

모기 살충성 내독소를 생산하는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *guiyangiensis* 21-2균주(H serotype 43)의 특성

김위종 · 김광현*

동의대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of a Mosquitocidal Delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *guiyangiensis* strain 21-2(H serotype 43). Kim, Wi-Jong and Kwang-Hyeon Kim*. Department of Microbiology, College of Natural Science, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea – To prevent appearance of resistant mosquitoes against δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in field, a mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain 21-2 (Bt 21-2) producing a new type of δ -endotoxin was isolated. The strain Bt 21-2 belongs to H serotype 43, *B. thuringiensis* subsp. *guiyangiensis* (Btg). The δ -endotoxins from the strain Bt 21-2 and the strain Bti were a cuboid shape morphologically, but the δ -endotoxin from the type strain Btg was a bipyramidal shape on phase contrast microscope. The δ -endotoxin of the strain Bt 21-2 was composed of 150, 90 and 70 KDa proteins on SDS-PAGE, and the antigenicity of δ -endotoxin of the strain Bt 21-2 was different from that of the strain Bti on immunoblot. The δ -endotoxin gene of the strain Bt 21-2 was not amplified with specific primers of δ -endotoxin gene (cry4A and cry4B) of the strain Bti on PCR.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, mosquitocidal delta-endotoxin

지난 45년 동안 모기 방제를 위하여 dichloro-diphenyl-trichloroethane(DDT), gammaxane, melathion, chlordane 및 pyrimethamine-sulfadoxine 혼합물과 같은 화학 살충제가 사용되었고, 이들의 사용으로 모기가 매개하는 질병율과 치사율을 낮추는데 성공하였다. 그러나, 최근에는 화학살충제에 대한 내성모기의 출현으로 말라리아 등 모기유래의 질병들이 열대지방에서 다시 발생하고[15] 있으며, 뿐만 아니라 익충(益蟲)을 포함한 모든 생물체들에게도 비선택적인 손상을 주어 강력한 화학살충제에 의한 피해를 인식하게 되었다. 이같은 이유로 *B. thuringiensis*균에 의한 생물학적 방제가 유망한 방법으로 특히 모기에 살충성 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*를 중심으로 연구가 행해졌으며[6, 10, 17, 21], 최근에는 모기방제를 위해 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*가 상품화 되어 널리 사용되고 있다[1]. 그러나, *B. thuringiensis* 역시 장기간의 살포는 내성숙주를 유발시킬 가능성이 있다[8]. 즉, 모기인 *Culex quinquefasciatus*에 대하여 실험실 내에서 내성시험을 행한 결과 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 결정성독소에 존재하는 cryIVD(현 cryIIA)에 대한 저항성이 72배가 증가되었다[9]. 현재까지는 모기가 야외에서 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*에 대해 저항성을 나타낸다는 보고는 없으나, 모기방제를 위해 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*를 장기간 동안 대량살포를 한다면 야외에서도 *B. thuringien-*

sis subsp. *israelensis*에 대한 저항성 모기가 발생할 가능성을 배제할 수 없다. 예를들면, Brazil에서는 모기방제를 위해 *B. sphaericus*를 오랫동안 다량 사용함으로써 field에서 *B. sphaericus*에 대한 저항성 모기가 발생되었다[8].

따라서 본인은 장차 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*에 대한 저항성 모기의 출현을 해결하는 한 방법으로 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*가 생산하는 내독소와는 기원이 다른 독성단백질을 생산하는 새로운 균주를 국내의 환경에서 직접 분리하여 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소와 비교 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

부산 근교 야산의 나뭇잎을 *Bacillus thuringiensis*(BT)균주 분리용 시료로 사용하고, PYG 한천배지[11]에 도말하여 28°C에서 3일간 배양하였다. 그후 형성된 colony는 위상차 현미경으로 관찰하여 결정성 내독소를 함유한 균주들 중에서 모기유충에 살충력이 비교적 강한 균주를 선별하였다. 본 실험에 사용된 표준균주는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*(Bti)와 *Bacillus thuringiensis* subsp. *guiyangiensis*(Btg)였으며, 일본 Kyushu대학의 Ohbata로부터 분양 받았다.

*Bacillus thuringiensis*의 분류 및 동정

선별된 균주의 생화학적 특성은 Bergey's manual[12],

*Corresponding author

Tel. 82-51-890-1533, Fax. 82-51-891-7740
E-mail:kimkh@hyomin.dongueui.ac.kr

Smibert와 Krieg[19], 및 De Barjac와 Franchon의 방법[7]에 의거하여 검토하였다. 또한 BT균주의 편모항원성에 의한 분류는 Padua 등의 방법[16]에 따라 각 BT균주의 H항원에 대한 항혈청과 slide glass상에서 균체를 혼합하여 편모항원에 의한 응집반응을 조사하였다.

내독소 분리, 용해 및 항체조제

BT균주의 내독소는 Cheung와 Hammock의 방법[3]에 따라 설탕밀도균배법으로 분리하고, 그 순도는 위상차현미경으로 검사하였다. 분리된 내독소는 0.1N NaOH용액에 용해하고 Cheung과 Kim이 기술한 방법[4]으로 Freund's adjuvant와 혼합하여 토끼에 주사하여 내독소에 대한 항체를 조제하였으며, 조제된 항체는 Protein A sepharose 4B(Sigma P9424)로 안내서에 따라서 정제하고 -20°C에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

생물학적 활성측정

내독소의 생물학적 활성을 위해 용혈성 시험은 사람의 적혈구(O형)를 사용하여 Yu 등의 방법[22]으로 측정하였으며, 모기살충성 시험은 본 연구실에서 사육하는 모기인 *Aedes aegypti*를 사용하여 Chilcott와 Ellar 등의 방법[5]으로 행하였다. 모기유충에 대한 내독소의 LC₅₀는 Reed와 Muench[18]에 의거하여 산출하였으며, 이를 위해 Lowry방법[14]에 따라 내독소 단백질을 정량하였다.

SDS-PAGE 및 Immuno-blot

BT균주의 내독소는 Wasano 등이 기술한 방법[20]에 따라 탄산완충액(50 mM Na₂CO₃, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, pH 10.0)에 내독소를 37°C에서 2시간 동안 용해시키고 Laemmli방법[13]에 따라 SDS-PAGE를 행하였다. 또한 SDS-PAGE를 행한 내독소 단백질을 PVDF에 transfer시키고 horseradish peroxidase와 결합된 antirabbit-antibody가 함유된 immuno-blotting kit(Bio-rad product)를 가지고 Bio-Rad의 안내서에 따라 Immuno-blot을 행하였다.

PCR에 의한 내독소 유전자 증폭

PCR에서 유전자증폭은 Carozzi 등의 방법[2]에 따라서 행하였으며, 이때 선별된 BT21-2균주의 DNA와 Bti균주의 내독소 유전자(cry4A, cry4B)에 특이적인 primer[2]인 Dip1A와 Dip1B 및 Dip2A와 Dip2B를 사용하였다.

결과 및 고찰

선별균주의 형태 및 생화학적인 특성

부산근교 야산의 나뭇잎에서 Bt21-2균주를 분리선별하고, 위상차 현미경으로 Bt21-2균주의 형태, 포자 및 내독소를 확인하였다. 분리된 Bt21-2균주는 Gram양성이며, 포자

Table 1. Properties and biochemical characterization of the strain Bt21-2

| | Bt21-2 | Btg | Bti |
|---------------------------|----------|-------------|----------|
| Morphology | Rod | Rod | Rod |
| Gram stain | + | + | + |
| Spore production | + | + | + |
| Motility | + | + | + |
| Parasporal inclusion body | Cuboidal | Bipyramidal | Cuboidal |
| Catalase production | + | + | + |
| Lecithinase production | + | + | + |
| H serotype | 43 | 43 | 14 |

Symbol: +: Positive, S; Spore, C; δ -endotoxin, Bti; *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Btg; *B. thuringiensis* subsp. *guiyangensis*, Bt21-2; isolate.

를 형성하고, 운동성이 활발하며, lecithinase 및 catalase활성을 나타내었다(Table 1). 표준균주인 Btg균주의 내독소는 전형적인 bipyramid형이었으나, Bti균주 및 Bt21-2균주는 cuboid형이었다(Table 1). 따라서 Bt21-2균주는 내독소를 생성하는 전형적인 *Bacillus thuringiensis*에 속하며, H serotype 43으로서 표준균주인 *Bacillus thuringiensis* subsp. *guiyangensis*의 편모항원성과 잘 일치하였다.

생물학적 독성실험

Bt21-2균주의 내독소에 대한 모기 살충성 및 용혈성 시험을 행하였다. 이 중에서 모기인 *Aedes aegypti*에 대한 LC₅₀는 2.5 μ g/ml였다(Table 2). 이는 Bti균주의 LC₅₀에 비해서 약 20배 정도 독성이 약하였으나, 표준 균주인 Btg는 모기에 전혀 독성을 나타내지 않았으므로, 본 Bt21-2균주의 내독소는 Bti 및 Btg균주의 내독소 단백질 구성이나 기능상에 차이가 있다고 사료된다. 또한 Bti균주의 내독소의 용혈 활성은 5.5 μ g/ml로 강하게 나타났으나, Btg균주 및 Bt21-2균주의 용혈 활성은 415 μ g/ml에서도 나타나지 않았다(Table 2). 일반적으로 Bti균주와 같이 모기에 살충력을 가지는 BT균주는 cry gene과 cyt gene 양쪽을 함유하고 있으며, 두 유전자의 산물에 의한 상승작용으로 모기에 대한 치사력이 매우 강하다고 알려져 있다[17, 21, 22]. 따라서 Bt21-2균주가 Bti균주의 내독소에 비해 모기에 살충력이 약

Table 2. Biological activity of the strain Bt21-2

| Strain | Toxic target insect | Mortality LC ₅₀ (μ g/ml) | Hemolytic activity (μ g/ml) |
|--------|----------------------|--|----------------------------------|
| Bti | <i>Aedes aegypti</i> | 0.17 | 5.5 |
| Btg | None | - | >415 |
| Bt21-2 | <i>Aedes aegypti</i> | 2.5 | >415 |

Delta-endotoxins of the strain Bt21-2 was suspended into a test tube(Φ 1.8 \times 10 cm) containing 20 larvae(the 2nd instar of *Aedes aegypti*) in 5 ml tap water. The larvae were kept at 25°C and the mortality was determined by Reed & Muench[18]. The hemolytic activity of δ -endotoxin against human RBC was performed according to the method of Yu *et al.*[17].

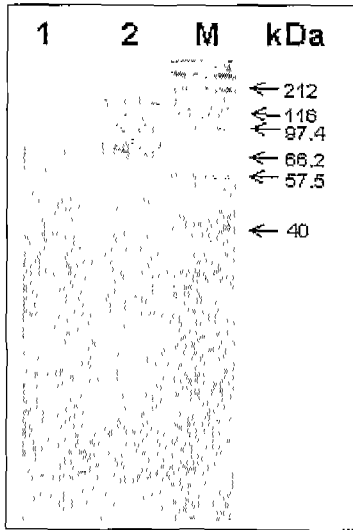


Fig. 1. Protein pattern of δ -endotoxins of the strain Bt21-2 and the strain Btg on SDS-PAGE.

Lane1; Strain Btg, Lane 2; Strain Bt21-2, Lane M; Molecular marker.

하다는 점은 Bt21-2균주의 내독소 자체가 모기에 대한 살충력이 약하기 때문이라고 생각되지만, 그 외에도 Bti균주의 내독소[21, 22]와는 달리 Bt21-2균주가 용혈성 단백질을 전혀 함유하고 있지 않거나 양적으로 극히 소량 분비하고 있어 모기유충에 대한 주 독성 단백질과 용혈성 단백질이 모기유충에 대한 치사력에 상호 상승효과를 일으키지 않기 때문일 가능성도 있어 이에 따른 연구는 더욱 진행되어야 한다고 사료된다.

내독소의 SDS-PAGE 및 Immuno-blot

Bt21-2균주와 표준균주인 Bti 및 Btg균주의 내독소의 차이는 SDS-PAGE와 immuno-blot상에서 단백질 양상을 비교 검토하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 SDS-PAGE상에서 Bt21-2균주의 내독소는 150, 90 및 70 kDa 크기의 주 단백질로 구성되어 있으나, Btg균주의 내독소는 70 kDa이 주 단백질이었다. 또한 Fig. 2에서 보는 바와 같이 Immuno-blot상에서 Bt21-2의 내독소는 150, 90 및 70 kDa 이외에도 116 kDa과 42 kDa의 단백질이 더 존재하였으며, Btg균주의 내독소는 90 kDa와 116 kDa의 단백질이 존재하였다. 따라서 내독소의 SDS-PAGE와 immuno-blot의 결과를 종합해 보면 이들 양 균주의 내독소에는 공통적으로 70 kDa, 90 kDa 및 116 kDa 크기의 내독소 단백질이 존재하고 있으며, 이중에 90 kDa와 116 kDa는 Bt21-2균주의 항내독소에 대해 동일한 항원성을 가지고 있으나 70 kDa의 내독소 단백질은 서로 항원성이 다르기 때문에 immuno-blot 상에는 Btg균주의 내독소중 70 kDa의 단백질이 나타나지 않았다고 생각된다(Fig. 2).

또한 SDS-PAGE상에서 Bt21-2와 Bti균주의 내독소 단백

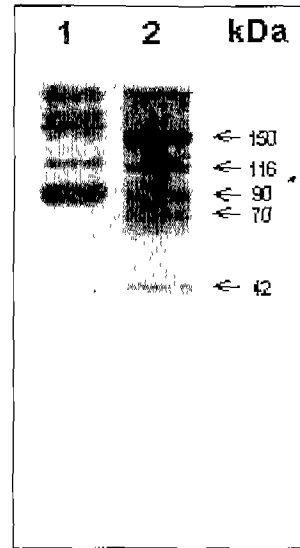


Fig. 2. Immuno-blot of δ -endotoxins from the strain 21-2 and the strain Btg.

Lane1; Strain Btg, Lane2; Strain Bt21-2.

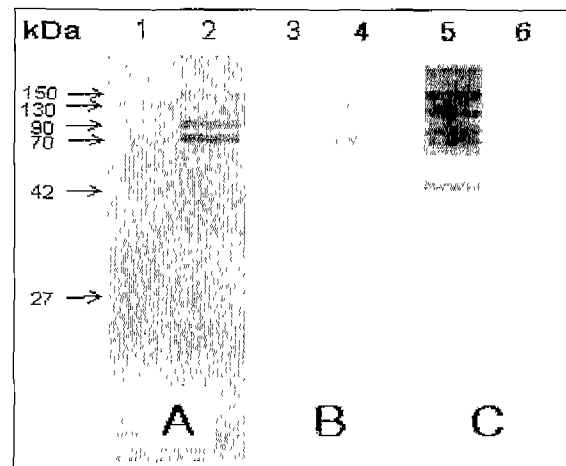


Fig. 3. SDS-PAGE and immuno-blot of δ -endotoxins from the strain Bti and the strain Bt21-2.

A; SDS-PAGE, B; Immuno-blot against anti- δ -endotoxin of Strain Bti, C; Immuno-blot against anti- δ -endotoxin of Strain Bt 21-2, Lane 1,4,6: δ -endotoxin of Strain Bti; Lane 2,3,5: δ -endotoxin of Strain Bt21-2.

질 양상을 비교하면 Fig. 3(A; lane 1-2)에서 보는 바와 같이 Bti균주의 내독소는 135, 70, 28 kDa으로 구성되어 있어 Bt21-2균주의 내독소 단백질(150, 90, 70 kDa)과는 70 kDa의 단백질을 제외하고는 단백질의 분자량 및 그 구성에서 큰 차이가 있었다. 또한 양 균주의 내독소를 immuno-blot한 후 각 균주의 항내독소를 사용하여 상호 교차반응을 행하였다. 그 결과 Fig. 3.(B; lane 3-4)에서 보는 바와 같이 Bti균주의 항내독소에 대한 Bt21-2균주의 내독소는 거의 반응이 나타나지 않았으며, Bt21-2균주의 항내

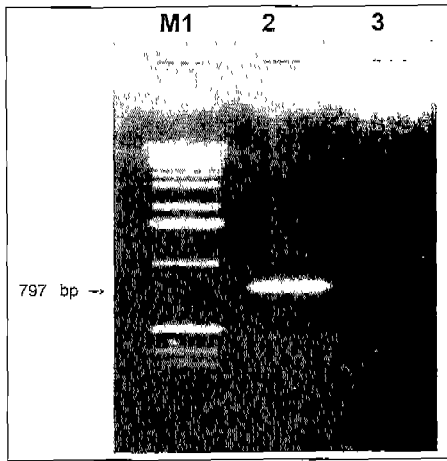


Fig. 4. Amplification of δ -endotoxin gene of the strain Bt21-2 with Dip1A and Dip1B. Lane M1: DNA marker; Lane 2: Amplified DNA of Strain Bti; Lane 3: Amplified DNA of Strain Bt21-2.

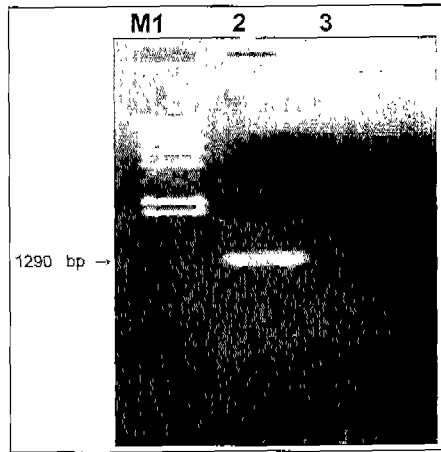


Fig. 5. Amplification of δ -endotoxin gene of the Bt21-2 with Dip2A and Dip2B. Lane M2: DNA marker; Lane 2: Amplified DNA of Strain Bti; Lane 3: Amplified DNA of Strain Bt21-2.

독소에 대한 Bti균주의 내독소도 역시 Fig. 3(C; lane 5-6)에서 보는 바와 같이 반응이 나타나지 않았다. 이는 Bt21-2와 Bti균주의 내독소는 비록 모기에 살충성을 가지나 면역학적으로 서로 항원성이 다르므로 양 균주의 내독소는 기원이 서로 다르다고 사료된다.

Bt21-2 내독소 유전자의 증폭

상기에서 기술한 바와 같이 Bt21-2균주의 내독소는 Bti균주의 내독소와 항원성에 차이가 있으며, 또한 생물학적 활성인 용혈성 및 모기 독성에도 차이가 있었다. 따라서 Bti균주의 cry4A와 cry4B가 Bt21-2균주의 내독소와 관련이 있는지를 조사하고자 Bti균주의 내독소 유전자에 특이적인 primer인 Dip1A와 Dip1B 및 Dip2A와 Dip2B를 사용하여

Bt21-2균주의 유전자를 증폭한 결과 Fig. 4, 5에서 보는 바와 같이 대조구인 Bti균주는 각각 796bp와 1,290bp의 산물이 생산되었으나, Bt21-2균주는 primer에 의한 내독소 유전자 산물이 전혀 생산되지 않았다. 따라서 Bt21-2균주의 내독소는 적어도 Bti균주의 cry4A와 cry4B는 관련이 없다고 사료된다. 또한 양 균주의 살충성 내독소의 유전자 연구에서 Bti균주의 cry10A, cry11A 및 cytA에 대한 검토가 있어야 하지만 immuno-blot상에서 결과를 고려해 볼 때 Bti균주와 Bt21-2균주의 모기 살충성 내독소는 유전자에도 차이가 있을 것이라고 사료된다.

결론적으로 본 Bt21-2균주는 Bti균주와 마찬가지로 모기에만 특이적으로 독성을 가지지만, 그 내독소 단백질이 Bti균주의 내독소와 유전 및 항원성이 전혀 달라 Bti균주에 대한 내성 모기 출현에 대체균주로 Bt21-2균주의 사용이 가능하다. 그러나 Bt21-2균주는 모기에 대한 독성이 Bti균주보다 약하기 때문에 독력 증강을 위해 균주가 개량되면 Bti 내성모기 방제균으로 더욱 가치가 있을 것이라고 사료된다.

요 약

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis*(Bti)의 내독소에 대한 저항성 모기의 출현을 방지하기 위하여 모기유충에 살충력이 있는 Bti균주의 내독소와는 다른 *Bacillus thuringiensis* 21-2(Bt21-2)균주가 분리되었다. Bt21-2균주는 *B. thuringiensis* subsp. *guiyangiensis*(H serotype 43)에 속하며, 그 내독소의 형태는 cuboid형으로 표준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *guiyangiensis*(Btg)의 내독소인 bipyramid형과는 모양에서 차이가 있었다.

Bt 21-2균주의 내독소는 *Aedes aegypti*에 독성을 나타내며, SDS-PAGE상에서 150, 90 및 70 KDa의 단백질로 구성되어 있다. 또한 이를 immuno-blot한 결과 Bt21-2균주의 내독소는 Bti균주의 내독소와 항원성에 차이가 있었다. Bt21-2균주는 Bti균주의 내독소 유전자에 특이적인 primer(Dip1A, Dip1B, Dip2A 및 Dip2B)를 사용하여 PCR상에서 내독소 유전자 증폭을 시도하였으나 Bt21-2균주의 내독소 유전자는 전혀 증폭되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교 1999년도 동의대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 결과이며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 일본 Kyushu대학 M. Ohba박사의 조언에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Becker, N. and J. Margalit. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* against mosquitoes and blackflies, pp.

- 147–167. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, and S. Higgs (eds.). *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley and Sons Ltd., England.
2. Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. W. Warren, S. Evola, and M. G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3057–3061.
 3. Cheung, P. Y. and B. D. Hammock. 1985. Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 984–988.
 4. Cheung, T. Y. and K. H. Kim. 1990. Immunological characterization of mosquitocidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 301–304.
 5. Chilcott, C. N. and D. J. Ellar. 1988. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2551–2558.
 6. Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, B. Lambert, D. Lereclus, C. Gawron-Burke, and D. H. Dean. 1995. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* cry genes, p. 14. *Abstracts of the Society for Invertebrate Pathology*. 28th Annual Meeting, Ithaca, N.Y.
 7. De Barjac, H. and E. Franchon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* **35**: 233–240.
 8. Georghiou, G. P. 1994. Mechanism and microbial characteristics of invertebrate resistance to bacterial toxins, pp. 48–50. *Proceedings of the VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*, vol. 1. Society of Invertebrate Pathology, Montpellier, France.
 9. Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietranonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* **37**: 615–636.
 10. Gonzales, J. M. J. and B. C. Calton. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid* **11**: 28–38.
 11. Kim, J. Y. and K. H. Kim. 1997. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. PY123 producing water-soluble yellow pigment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 454–458.
 12. Krieg, N. R. and J. C. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1105–1138, vol. 2. William and Wilkins Co., Baltimore.
 13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
 14. Lowry, O. H., H. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
 15. Miller, L. H. 1992. The challenge of malaria. *Science* **257**: 36–37.
 16. Padua, L. E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1978. Serological and bacteriological studies of the three isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10, pp. 169–180. *Annual Reports of ICME, Osaka University*. Japan.
 17. Poncet, S., A. Delecluse, A. Klier, and G. Rapoport. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invertebr. Pathol.* **66**: 131–135.
 18. Reed, L. J. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* **27**: 493–497.
 19. Smibert, R. M. and N. R. Krieg. 1981. General characterization, pp. 417–418. *Manual Method for General Bacteriology*. American Society for Microbiology.
 20. Wasano, N., K. H. Kim, and M. Ohba. 1998. Delta-endotoxin proteins associated with spherical parasporal inclusions of the four Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 501–508.
 21. Wu, D., J. Johnson, and B. A. Federici. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **13**: 965–972.
 22. Yu, Y. M., M. Ohba, and K. Aizawa. 1987. Synergistic effects of the 65- and 25-kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a:8b) in mosquitocidal activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 459–462.

(Received June 8, 1999)