2 Kb 이며 (Hooft van Iddekinge 등 1983), 염기배열과 아미노산 서열은 80% 이상이 동질성을 가지고 있다고 보고하기도 하였다 (Iatrou 등, 1985; Leisy 등, 1986; Rohrmann, 1986).

3. Polyhedrin gene 의 promoter 부위 gene 염기 서열 분석

HcNPV DNA *Eco*RI 단편중 분자량 7.24 kb 를

Fig. 3. Cloning of *Eco*RI-H fragment derived from HcNPV genomic DNA into pUC8 vector and Southern hybridization of α -³²P labeled AcNPV polyhedrin gene cDNA to recombinant plasmid DNA, hPE-H DNA. Lane A represent the hybridized to hPE-H fragment, Lane B is *Eco*RI digest of hPE DNA, Lane C is *Hind*III digest of lamda DNA.

또한 polyhedrin gene promoter 부위의 일부 염기 배열을 확인 한 결과 TATA box 의 염기배열은 polyhedrin gene 전사 개시 위치로부터 위쪽으로 21bp (-79) 의 5' flanking 부위에서 발견 되었다.

Polyhedrin gene 내 CAAT box 는 TATA box 측면 염기배열에서 나타나지 않았고, 4 개의 tandem repeat 5'-CTAATAT-3' 와 5'-TAAATAA-3'의 염기는 polyhedrin gene 내 전이 개시 위치로부터 위쪽으로 83 과 50 bp (-141 와 -108)

-140
ACTAATATTACGACACTGAAAATCTATCATTTCGCTAATATA

-100
TAGTTGCTGATATTATGTAATAATTAATAATGATAACCATCTCGAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTGTAACAGTTTTGTAAT
-14 -1
AAAAAACCTATAAATATG OCG GAT TAT TCA TAC CGT CCC ACC ATC GGG CGT ACC TAC GTG TAC GAC AAC
Met Pro Asp Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Ile Gly Arg Thr Tyr Val Tyr Asp Asn
56
AAG TAC TAC AAA AAT TTA GGT GCC GTT ATC AAG AAC GCT AAG CGC AAG AAG CAC TTC GCC GAA CAT
Lys Tyr Tyr Lys Asn Leu Gly Ala Val Ile Lys Asn Ala Lys Arg Lys Lys His Phe Ala Glu His
123
GAG ATC GAA GAG GCT ACC CTC GAC CCC CTA GAC AAC TAC CTA GTG GCT GAG GAT CCT TTC CTG GGA
Glu Ile Glu Glu Ala Thr Leu Asp Pro Leu Asp Asn Tyr Leu Val Ala Glu Asp Pro The Leu Gly
189
CCC GGC AAG AAC CAA AAA CTC ACT CTC TTC AAG GAA ATC CGT AAT GTT AAA CCC GAC ACG ATG AAG
Pro Gly Lys Asn Gln Lys Leu Thr Leu Phe Lys Glu Ile Arg Asn Val Lys Pro Asp Thr Met Lys
255
CTT GTC GTT GGA TGG AAA GGA AAA GAG TTC TAC AGG GAA ACT TGG ACC CGC TTC ATG GAA GAC AGC
Leu Val Val Gly Trp Lys Gly Lys Glu Phe Tyr Arg Glu Thr Trp Thr Arg Phe Met Glu Asp Ser
321
TTC CCC ATT GTT AAC GAC CAA GAA GTG ATG GAT GTT TTC CTT GTT GTC AAC ATC GGT CCC ACT AGA
Phe Pro Ile Val Asn Asp Gln Glu Val Met Asp Val Phe Leu Val Val Asn Ile Gly Pro Thr Arg
387
CCC AAC CGT TGT TAC AAA TTC CTG GCC CAA CAC GCT CTG CGT TGC GAC CCC GAC TAT GTA CCT CAT
Pro Asn Arg Cys Tyr Lys Phe Leu Ala Gln His Ala Leu Arg Cys Asp Pro Asp Tyr Val Pro His
453
GAC GTG ATT AGG ATC GTC GAG CCT TCA TGG GTG GGC AGC AAC AAC GAG TAC CGC ATC AGC CTG GCT
Asp Val Ile Arg Ile Val Glu Pro Ser Trp Val Gly Ser Asn Asn Glu Tyr Arg Ile Ser Leu Ala
519
AAG AAG GGC GGC GGC TGC OCA ATA ATG AAC CTT CAC TCT GAG TAC ACC AAC TCG TTC GAA CAG TTC
Lys Lys Gly Gly Gly Cys Pro Ile Met Asn Leu His Ser Glu Tyr Thr Asn Ser Phe Glu Gln Phe
585
ATC GAT CGT GTC ATC TGG GAG GAA TTC TAC AAG CCC ATC GTT TAC ATC GGT ACC GAC TCT GCT GAA
Ile Asp Arg Val Ile Tyr Glu Glu Phe Tyr Lys Pro Ile Val Tyr Ile Gly Phe Asp Ser Ala Glu
651
GAG GAG GAA ATT CTC CTT GAA GTT TCC CTG GTG TTC AAA GTA AAG GAG TTT GCA OCA GAC GCA CCT
Glu Glu Glu Ile Leu Leu Glu Val Ser Leu Val Phe Lys Val Lys Glu Phe Ala Pro Asp Ala Pro
717
CTG TTC ACT GGT CCG GCG TAT TAAAACACGATACATTGTTATTAGTACATTTATTAAGCGCTAGATTCTGTGCGTTGTTG
Leu Phe Phe Gly Pro Ala Tyr
797
ATTTACAGACAATTGTTGTACGTATTTTAATAATTCATTAATTTATAATCTTTAGGGTGGTATGTTAGAGCGAAAATCAAATGATT
884
TTCAGCGTCTTTATATCTGAATTTAAATATTAATCTCAATAGATTTGTAAAATAGGTTTCGATTAGTTTCAAACAAGGGTTGTTT
971
TTCCGAACCGA

Fig. 4. Nucleotide sequence of HcNPV polyherdin genomic DNA flanking 5' and 3' non-coding regions. The positive strand is shown. The first nucleotide of the translational start signal ATG is given as number + 1.

또는 25 bp (-83) 부위에 존재하였으며, 다른 하나는 전이 개시 위치로부터 아래쪽으로 4 bp (-52) 부위에서 발견되었다. 그리고 polyhedrin gene 내 전이 개시 위치로부터 위쪽으로 83 bp 부위는 다량의 AT (78%) 염기가 존재하였다 (Fig. 4). 또한 nucleotide sequence 는 738 bp 의 open reading frame 을 포함하고 있었으며, polyhedrin 의 개시 coding region 은 ATG 였고 종결 coding region 은 TAA 였다.

Baculovirus 의 polyhedrin gene 에 대한 연구는 이전에 많은 연구자들에 의해 연구되었다. 예를 들면, Iatrou 등 (1985) 은 *B. mori* 의 polyhedrin gene 과 그 주변 유전자의 염기서열을 결정하여 AcNPV 와 비교하였으며, Gombart 등 (1989) 은 OpMNPV 의 PIB 외투막 단백질 유전자의 염기와 아미노산 서열을 밝혔고, Possee 등 (1991) 은 AcNPV EcoRI - I 와 R 절편 부위 (polyhedrin gene) 9.4 Kb 의 염기서열을 밝힌바 있다.

이러한 결과들과 비교 해볼때 본 연구에서 나타난 HcNPV EcoRI - H 단편의 polyhedrin gene 의 promoter 부위의 염기 서열은, Hooft van Iddekinge 등 (1983) 이 보고한 AcNPV polyhedrin gene 염기 서열과 Possee and Howard (1987) 가 밝힌 AcNPV 의 polyhedrin gene promoter 분석 결과와 거의 유사하였지만, HcNPV polyhedrin gene 내 CAAT box 는 AcNPV 와는 달리 TATA box 의 측면 염기서열에 존재하지 않아 차이점을 나타냈다. 또한 본 연구에서 나타난 polyhedrin 아미노산 nucleotide sequence 는 AcNPV polyhedrin 의 nucleotide sequence 와 비교해 볼때 99% 의 상동성을 나타내었다 (Hooft Van Iddekinge *et al.*, 1983).

참 고 문 헌

Adang, M. J. and Miller, L. K. : Molecular

cloning of DNA complementary to mRNA of the Baculovirus *A. californica* nuclear polyhedrosis virus : Location and gene products of RNA transcripts found late in infection. *J. Virol.*, 44 : 782-793, 1982.

Chang, P. S., Wang, Y. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chen, S. N. : Purification and biochemical characteristics of occlusion body of *P. monodon*-type baculoviruses. *J. Fish. Pathol.*, 27(3) : 127-130, 1992.

Carstens, E. B., Tjia, S. T. and Doerfler, W. : Infection of *S. frugiperda* cells with AcNPV. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology*, 99 : 386-389, 1979.

Choe, Y. K., Bishop, D. H. L., Seo, J. S., Matsuura, Y. and Choe, M. H. : Secretion of particles of hepatitis β -surface antigen from insect cells using a baculovirus vector. *J. Gen. Virol.*, 68 : 2607-2613, 1987.

Cibulsky, R. L., Harper, I. D. and Gudauskas, R. T. : Biochemical comparison of polyhedral protein from five nuclear polyhedrosis viruses infecting *plusiine* larvae (Lepidoptera : Noctuidae). *J. Invert. Pathol.*, 29 : 182-191, 1977.

Cochran, M. A., Carstens, E. B., Eaton B. T. and Faulkner, P. : Molecular cloning and physical mapping of restriction endonuclease fragments of *A. californica* nuclear polyhedrosis virus DNA. *J. Virol.*, 41 : 940-946, 1982.

Gombart, A. F., Pearson, M. N., Rohrmann, G. F. and Beaudreau, G. S. : A baculovirus polyhedral envelope associated protein : Genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology*,

- 169 : 182 - 193, 1989.
- Goodwin, R. H., Vaughn, J. L., Adams, J. R. and Loulides, S. J. : Replication of nuclear polyhedrosis virus in an established insect cell line. *J. Invert. Pathol.*, 16 : 284-288, 1970.
- Hooft Van Iddekinge, B. J. L., Smith, G. E. and Summers, M. D. : Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *A. californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 131 : 561-565, 1983.
- Iatrou, K., Iato, K. and Witkiewicz, H. : Polyhedrin gene of *B. mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virology*, 54 : 436-445, 1985.
- Kozlov, E. A., Levitina, T. L., Sidorova, N. M., Radavski, Y. L. and Serebryani, S. B. : Comparative chemical studies of the polyhedral proteins of the nuclear polyhedrosis viruses of *B. mori* and *G. mellonella*. *J. Invert. Pathol.*, 25 : 103-107, 1975.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227 : 680-685, 1970.
- Lee, K.K. and Kim, Y. G. : Infection symptom and electron microscopic visualization of NPV. *J. Fish. Pathol.*, 7(1) : 1-5, 1994.
- Lee, H. H. and Lee, K. K. : Isolation, complementation and partial characterization of temperature - sensitive mutants of the baculovirus *H. cunea* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virology*, 69 : 1299-1306, 1988.
- Leisy, D. J., Rohrmann, G. F. and Beandreau, G. S. : The nucleotide sequence of the polyhedrin gene region from the multicapsid baculovirus of *Ogryia pseudotsugata*. *Virology*, 153 : 280-288, 1986.
- Lightner, D. V. and Redman, R. M. : A baculovirus caused disease of the penaeid shrimp, *P. monodon*. *J. Invert. Pathol.*, 38 : 299-302, 1981.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato Y. and Furusawa, M. : Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*. London, 315 : 592-594, 1985.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York : pp. 25-52, 1989.
- Miyamoto, C., Smith, G. E., Farrell-Towt, J., Chizzonite, R., Summers M. D. and Ju, G. : Production of human c-myc protein in insect cells infected with a Baculovirus expression vector. *Molec and Cell Biol.*, 5 : 2860-2865, 1985.
- Pang, Y., Fruros, R. and Federici, B. A. : Synthesis and toxicity of full-length and truncated bacterial CryIVD mosequitocidal protein expressed in lepidopteran cells using a baculovirus vector. *J. Gen. Virology*, 73 : 89-101, 1992.
- Pennock, G. D., Shoemaker, C. and Miller, L. K. : Strong and regulated expression of *E. coli* β -galactosidase in insect cells with a Baculovirus vector. *Molec and Cell Biol.*, 4(3) : 399-406, 1984.
- Possee, R. D., and Howard, S. C. : Analysis of the polyhedrin gene promoter of AcNPV. *Nucle. Acid Res.*, 15 : 10233-10248, 1987.
- Possee, R. D., Sun, T. P., Howard, S. C., Ayres, M. D., Perkins, M. H. and Gearing,

- K. L. : Nucleotide sequence of the AcNPV 9.4 kbp *EcoRI*-I (polyhedrin gene) region. *Virology*, 185 : 229-241, 1991.
- Rohrmann, G. F. : Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.*, 67 : 1499-1513, 1986.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the national academy of sciences, U. S. A.*, 74 : 5463-5467, 1977.
- Smith, G. E., Fraser M. J. and Summers, M. D. : Molecular engineering of the *A. californica* nuclear polyhedrosis virus genome : Deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.*, 46 : 584-593, 1983.
- Smith, G. E., Summers, M. D. and Fraser, M. J. : Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molec and Cell Biol.*, 3 : 2156-2165, 1983.
- Southern, E. M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98 : 503-517, 1975.
- Summers, M. D. and Arnott, H. J. : Ultrastructural studies on inclusion formation and virus occlusion in nuclear polyhedrosis and granulosis virus infected cells of *T. ni*. *Ultrastruct. Res.*, 28 : 462-480, 1969.
- Summers, M. D. and Egawa, K. : Physical and chemical properties of *T. ni* granulosis virus granulin. *J. Virol.*, 12 : 1092-1103, 1973.
- Summers, M. D. and Smith, G. E. : Baculovirus structural polypeptides. *Virology*, 84 : 390-402, 1978.
- Summers, M. D., Smith, G. E., Knell, J. D. and Burand, J. P. : Physical map of *A. californica* and *R. ou* NPV recombinants. *J. Virol.*, 34 : 693, 1980.
- Vlak, J. M., Smith, G. E. and Summers, M. D. : Hybridization selection and *in vitro* translation of *A. californica* nuclear polyhedrosis virus mRNA. *J. Virol.*, 40 : 762-771, 1981.
- Wood, H. A. : Protease degradation of *A. Californica* NPV protein. *Virology*, 103 : 392-399, 1980.

The amino acid analysis of polyhedrin and DNA sequence of polyhedrin gene in nuclear polyhedrosis virus

Keun - Kwang Lee

*Department of Fish Pathology, College of Ocean Science & Technology
Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea*

The amino acid analysis of polyhedrin protein and nucleotide sequence of polyhedrin gene in *H. cunea* nuclear polyhedrosis virus (HcNPV) genome have been studied. Polyhedrin had three polypeptide bands in SDS - polyacrylamide gel electrophoresis. The major polypeptide had a molecular weight of 25 kd. The polyhedrin was composed of 17 different amino acids. HcNPV DNA was digested with *EcoRI* restriction enzyme and hybridized with (α ³²P)-labelled AcNPV polyhedrin gene cDNA. The polyhedrin gene was located on the fragment of *EcoRI*-H. The *EcoRI* - H fragment containing polyhedrin gene was cloned into the *EcoRI* site of pUC8 vector which was confirmed with southern blotting, and the recombinant plasmid containing polyhedrin gene was designated as hPE-H. The promoter region of polyhedrin genomic DNA was sequenced. The sequences identified as the TATA box was found at the 5' flanking region of the polyhedrin genomic DNA approximately -79 bp upstream from the transcriptional start site. But CAAT-like box was not shown near the TATA-like box in the polyhedrin gene. Four tandem repeats with the sequence 5'-CTAATAT-3' and 5'-TAAATAA-3' were found between -141 and -108 or -83 upstream and -52 bp downstream from the translation start site. About -141 bp region upstream from the translational start site was highly AT (78%) rich. The coding region for the polyhedrin starts and ends with ATG and TAA, respectively.

Key Words : Nuclear polyhedrosis virus, Nucleotide sequence, Polyhedrin gene, Southern hybridization, Promoter