

곤충미생물의 산업적 이용

박 호 용

한국생명공학연구소 곤충자원연구실

현존 지구상의 생물중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충(昆蟲, Insects)은 지구생태적으로 인류보다 더 선점자이며 뛰어난 환경적응력으로 인해 전세계 도처에 걸쳐 성공적으로 서식하고 있다. 미생물 또한 흑한의 극지방부터 적도지방, 열수(熱水) 및 심해까지 다양하게 존재하고 있으며, 이들도 곤충과 마찬가지로 실제 존재하리라고 추정되는 종류 전체의 극히 일부만이 우리에게 알려져 있다. 따라서 확률적으로 곤충과 미생물은 서로의 생존방식에 있어 생태적으로나 진화적으로 어떤 형태로든 상호 밀접한 관계를 가지고 있을 가능성이 높다고 생각된다. 인류와 곤충은 생존의 경쟁자로서 또는 협력자로서 오랜 역사동안 함께 살아왔으며, 이러한 관점에서 곤충미생물을 인식하고 관련연구도 수행되었다. 곤충미생물(昆蟲微生物)은 곤충에 대한 미생물의 역할에 따라 곤충병원미생물(昆蟲病原微生物, insect-pathogenic microorganisms), 곤충공생미생물(昆蟲共生微生物, insect symbionts) 및 기타 공존미생물(co-existent microbes)로 구분할 수 있다. 여기에서는 곤충미생물의 산업적 이용을 위한 기본 정보제공 측면에서 곤충병원미생물과 곤충공생미생물의 특성, 관련 연구 및 이용현황에 대해 간단히 소개하고자 한다.

곤충병원미생물

다른 모든 생명체와 마찬가지로 거의 대부분의 곤충도 일생

Table 1. Biological Diversity - Crunching the Number (Wilson, 1988)

	Number Identified	% of Estimated Total
Micro-organisms(微生物)	5,760	3 - 27 %
Insects/Invertebrates (昆蟲/無脊椎動物)	1,020,561	3 - 27 %
Plants(植物)	322,311	67 - 100 %
Fish(魚類)	19,056	83 - 100 %
Birds(鳥類)	9,040	94 - 100 %
Reptiles/Amphibians (爬蟲類/兩棲類)	11,757	90 - 95 %
Mammals(哺乳類)	4,000	90 - 95 %
Total	1,392,485	

동안 태어나서 늙어가고 병들어 죽는 과정(生老病死)을 겪는다. 병(病)은 정상적인 건강상태가 유지되지 못한 경우를 일컫는데, 원인은 병원미생물(바이러스, 세균, 곰팡이, 리케차 등)에 의한 것과 비병원체(화학물질, 자외선, 고온, 저온, 높은 개체밀도, 영양부족, 먹이오염 및 기타 물리적 요인 등)에 의한 것이 있다. 그 가운데 좁은 의미의 병, 즉 질병(疾病)은 병원체에 의해 발생하는 것을 말한다. 곤충병원미생물은 곤충에 질병을 일으키는 미생물로서 기계적 손상이나 영양탈취, 독성물질 생산의 방법으로 숙주곤충을 감염(infection), 발병(disease), 사망(death)시킨다.

곤충병원미생물에 대한 역사적 기록으로는 B.C. 330년경 Aristoteles가 꿀벌의 병을 최초로 관찰, 문헌적으로 기록하기 시작한 후, Virgil(B.C. 30년경), Pliny(A.D.77년)가 꿀벌의 병을 보고하고, 백강병 누에 관찰(920년)에 이어, 1834년 Bassi는 백강병균이 누에병의 원인이라는 것을 실험적으로 증명하였으며, 1865년 Pasteur는 누에미립자병과 연화병을 연구하고 병원미생물설을 확립하였다. 1899년 Metchnikoff는 흑강병균으로 해충방제를 시도하였으며, 1907년 von Prowazek은 다각체병 누에체액 여과액의 병원성을 증명하였다. 1908년 White는 꿀벌의 병원세균을 분리하였으며, 1911년 Berliner는 *Bacillus thuringiensis*(B.t)를 분리하고, 1927년 B.t의 실용화 및 제제화시험을 시도하였다. 1934년 누에세포질다각체바이러스가 발견되었고, 1947년 Bergold는 누에핵다각체로부터 바이러스입자를 분리하였다. 1947년 Steinhaus가 '곤충병리학 원리'를 저술하면서 더욱 학문적 체계를 갖추고, 1959년 J. Insect Pathology(후에 J. Invertebrate Pathology로 바뀜)가 창간되었고 1960년 미국에서 BT제제가 농약으로 등록인가 되었다. 현재 세계적으로 여러종류의 바이러스, 세균, 사상균, 리케차, 원생동물등이 효과적이고 환경친화적 해충방제를 위한 산업적 균주로 이용되고 있다.

곤충병원미생물은 사람이나, 가축, 식물에는 전혀 해가 없으면서 대상 해충을 효과적으로 방제할 수 있는 특성으로 인해 선진각국에서는 비교적 오래전부터 자국의 환경에 적합한 곤충병원미생물을 발굴, 대량생산, 제제화하여 실용화하고 있다. 특히 최근 세계적인 화학 및 농약제품회사들의 화학분야에서 생물분야 집중 및 미생물살충제 시장 진출전략 강화등의 움직임

Table 2. Groups of Viruses Associated with Insects

Family	Genus	Nucleic acid	Particle shape	Association with inclusion body	Biochemical and Biophysical similarities to plants found in	
					vertebrate	Plants
Baculoviridae	Baculovirus	DNA	Rod	+	None	None
Poxviridae	Entomopoxvirus	DNA	Ovoid	+	Poxviruses	None
Reoviridae	Cytoplasmic polyhedrosis virus	RNA	Isometric	+	Reovirus blue-tongue	Rice dxarf, wound tumor
Iridoviridae	Iridovirus	DNA	Isometric	-	African swine fever Frog viruses 1-3	None
Parvoviridae	Densovirus	DNA	Isometric	-	Parvoviruses	None
Picornaviridae	Unassigned	RNA	Isometric	-	Picornaviruses	Many small RNA viruses
Caliciviridae	Unassigned (Amyeloid virus)	RNA	Isometric	-	Caliciviruses	None
Nodaviridae	Nodavirus	RNA	Isometric	-	*	None
Rhabdoviridae	Sigmavirus	RNA	Bullet-shaped	-	Rhabdoviruses	Rhabdoviruses
Nudaurelia β virus group	Unassigned	RNA	bacilliform Isometric	-	None	None

*Nodamura virus also replicates in various vertebrate cells and in suckling mice

입과 함께 국내기업 및 정부도 관련대책을 준비중이다. 특히 상대적으로 좁은 국토면적과 빈약한 부존자원을 지닌 우리나라의 경우, 그린라운드(GR)등 WTO체제 출범이후의 세계적 개방화 흐름에 적극적으로 대응할 수 있는 국내 자생의 곤충 병원미생물을 이용한 미생물살충제 개발등을 통해 국가경쟁력을 극대화 시킬 필요성이 시급히 요청되고 있다. 현재 전세계 농약시장에서 생물농약이 차지하는 비중은 아직 미약하지만 (약 5%), 전체 농약시장규모가 정체적인데 비해 생물농약은 중요성이 급격히 인식되어 연평균 약 20%이상의 성장을 하고 있어 수년내로 상당한 규모의 시장형성이 예측된다. 국내의 경우 일부 외국산 생물농약이 사용되는 도입초기단계이며, 국내 전체 농약시장 약 7,000억원중 살충제가 약 2,700억원을 점유하고 있다(97 농약연보).

곤충바이러스는 높은 숙주특이성과 강한 병원력으로 인해 발견이래 많은 주목을 받아왔다. 그중 Baculovirus는 지금까지 약 500종의 곤충에서 발견되었으나 척추동물이나 식물에서는 전혀 발견되지 않고 이들을 감염시키지도 않는 장점이 있으며, circular supercoiled dsDNA의 핵산을 지닌 바이러스 입자가 거대한 크기의 다각체단백질(polyhedron)에 embedding되어 있다. 감염메카니즘은 먼저 숙주곤충이 먹이와 함께 바이러스를 섭식하면 곤충의 중장(中腸, midgut)에서 약 알칼리성의 소화액등에 다각체단백질이 분해되어 방출(release)된 바이러스 입자가 중장세포를 통과하여 숙주세포로 이동하고, fusion이나 viropexis의 방법으로 세포막을 통과, 바이러스입자를 싸고 있는 coat protein을 벗고(uncoating), 핵내로 들어간다. 이렇게

생물산업

침입한 바이러스는 감염된 숙주세포의 핵내에서 72시간내에 자신의 핵산과 단백질을 급격히 복제, 합성, 증식(replication)하고 이렇게 만들어진 바이러스입자들이 다시 많은 다각체를 형성(assembly)한다. 그 후 물리적 압력등으로 감염세포는 파괴되고, 혈림프나 개체밖으로 방출된 바이러스입자나 다각체는 다시 주변의 세포나 곤충의 2차 감염원으로 작용한다. Baculovirus는 주로 인시목 곤충의 지방체(脂肪體, fat body), cuticle, 혈구, 기관 및 생식조직에 감염하며, 감염된 숙주곤충은 곧 행동이 느려지고, 섭식을 중단하며 체액에 충만한 바이러스다각체로 인해 몸마디가 기형적으로 붓고, 수일후엔 나뭇가지등 주변의 높은 곳으로 이동하여 배다리(腹肢)를 부착한 채 역V자형으로 매달려 죽는다. Baculovirus는 현재 미생물살충제로 매우 효과적으로 널리 이용되고 있으며, 최근 생명공학 기술의 발달과 함께 다각체단백질(polyhedrin) 유전자 및 promotor를 이용한 외부유전자 발현벡터(expression vector)로도 대단히 각광을 받고 있기도 하다. Baculovirus 그룹에 속하는 핵다각체바이러스(NPV, nuclear polyhedrosis virus)나 과립병바이러스(GV, granulosis virus)가 숙주세포의 핵에서 증식하는 것에 비해, Reovirus 그룹에 속하는 세포질다각체바이러스(CPV, cytoplasmic polyhedrosis virus)는 숙주세포의 중장피막세포에 주로 감염하며, 세포질에서 바이러스다각체가 형성된다. 감염된 곤충은 먹이를 섭식하지 못해 체형이 가늘어지고 축 늘어진 상태로 죽는다. 지금까지 해충방제용 농약으로 등록된 곤충바이러스는 주로 NPV이며 *Heliothis zea*(제품명 Biotrol VHZ, Elcar, Viron H), *Spodoptera exigua*(Biotrol

표 3. 천적바이러스를 이용한 미생물살충제 상품화 현황

병원체	해충명	제품명	대상해충명	사용국
NPV	<i>Heliothis zea</i> (bollworm, corn earworm, tomato fruit moth)	Biotrol VHZ, Elcar, Viron H	거세미나방의 일종	미국
NPV	<i>Heliothis virescens</i> (tomato budworm)	Biotrol VHZ, Elcar, Viron H	거세미나방의 일종	미국
NPV	<i>Spodoptera exigua</i> (beet, armyworm)	Biotrol VSE	파밤나방	미국
NPV	<i>Trichoplusia ni</i> (cabbage looper)	Biotrol VTN Viron T		
NPV	<i>Autografa californica</i> (alfalfa looper)	SAN 405	거세미나방의 일종	미국
NPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> (douglass-fir tussockmoth)	TM-Bio Central-1 Virtuss	독나방의 일종	미국
NPV	<i>Lymantria dispar</i> (gypsy moth)	Gypchek Virin-Ensh	짚시나방	미국 캐나다
NPV	<i>Necodiprion sertifer</i> (Pine sawfly)	Neocheck-S Vrin-Diprion	솔잎혹파리	미국 소련
NPV	<i>Necodiprion lecontei</i> (red-beaded-pine sawfly)	Lecontivirus	솔파리의 일종	미국 소련
CPV	<i>Dendrolimus spectabilis</i> (pine caterpillar)		솔나방	일본
GV	<i>Pieris rapae</i> (imported cabbage worm)	Virin-Gkb	배추흰나비	소련

VSE), *Trichoplusia ni*(Biotrol VTN, Viron T), *Autographa californica*(SAN405), *Lymantria dispar*(Gypchek, Virin-Gkb), *Pieris rapae*(Virin-Gkb)를 대상해충으로 하고 있다. 바이러스제제는 숙주특이성과 병원력이 매우 우수한 장점도 있지만 생산비용이 다른 미생물살충제보다 높다는 단점도 있다.

곤충병원성 세균은 주로 내생포자(endospore)를 생산하는 간균 및 구균(*Bacillus*, *Clostridium*), 그람음성 통성혐기성 간균(*Serratia*, *Proteus*, *Enterobacter*), 그람양성 통성호기성 간균 및 구균(*Pseudomonas*), 그람양성 구균(*Streptococcus*), 리케차(*Wolbachia*, *Rickettsiella*), 마이코플라스마(*Spiroplasma*) 등이 속한다. 그 중 곤충병원성이 강한 세균을 다수 포함하고 있는 세균군(群)이 *Bacillus* 그룹이며 *Bacillus popilliae*와 *Bacillus thuringiensis*가 각각 편성(obligate) 및 통성(facultative) 혐기성 병원체를 대표하고 있다. *B. thuringiensis*는 세포의 성장과정에서 여러 가지 독소단백질(α -exotoxin, β -exotoxin)을 만드는데, 그 중 가장 살충력이 강한 것이 결정성 독소단백질(δ -endotoxin)이다. 대부분 이중피라미드 모양의 독소단백질은 보통 세포당 하나의 결정을 형성하며, 주로 인시목 곤충의 장내에서 소화효소에 의해 분해되어 매우 강력한 독소작용을 한다. 숙주곤충이 독소단백질을 먹으면 독소에 의해 중장파막 조직이 손상을 받고 수분내 섭식을 정지하고 각종장해가 나타난다. B.t 내생포자는 원래 소화액 pH 9.0이상의 곤충장내에서는 발아하지 못하지만 장(腸)이 손상되어 약산성 체액

(hemolymph)와 알칼리성 소화액이 만나 장내 pH가 낮아지면 포자가 발아, 증식할 수 있게 된다. 영양형 세포(vegetative cells)는 장관의 손상부위를 통해 곤충의 혈체강에 침입하고 감염숙주곤충은 패혈증에 의해 수일내로 죽으며, 누에의 경우 수습분이내에 죽기 때문에 졸도병이라고도 불린다. B.t 결정성 독소단백질 자체는 곤충의 몸에 주사를 해도 살충력을 나타내지 않는데, 이는 분자량 약 230,000의 단백질(protoxin)이 소화액의 protease에 의해 70,000이하의 활성독소(toxin)로 변환되어야 곤충에 독성을 나타내기 때문이다.

지금까지 100종류이상의 B.t 가 보고되고 있으나 대부분 인시목 곤충(lepidopteran insects)과 모기등에 살충력을 나타내고 있고, 최근에 딱정벌레목 곤충(coleopteran insects)에 살충활성을 지닌 균주들이 일부 발견되었다. 따라서 딱정벌레목 곤충방제를 위해 효과적이거나 대량인공배양에 문제점을 지닌 *B. popilliae*의 산업적 이용 한계를 극복할 수 있게 되었다. 곤충병을 일으키는 그밖의 *Bacillus* 세균들은 모기(*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*)를 12시간내에 죽이는 *Bacillus sphaericus*, 꿀벌패혈증(American foulbrood)를 일으키는 *B. larvae*등이 있고, 포자를 형성하지 않는 병원체로 European foulbrood를 일으키는 *Streptococcus pluton*, 많은 온혈동물과 곤충의 장내에 있는 *S. faeculis*, *Serratia marcescens* 등이 있다.

곤충병원성 세균에 의한 살충메카니즘은 생리적 기아(*B. popilliae*), 독소에 의한 중독(*B. sphaericus*, *B. thuringiensis*),

표 4. 세균을 이용한 미생물 살충제 상품화 현황

살충성 미생물	대상해충	약 효	제 품 명	사용국 생산자
Bacillus popilliae	Japenes beetle		Doom, Japidemic Milky Spore Disease	일 본 미 국
B. thuringiensis var. kurstaki	lepidopteran lepidopteran lepidopteran lepidopteran lepidopteran lepidopteran lepidopteran lepidopteran lepidopteran lepidopteran		Dipel Thuricide Bactur Bastospeine Plantibac Sporeine Biosper Raktukal Insektin Entobacterin Dendrobacillin	미 국 미 국 미 국 프랑스 프랑스 프랑스 서 독 유 고 소 련 소 련
B. t. var. israelensis	dipteran (mosquitoes, black flies)		Teknar	소 련 미국외
B. t. San diego	coleopteran (Colorado potato beetle)		M-One	미 국 Mycogen사
B. t. tenebrionis	coleopteran (Colorado potato beetle)		Trident Novodor	스위스 Sandoz사 Novo사

수분대사 이상(*C. brevifaciens*), 기계적 조직파괴(*B. popilliae*) 등이다. 리케차 혹은 mycoplasma는 곤충체내에 공생하면서 수직전파에 의해 존속하는 경우가 많으며, 이들 미생물이 숙주의 수명을 단축시키고 생식(生殖)에 악영향을 미친다. BT제제는 현재 전세계 미생물농약시장의 상당부분을 점유하고 있고, 미국, 중국에서 가장 경제적인 상업적 생산을 하고 있으며, 현재 우리나라에서도 여러 연구소, 대학, 기업등에서 관련연구를 진행중이지만, 대부분 외국으로부터 원제를 수입하여 4개 농약회사에서 제제화하는 수준이어서, 생산효율 증대와 함께 기존보다 더욱 효과적인 특성을 지닌 균주를 탐색, 개발하는 분야등으로 노력을 집중하는 개발전략을 취해야 시장경쟁력을 확보할 가능성이 높을 것으로 생각한다. 최근 어느 벤처기업에서 국내에서 분리한 B.t균주를 Mycogen사로 수출한 것은 좋은 예이다. 세균을 이용한 미생물살충제는 주로 BT이며 Japanese beetle(상품명 Doom, Japidemic), 인시목 곤충(Dipel, Thuricide, Bactur, Bastospeine, Plantibac, Biosper, Insektin, Entobacterin), 쌍시목 곤충(Teknar), 딱정벌레목 곤충(M-One, M-trak, Trident, Novodor)이 방제대상이다.

곤충병원성 곰팡이는 지금까지 약 500여종이상이 보고되었는데 진균류(Eumycota)에서 편모균류(Mastigomycotina)의 *Coelomomyces*, *Lagenidium* 접합균류(Zygomycotina)의 *Entomophthora*, *Massospora*, 자낭균류(Ascomycotina)의 *Cordyceps*, 담자균류(Basidiomycotina)의 *Septobasidium*, 불완전균류(Deuteromycotina)의 *Aspergillus*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Hirsutella*, *Nomuraea* 등이 대표

생물산업

적으로 알려져 있다. 곤충병원균은 불완전균류와 접합균류가 가장 많고, 편모균류와 자낭균류, 담자균류 순이다. 곤충기생균의 대부분은 내부기생성이며, 보통은 곤충표피의 cuticle로 침입을 하는데, 그 방법은 포자로부터 뚫어나온 발아관(發芽管)이 직접 cuticle을 관통하거나(*Entomophthora*), 선단의 부착기로부터 나온 침입사가 침입하는 경우가 있다(*Metarhizium*). 또한 균이 혈체강에 도달하여 증식하는 형태로는 무격막성의 균사체(*Coelomomyces*), 균사상의 생육(*Aspergillus*, *Entomophthora sphaerosperma*), 단균사가 체액중에 효모모양으로 증식(*Entomophthora*, *Codyceps*, 불완전균류)등이 있다. 내부기생균의 포자는 주로 숙주사후에 형성되나, 하등균류에서는 생존중에 형성되기도 한다. 숙주의 직접적 사인(死因)은 독소에 의한 중독(*Beauveria*, *Aspergillus*), 호흡이나 체액순환 저해(모기에서 *Metarhizium*), 기계적 조직파괴, 생리적 기아(모기에서 *Lagenidium*)등이다. *Aspergillus*, *Metarhizium* 등 통성병원균은 *Coelomomyces*, *Massospora* 등의 편성병원균들에 비해 상대적으로 배양이 용이하여 상업화가 진전되었다. 곤충병원성 곰팡이는 불완전균류가 주로 이용되며, 선충(상품명 Royal 300), 가루이(*Aseronijia*, *Mycotal*), 진딧물(*Vertalec*), 나방류(*Boverin*), 응애(*Mycar*)가 방제대상이다. 우리나라에서는 과거 솔나방 방제에 곤충병원성곰팡이를 사용한 바 있으며, 최근 본 연구실에서 개발하여(주)경농에 기술이전한 '솔잎혹파리 방제용 미생물살충제' 생산에 국내에서 분리한 *Beauveria bassiana* HY-1 균주를 이용하고 있다. 숙주체내로 곤충병원성 곰팡이의 침입 및 체외의

표 5. 곰팡이를 이용한 미생물 살충제 개발현황

살충성 병원 곰팡이	표적 해충	제품명	사용국
<i>Arthrotrrys rolousta antipolis</i>	양송이 재배상의 식균성 선충	Royal 300	프랑스
<i>Arthrotrrys irregluaris 1141</i>	뿌리혹선충	Royal 500	프랑스
<i>Aschersonia placentia</i>	감귤가루이		소련
<i>Aschersonia aleyroidis</i>	감귤가루이	Aseronijia	소련
<i>Beauveria bassiana</i>	코로라도잎벌레	Boverin	소련
	코드링 나방		소련
	Euronpean corn borer	중국	
<i>Beauveria tenella</i>	풍뎅이일종		프랑스
	구리풍뎅이		일본
<i>Hirsutella thompsonii</i>	감귤녹응애	Mycar	미국
<i>Metarhizium anisopliae</i>	검퐁벌레과 바구미류	Metaguino	브라질
<i>Nomuraea rilyri</i>	옥수수명나방류		미국
<i>Verticillium lccanii</i>	온실의 진딧물	Vetalec	영국
	온실가루이		영국
	무화과각지벌레	Mycotal	체코

포자형성에는 다습조건이 필수적인데, 우리나라의 특이한 기후를 고려할 때 상대적으로 저온과 건조에 견디는 힘이 강하면서도 우수한 살충력은 지닌 이러한 산업균주의 확보는 매우 중요하다. 숙주곤충을 기질로 병원성곰팡이가 침입하는 과정에서 생산하는 생리활성물질을 이용하는 것은 전통적인 약용 곤충(藥用昆蟲)중 백강잠(白蠶, *Beauveria*), 동충하초(冬蟲夏草, *Cordyceps*) 등이 잘 알려져 있다. 백강잠의 경우 Beauvericin 을 비롯한 여러 가지 활성물질이 분리되고 있으며, 전통의약에서 거론하고 현재까지 각종 약재, 음식, 술등에 귀하게 이용하는 동충하초(일명 蟲草)의 경우도 Cordycepin 등의 활성물질이 분리되었다. 참고적으로 중국과 일본에서 보고된 동충하초 균의 종류는 약 500여종 이상이며 우리나라에서도 50여종 이상이 보고되었지만 약용, 식용으로 통용되는 것은 2-3종 정도(*C. militaris*, *C. sinensis* 등) 뿐이다. 참고적으로 현재 국내에서 '눈꽃동충하초'로 불리며 동충하초 봄을 일으키고 있는 것의 균주는 *Cordyceps*이 아니라 *Paecilomyces*이다.

곤충공생미생물

생명체들은 생태계의 물리적, 화학적 환경하에서 다양한 종간, 개체간의 상관관계를 가지며 살아가고 있다. 이러한 상호관계는 한쪽이 다른 생물에 해를 끼치며 붙어사는 기생(寄生, parasitism), 한쪽만 이익을 얻는 편리공생(片利共生, commensalism), 그리고 서로 이익을 얻는 상리공생(相利共生, mutualism), 운반공생(運搬共生, phoresis)으로 나타난다. 그 중 두 생물 종간의 공생은 단순히 공간적, 영양적 관계만을 가지는 것이 아니라 서로의 종족 보존과 경쟁자에 대한 우위의 획득 등의 다양하고 때로는 필수적인 관계를 보이는 경우도 있으며, 극단적인 공생의 결과 진핵생물의 미토콘드리아나 식물의 엽록체와 같이 한 종이 다른 종의 일부로 진화된 공생관

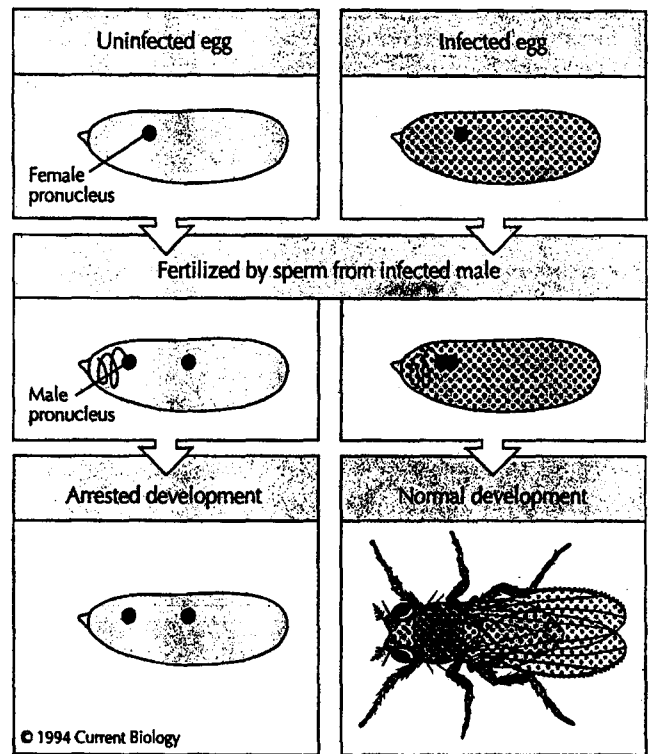


Fig. 1. Cytoplasmic incompatibility. An uninfected egg fertilized by sperm from an infected male fails to complete karyogamy and/or the first few cleavage divisions. By contrast, an egg from an infected female fertilized by sperm from an infected male completes karyogamy and develops

계도 나타난다(Schwemmler 등, 1989).

곤충과 공생하는 미생물은 나타나는 위치에 따라 크게 두 가지 형태로 나누어 볼 수 있는데, 미생물이 곤충의 서식지나 표피에 나타나는 external microbiota(exosymbionts)와 곤충의 몸 안에 나타나는 internal microbiota(endosymbionts)가 있다.

External microbiota의 대부분은 일시적이고 그들의 수에 있어서도 매우 다양하지만, 어떤 경우에는 편리공생이나 상리공생의 형태로도 나타나는 데, 먹이 또는 수분이나 적당한 환경을 유지하기 위한 목적으로 곤충이 배양하는 곰팡이(Ascomycotina of beetles, *Attamyces* of leaf-cutting ants, *Termitomyces* of termites)가 그 대표적인 예라 할 수 있다(Tanada 등, 1993).

Internal microbiota는 곤충 소화기관의 내강(內腔), cavities, pouches 그리고 세포 내 (intracellular)에 나타나는 것으로 곤충 내부의 환경 (pH, enzyme, food)에 따라 미생물의 종류나 수가 다르다. 곤충 내부에는 Gram-negative의 rod형 세균이 대부분이고, 곰팡이 (saprophytic fungi, yeast, yeast-like organism)나 곤충을 매개로 이용하는 식물 병원성 바이러스도 일부 존재한다(Tanada 등, 1993).

Internal microbiota 중 특히 intracellular 미생물을 endosymbiont라 하며, 이들의 대부분은 모계를 통해 다음 세대에 전달되며, 숙주 밖에서 분리가 어렵고, 어떤 것은 곤충의 성장 단계에 따라 형태나 크기가 변하기도 한다. 혈액을 흡즙하는 또는 식물 수액을 흡즙하는 곤충의 영양과 관련하여 mycetome의 특별한 구조에 서식하는 미생물과 생식조직에 서식하며 곤충의 생식에 영향을 주는 미생물이 endosymbiont의 대표적인 예라 할 수 있다 (Tanada 등, 1993).

곤충의 생식조직(ovaries and testes)에서 일반적으로 널리 알려진 *Wolbachia*는 1924년에 Hertig 와 Wolbach에 의해 모기 *Culex pipiens*의 생식조직에서 처음 보고되었다. *Wolbachia*는 형태적으로 rickettsiae와 매우 유사한 Gram-negative의 세포벽을 갖는 rod형 세균으로서 type specie는 *C. pipiens*에서 알려진 *Wolbachia pipientis*이다(Emilio 등, 1956). 숙주와 *Wolbachia* species의 관계는 이 세균이 알려진 이후 오랜 동안 밝혀지지 않았다. 1950년대에, Ghelelovitch와 Laven은 모기 *Culex* 안에서 어떤 intraspecific crosses가 성립될 수 없다는 것을 발견하였으며, 이러한 현상이 세포질로 유전되는 incompatibility factor에 의해 일어난다는 것을 밝혔다. 이렇게 불화합성으로 자손을 거의 생산하지 못하는 이러한 현상을 cytoplasmic incompatibility (CI)라 하였는데, 1970년대 Yen과 Barr (Yen 등, 1971)가 항생제를 처리하여 대상 곤충으로부터 *Wolbachia*를 제거하는 것에 의해 CI현상이 *Wolbachia*와 관계가 있음을 밝혔다. 즉, *Wolbachia*가 감염된 strain의 male과 항생제 처리로 *Wolbachia*가 제거된 동일 strain의 female이 mating할 경우 불화합성으로 인해 자손의 증식이 거의 불가능하였다.

그 후, 이런 CI현상은 flour beetles (Scott 등, 1989), alfalfa weevils 그리고 기생벌 (Richardson 등, 1987)등의 여러 곤충에서 알려졌으며, 이와 관련된 연구로서 절지동물에서 세포질로 (maternally or cytoplasmically) 전달 되는 세균이 자손의 성 비율과 성 결정에 변화를 준다는 것이 알려졌다 (Hurst 등, 생물산업

1993). 최근 여러 중요한 곤충 목인 딱정벌레목 (Coleoptera), 파리목 (Diptera), 벌목 (Hymenoptera), 매미목 (Hemiptera/Homoptera), 메뚜기목 (Orthoptera) 그리고 나비목 (Lepidoptera) 등의 80여종에서 *Wolbachia*의 존재가 밝혀졌으며 (Werren 등 1995), 17종의 등각류 (Rousset 등, 1992)와 진드기 (Johanowicz 등, 1995)에서도 *Wolbachia*가 관찰되었다. 또한 최근에는 선충에서 *Wolbachia*와 매우 유사한 세균이 발견되었다 (Sironi 등, 1995).

*Wolbachia*에 의해 유도된 CI는 정자와 난 사이의 생식적 불화합성으로 diploid 종에서의 zygotic death (Yen 등, 1971)나 haplodiploid종에서 male 생성을 유도한다 (Breeuwer 등, 1990). CI는 unidirectional CI와 bidirectional CI의 두 가지 형태로 나타나는데, unidirectional CI는 *Wolbachia*에 감염된 male의 정자가 감염되지 않은 난과 수정할 때 일어난다. 반대의 경우 (감염되지 않은 male과 감염된 female)에는 불화합성이 나타나지 않는다. Bidirectional CI는 서로 다른 *Wolbachia* 종에 감염된 male의 정자와 female의 난이 수정될 때 나타난다 (Mercot 등, 1995; Scott 등, 1995). Breeuwer 등 (1990)이 기생벌 *Nasonia vitripennis*에서 관찰한 것에 의하면, CI는 수정난의 초기 mitosis의 결함과 관계가 있는 것으로 보여진다. mitosis 초기에 paternal chromosome이 diffuion되어 chromatin 덩어리를 형성하게 되어 염색체의 분리가 일어날 수 없게 되므로 paternal genome이 손실되어, haplodiploid성 결정을 갖는 곤충에서는 haploid (male) 자손의 발생을 유도하고, diploid 종에서는 embryo를 죽게 한다(Breeuwer 등, 1990).

현재 *Wolbachia*는 다양한 이유로 관심의 대상이 되어지고 있다. 첫째, *Wolbachia*가 여러 곤충 목에서 그들의 숙주에 미치는 영향으로 볼 때, 숙주의 진화과정에 밀접한 관계를 가지는 것으로 보이며, 숙주의 빠른 종형성에 잠재적인 역할을 할 것으로 보여지기 (Breeuwer 등, 1990; Coyne 등, 1992) 때문에, 그 기작과 관련하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 둘째, 이 세포 내 세균들이 그들 숙주의 초기발생과 핵분열과정에 변화를 주는 기작에 대한 기본적인 연구를 위해 (Glover 등, 1990), 셋째, 미생물 천적으로서 *Wolbachia*를 생물학적 제제 (biological agent)로 사용하거나 곤충 집단의 유전적 변이 (genetic modification)를 퍼뜨리기 위한 매개로 사용하기 위해 많은 연구가 진행중이다.

*Wolbachia*와 같이 곤충과 특별한 관계를 가지며 세포내 세균으로 존재하는 미생물들은 그들의 숙주 밖에서 배양이 불가능하여 이들의 생물학적 역할이나, 분류학적 위치를 결정하는 것이 매우 어려웠다. 그러나, 최근 분자생물학적 기법을 이용하여 원핵세균의 ribosomal RNA의 small subunit을 coding하는 유전자를 분리하고 이들의 계통분류를 통해 분류학적 위치를 결정하는 것이 가능하게 되었다 (Gary, 1988; Rudolf 등, 1994; Rudolf 등, 1995). rRNA는 모든 생물체에서 기능적, 진

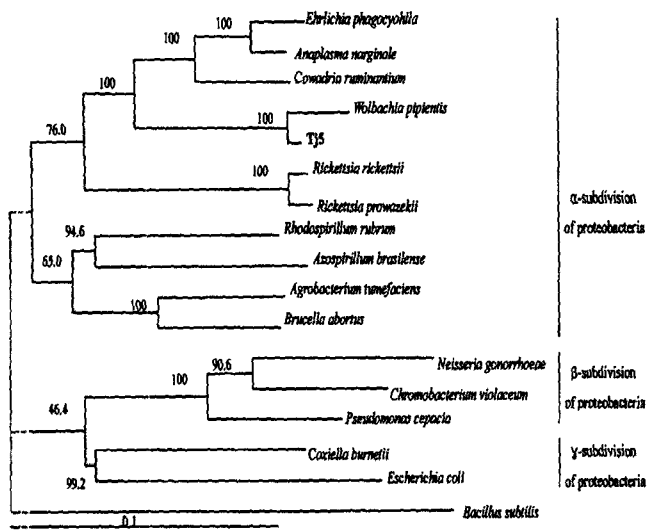


Fig. 2. Phylogenetic tree(based on 16S rDNA sequence) derived from Neighbor-joining analysis of a Tj5 from *Thecodiplosis japonensis* and other representative proteobacteria from the α , β , and γ subdivisions. The Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* was used as the outgroup.

화적으로 매우 유사할 뿐만 아니라, 전체적인 구조에 있어서도 극히 잘 보존되어 있고, 세포 내에 풍부하게 존재하므로 분리가 용이하고, 또 이들의 통계적 비교가 가능할 만큼 충분한 염기서열정보를 가지고 있다 (Gray 등, 1986). 특히 16s rRNA 염기서열의 유사성 정도는 원핵세균 사이의 계통분류학적 관계를 결정하는 데 중요한 역할을 한다. Polymerase chain reaction (PCR)의 기법을 이용하여 endosymbiotic 미생물 rDNA의 획득과 계통분류에의 이용은 곤충 내 공생미생물의 특성을 이해하는 데 매우 유용하게 이용되었다 (Breeuwer 등, 1992; Scott 등, 1992; Bruce 등, 1992; Jonathan 등, 1992).

그 밖의 endosymbionts에 대한 연구로는 벼멸구 (*Nilaparvata lugens*) 등 식물의 수액을 흡즙하는 곤충에 있어서 질소대사등 섭취한 영양분의 대사효율을 높여주는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 기생봉(parasite wasp)이 숙주곤충에 산란할 때 면역메카니즘을 극복하는 수단으로서 연구도 진행되는 등 다양한 관점에서의 접근이 시도되고 있다.

세포질로 전달되는 미생물과 그 숙주 곤충과의 관계는 많은 곤충의 생태학이나 생식생물학에 기초가 되므로, 본 연구실에서는 우리나라 산림에 가장 심각한 피해를 주고 있는 솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis*)를 대상으로 16S rDNA 증폭, 염기서열분석, similarity 및 phylogenetic tree 분석등을 수행하여 솔잎혹파리에 존재하는 공생미생물의 존재를 확인하고 RT-PCR 및 현미경적 조직관찰을 통한 후속연구를 수행하고 있다.

곤충의 exosymbionts는 상대적으로 다루기가 용이하여 몇 가지 분야에서 관련연구결과들이 보고되었다. 대표적인 것으

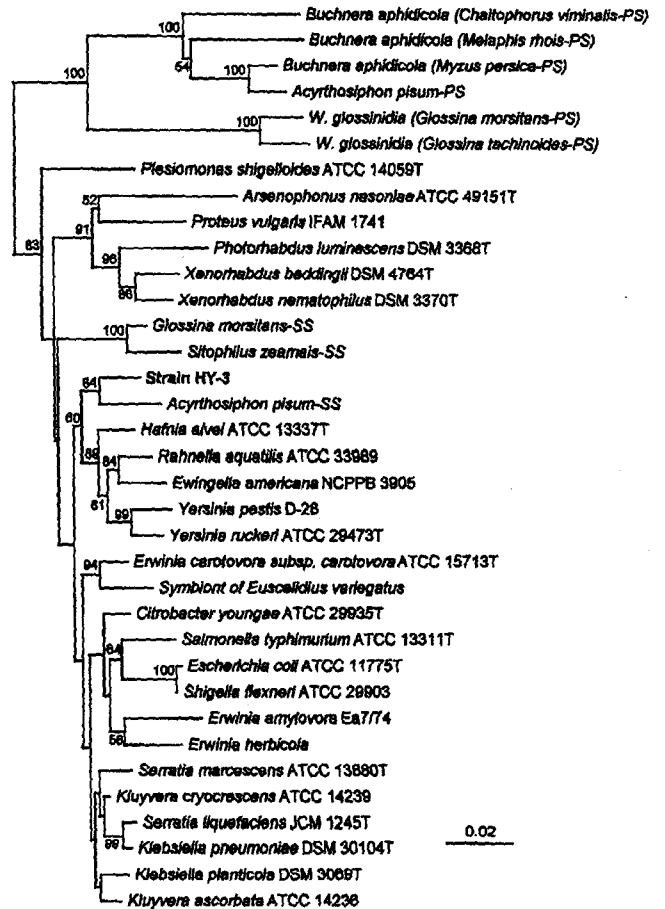


Fig. 3. Rooted neighbor-joining tree(22) based on 1,406 unambiguously aligned nucleotide positions. The numbers at the nodes exhibit the level of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1,000 resampled datum sets. The scale bar represents 0.02 nucleotide substitution per position.

로 목질부를 가해하는 흰개미의 일종인 termite의 장내에서 분리된 몇종의 미생물이 amylase, cellulase, lignase, xylanase 등의 효소를 강력하게 분비하고 있는 것은 대단히 잘 알려져 있다. 최근 본 연구실에서는 한국산 무당거미(*Nephila clavata*)로부터 매우 강력하고 특이한 특성을 지닌 단백질분해효소를 생산하는 신규미생물(*Aranicola proteolyticus*)을 분리하고 현재 산업적 이용 가능성 확인을 위한 연구를 진행중이며, 그 밖의 다른 국내 자생곤충들로부터 관련미생물들을 탐색, 분리하는 연구도 계속하고 있어 관심있는 연구자들의 많은 도움이 있다면 가까운 장래에 매우 흥미롭고 희망적인 결과를 얻을 수 있으리라 기대한다.

참고문헌

1. Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: A challenging task

- for molecular taxonomists. *ASM News* **60**: 360-365
2. Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and In Situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169
 3. Barr AR. 1980. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens* L. *Nature* **283**: 71-72
 4. Bensaadimerchernek, N., J. C. Salvado, C. Cagnon, S. Karama, C. Mouches. 1996. Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S-5S ribosomal-RNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prokaryotic parasite of insect gonads. *Gene* **165**: 81-86
 5. Brakenhoff, R. H., J. G. G. Schoenmakers and N. H. Lubsen. 1991. Chimeric cDNA clones: a novel PCR artifact. *Nucleic Acids Research*, **19**: 1949
 6. Breeuwer, J. A. J. and J. H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**: 558-560
 7. Breeuwer, J. A. J., R. Stouthamer, D. A. Burns, D. A. Pelletier, W. G. Weisburg, J. H. Werren. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect. Mol. Biol.* **1**: 25-36
 8. Campbell, B. C., T. S. Bragg and C. E. Turner. 1992. Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (Coleoptera:Curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **22**: 415-421
 9. Coyne, J. A.. 1992. Genetics and speciation. *Nature* **355**: 511-515
 10. Eisen, J. A., S. W. Smith and C. M. Cavanaugh. 1992. Phylogenetic relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Bacteriol.* **174**: 3416-3421
 11. Giordano, R., J. J. Jackson, and H. M. Robertson. 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11439-11444
 12. Giordano, R., S. L. O'Neill and H. M. Robertson. 1995. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila schellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* **140**: 1307-1317
 13. Glover, D. M., J. Raff, T. L. Karr, S. L. O'Neil, H. Lin and M. F. Wolfner. 1990. Parasites in *Drosophila* embryos. *Nature* **348**: 117
 14. Hurst, L. D.. 1993. The incidences, mechanisms and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.* **68**: 121-193
 15. Johanowicz, D. L., M. A. Hoy. 1995. Molecular evidence for A-*Wolbachia* endocytobiont in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*. *J. Cell Biochem.* **21A**: 198
 16. Kopczynski, E. D., M. M. Bateson and D. M. Ward. 1994. Recognition of cimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Env. Microbiol.* **60**: 746-748
 17. Larsen, N., G. J. Olsen, B. L. Maidak, M. J. McCaughey, R. O. 다, T. J. Macke, T. L. Marsh and C. R. Woese. 1993. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, **21**: 3021-3023
 18. Lee B., S. L. O'Neill, H. M. Robertson and T. L. Karr. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* **260**: 1796-1799
 19. Mercot, H., B. Llorente, M. Jacques, A. Atlan and C. Montchamp-Moreau. 1995. Variability within the seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics* **141**: 1015-1023
 20. O'Neill, S. L., R. Giordano, A. M. E. Colvert, T. L. Karr, and H. M. Robertson. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2699-2702
 21. Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni and N. R. Pace. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 337-365
 22. Olsen, G. J.. 1988. Phylogenetic analysis using ribosomal RNA. *Methods in Enzymology*, 164:793-812 Scott L. O'Neill, and Timothy L. Karr. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, **348**: 178-180
 23. Richardson, P. M., W. P. Holmes and G. B. Saul II. 1987. The effect of tetracycline on nonreciprocal cross incompatibility in *Mormoniella*[=*Nasonia*] *vitripennis*. *J. Inverte. Pathol.* **50**: 176-183
 24. Rousset, F., D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault, and M. Solignac. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **250**: 91-98
 25. Schwemmler, W. and G. Gassner. 1989. Insect endocytobiosis: Morphology, Physiology, Genetics, Evolution. CRC Press, Inc. p217-254
 26. Sironi, M., C. Bandi, L. Sacchi, B. Di Sacco, G. Damiani, and C. Genchi. 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**: 223-227
 27. Stouthamer, R. and J. H. Werren. 1993. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Inverte. Pathol.* **61**: 6-9
 28. Stouthamer, R., J. A. J. Breeuwer, R. F. Luck, and J. H. Werren. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* **361**: 66-68

29. Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic press, Inc. p12-51
30. Weisburg, W. G., S. M. Barms, D. A. Delletier and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703
31. Weiss E., G. A. Dasch and K. P. Chang. 1956. Tribe III. Wolbachiae Philip. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, ed. NR Krieg, JG Holt, pp. 711-713
32. Werren, J. H.. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.* **42**: 587-609
33. Werren, J. H., L. Guo, G. D. D. Hurst, W. Zhang, J. A. J. Breeuwer, R. Stouthamer, and M. E. N. Majerus. 1994. Rickettsial relative associated with male-killing in the ladybird beetle(*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.* **176**: 388-394
34. Werren, J. H., L. R. Guo, D. W. Windsor. 1995. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **262**:147-204
35. Werren, J. H., W. Zhang and L. R. Guo.1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* : reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B* **261**: 55-71
36. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271
37. Yen, J. H., A. R. Barr. 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature* **232**: 657-658