

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* 의 용혈성 약화 및 무포자 변이주의 분리

배점순 · 김광현*

동의대학교 자연대 생물학과

Isolation of Oligosporogenous (Spo⁻Cry⁺) Mutant Containing Relatively Low Hemolytic Activity in δ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Bae, Jeom-Soon and Kwang-Hyeon Kim*

Department of Biology, College of Natural Science, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

The isolate SPO 3, an oligosporogenous and crystalliferous mutant, which was isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by heat treatment at 42°C for 24 hrs. The δ -endotoxin of the mutant had a relatively low hemolytic activity on human red blood cells; the δ -endotoxin of the mutant had 25 times less hemolytic activity compared to that of wild strain. The loss of 28 KDa hemolytic protein subunit in δ -endotoxin of the mutant was confirmed by means of double immunodiffusion, immunoelectrophoresis, and SDS-PAGE.

B. thuringiensis subsp. *israelensis* 균주에 관해서는 모기방제의 실용화를 위한 연구(1,2)와 δ -endotoxin의 구조 및 성질에 관한 연구(3-7) 및 δ -endotoxin 생산에 관여하는 유전자 연구(8-11) 등 많은 관심이 집중되어 왔다.

본인 등은 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주를 이용하여 모기를 방제하기 위해서는 1) 균체배양으로 형성된 포자와 δ -endotoxin의 혼합물을 그대로 사용하는 경우와 2) δ -endotoxin만을 포자로부터 분리하여 사용하는 경우를 생각하였다. 전자의 경우에는 포자가 field에서 저항성이 크므로 지속적으로 모기방제에 효과를 기대할 수 있으나 다량의 산포에 따른 미생물 생태계에 변화를 초래할 가능성이 있다고 생각되며, 후자의 경우에는 적어도 대량생산에서 기술적인 공정상의 어려움이 있다고 생각되었다. 또한 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주가 생산하는 δ -endotoxin은 알카리에서 용해되면 용혈성 단백질이 유리된다는 보고(6)가 있어 본 연구에서는 무

포자인 동시에 δ -endotoxin을 생산하는 변이주의 분리와 아울러 δ -endotoxin 내의 용혈성 단백질의 소실 또는 그 활성의 약화를 시도하였다.

재료 및 방법

균주 및 변이주의 분리

일본 Kyushu 대학 Aizawa 교수로부터 분양받은 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) 균주를 사용하였다. 변이주의 분리는 Bti 균주를 열처리시키면 plasmid의 제거와 아울러 undefined mutation에 의한 genetic alteration이 유발될 수 있다는 보고(12)에 의거하여 Bti를 Ward 등의 방법(8)에 따라 TYG 한천평판배지(13)상에 도말하여 42°C에서 24시간 열처리시키고 다시 28°C로 옮겨서 5일간 배양시켰다. 이때 형성된 균의 집락은 위상차현미경으로 관찰되고, δ -endotoxin(crystal)은 생성되지만 포자가 형성되지 않는 균의 집락(Spo⁻Cry⁺ 균

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, oligosporogenous mutant producing δ -endotoxin, hemolytic activity

*Corresponding author

주)을 변이주로서 분리 선별되었다.

δ-endotoxin의 분리

Cheung 등(1)의 방법에 의해 분리되었다.

단백질 정량

Lowry 등(14)의 방법에 의해 측정되었다.

LC₅₀ 측정

Reed 등(15)의 방법에 의해 측정되었으며, 모기 유충은 본 연구실에서 25°C에서 부화시켜 4일간 사육된 *Aedes aegypti*의 유충을 사용하였다.

용혈성 측정

δ-endotoxin을 0.1 N-NaOH 용액으로 27°C에서 30분간 용해시킨 후 Yu 등(16)의 방법에 의해 사람의 적혈구를 사용하여 측정되었다.

항원 및 항혈청의 조제

각 균주로부터 분리된 δ-endotoxin을 0.1 N-NaOH 용액으로 27°C에서 30분간 용해시킨 후 그 용액을 1 N-H₃PO₄로 pH 9.0이 되도록 조정하여 항원으로 사용하였다. SPO3 변이주의 항원(단백질 농도 : 600

μg/ml) 1 ml와 야생주의 항원(단백질 농도 : 650 μg/ml) 1 ml를 각각 complete adjuvant (Sigma Chemical Co.) 1 ml와 혼합하여 토끼에 피하주사시켰다. 일주일 후 동량의 항원 1 ml에 incomplete adjuvant (Sigma Chemical Co.) 1 ml씩을 혼합하여 2차접종을 행하였다. 그 후 일주일부터 3일간격으로 항원만을 4회 주사하였으며, 최종 주사한 일주일 후에 혈액을 채취하여 혈청을 원심채취하고 56°C에서 30분간 비동화시켜서 -20°C에 보관하면서 δ-endotoxin에 대한 항혈청으로 사용하였다. 이때 사용된 총 항원량은 야생균주에는 5.9 mg 이었고, SPO3 변이주에서는 4.8 mg 이었다.

면역확산시험

Smith 등(17)이 기술한 방법에 따라 0.01% Na₂S₂O₃가 함유된 saline이 함유된 인산완충액(pH 7.5)에 녹인 0.9% agarose 상에서 행하였으며, 4°C에서 24시간 후에 형성된 침강선을 관찰하였다.

면역전기영동

Johnson 등(18)이 기술한 방법에 따라 0.1% Na₂S₂O₃가 함유된 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.6)에 1% agarose를 용해시켜서 1.5 mA/cm의 전압으로

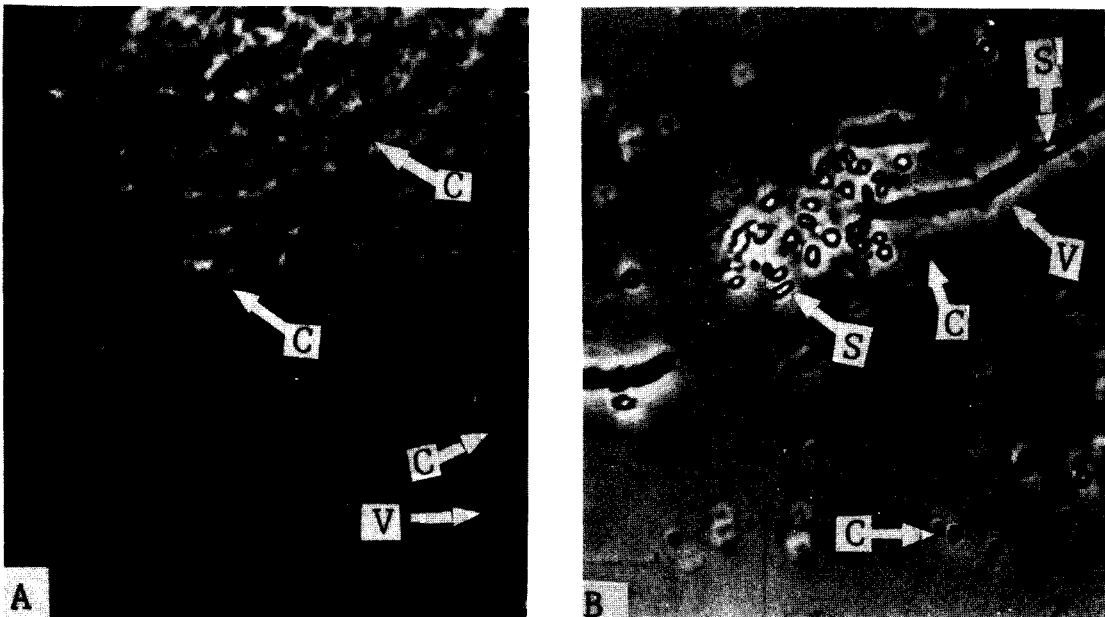


Fig. 1. Morphology of oligosporogenous (Spo-Cry⁺) mutant (A) and wild type (B) on phase contrast microscope. Symbols; S: spore, C: δ-endotoxin, V: vegetative cell.

Table 1. Hemolytic activity and LC₅₀ of δ -endotoxin.

Strains	Hemolytic activity (μ g/ml)	LC ₅₀ (μ g/ml)
Wild type	5.1	0.026
SPO 1	450	1.40
SPO 3	135	0.59
SPO 4	587.5	none toxicity
SPO 9	225	none toxicity
SPO 13	75	0.63
SPO 19	195	none toxicity

The 4-day-old larvae of *Aedes aegypti* were used for determination of LC₅₀, and the titer was expressed as the lowest protein concentration showing 100% lysis of human red blood cells for hemolytic activity.

항원을 전기영동시켰다.

δ -endotoxin의 전기영동

Laemmli 등(19)의 방법에 따라 15% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동시켰다.

결과 및 고찰

변이주의 분리 및 LC₅₀ 측정

Bti 균주를 Ward 등(8)의 방법에 따라 열처리시켜 무포자이며 δ -endotoxin을 생성하는 Spo⁻Cry⁺ 변이주를 위상차현미경으로 조사하였다(Fig.1). 그 결과 대부분 무포자 변이주의 집락은 적어도 배양 3일 이후부터 투명한 특징적인 집락으로 나타났으며, Johnson 등(20)도 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)를 사용하여 Spo⁻Cry⁺ 변이주를 분리한 결과 동일한 특징적인 집락을 보고한 바 있다. Ward 등(8)은 Spo⁻Cry⁺ 변이주의 분리에 대해

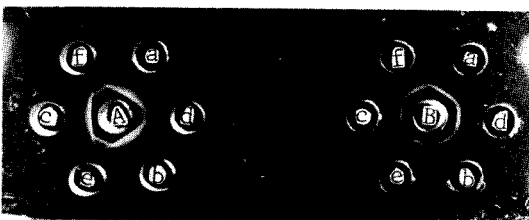


Fig. 2. Immunodiffusion patterns of δ -endotoxin. The center wells contained undiluted antisera against δ -endotoxin of wild type(A) and SPO 3 mutant(B), respectively. The wells surrounding the antiserum contained δ -endotoxin of wild type [(a), (b), (c)] and SPO 3 mutant [(d), (e), (f)].

언급하지 않았으나, 본인이 검토해 본 바에 의하면 Ward 등의 방법(8)이 Johnson 등의 방법(20)과 마찬가지로 Spo⁻Cry⁺ 변이주의 분리가 용이하였다. 또한 분리된 Spo⁻Cry⁺ 변이주(SPO 균주)들로부터 생성된 δ -endotoxin의 LC₅₀ 및 그 용혈성은 야생균주의 것에 비해 많이 저하되었다(Table 1).

면역확산반응 및 면역전기영동

야생주와 Spo⁻Cry⁺ 변이주 중 가장 강한 독성을 나타내는 SPO3 변이주의 δ -endotoxin 사이의 면역학적인 차이를 조사하였다. 면역확산반응에서 SPO3 변이주의 항원은 야생주의 항원과 완전히 융합하는 침강선만이 존재하였으나, 야생주의 항원에는 SPO3 변이주의 항원에 존재하지 않는 침강선이 인정되었다(Fig.2). 또한 면역전기영동에서 야생주에서는 3개의 명료한 침강선이 형성되었으나, SPO3 변이주에서는 단지 2개의 침강선만이 형성되었다(Fig.3). 이는 Bti 균주의 δ -endotoxin 내에는 135 KDa, 70 KDa 및 28 KDa의 단백질이 서로 면역학적으로 차이가 있다는 보고(21)와 유사한 현상으로서 SPO3 변이주의 δ -endotoxin 내에는 명확히 항원성이 다른 하나의 단백질의 소실이 인정되었다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

야생주와 SPO3 변이주의 δ -endotoxin 내의 단백질 양상을 조사하였다. 야생주의 δ -endotoxin에는 28 KDa 단백질이 존재하였으나, SPO3 변이주의 것에는 존재하지 않았다(Fig.4). 따라서 SPO3 변이주의 δ -endotoxin에는 28 KDa 단백질이 존재하지 않기 때문에 LC₅₀가 야생주의 δ -endotoxin에 비해 약 20배 정도 약화되었다고 생각된다. 이는 28 KDa 단백질이 용혈성을 나타내며 68 KDa 단백질은 모기유



Fig. 3. Immunoelectrophoresis patterns of δ -endotoxin.

The wells contained δ -endotoxin of wild type(a) and SPO 3 mutant (b), respectively. The troughs contained undiluted antisera against δ -endotoxin of wild type (A) and SPO3 mutant (B). The arrow was indicated that the another precipitation line appeared on the reaction of δ -endotoxin of wild and its antiserum.

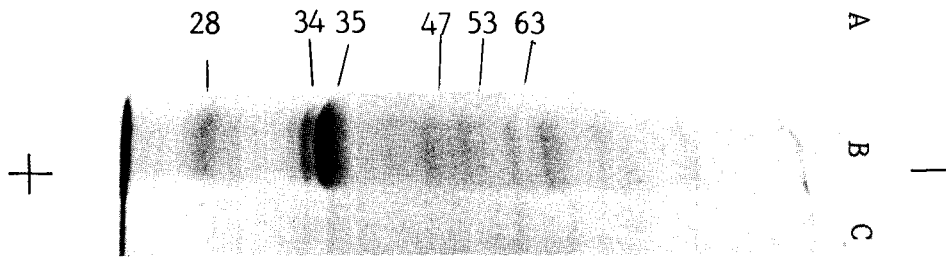


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of δ -endotoxin.

Molecular weight of protein was calculated by products of Sigma Chemical Co. (Lysozyme, egg white; MW 14,300, Trypsinogen, bovine milk; MW 24,000, Pepsin, porcine stomach mucosa; MW 34,700. Albumin, egg; MW 45,000, Albumin, bovine plasma; MW 66,000). Symbols: A; molecular weight of protein (kDa), B; wild type, C; SPO 3 mutant.

층에 독성을 나타내는 주단백질(22, 23)이지만, 이들 단백질은 혼용하면 각각의 단백질을 사용한 경우보다 그 독성이 훨씬 강하였다는 보고(5, 11)와 유사한 결과로 생각된다.

요 약

Bti 균주를 배양하여 포자와 δ -endotoxin의 복합물을 직접 field에 적용시키면 미생물 생태계에 변화를 초래할 가능성이 있으며, 배양 후 포자로부터 δ -endotoxin만을 분리할 경우에는 대량생산을 위한 기술적인 어려움이 있다. 또한 δ -endotoxin은 용혈성 단백질을 함유하고 있어 Bti 균주로부터 무포자이며 δ -endotoxin을 생산하는 변이주의 분리과 아울러 δ -endotoxin의 용혈성 인자의 제거 또는 약화를 시도하였다. 그 결과 Bti 균주를 열처리시켜 SPO3 (Spo-Cry⁺) 변이주를 분리 선별하고, 그 δ -endotoxin의 모기유충에 대한 LC₅₀ 및 용혈성을 조사해 본 결과 LC₅₀는 약 20배, 용혈성은 약 25배 정도 야생주의 δ -endotoxin에 비해 약화되었다. 이는 변이주의 δ -endotoxin 내에 28 kDa 단백질의 소실에 기인된 것이라 생각되며, 이는 면역확산반응과 면역전기영동 및 SDS-PAGE에 의해 확인되었다.

참고문헌

- Cheung, P.Y., and Hammock: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 984 (1985).
- Stockdale, H.: *Microbial Insecticides*. In M.Y. Murray (ed.), *Comprehensive Biotechnology*. Vol. 3, Pergamon Press, 949 (1985).
- Schnel, D.J. and K.W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1691 (1983).
- Hurley, J.M., S.G. Lee, R.E. Andrews, Jr., M.J. Klownen and L.A. Bulla, Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **126**, 961 (1985).
- Hurley, J.M., L.A. Bulla, Jr. and R.E. Andrews, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1316 (1987).
- Thomas, W.E. and D.J. Ellar: *J. Cell Sci.*, **60**, 181 (1983).
- Pfannenstiel, M.A., G.A. Couche., G. Muthukumar and K.W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1196 (1985).
- Ward, E.S. and D.J. Ella: *FEBS Lett.*, **158**, 45 (1983).
- Gonzalez, J.M. and B.C. Carlton: *Plasmid*, **11**, 28 (1983).
- Sekar, V. and B.C. Carlton: *Gene*, **33**, 151 (1985).
- Bourgouin, C., A. Klier and G. Rapoport: *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 390 (1986).
- Aronson, A.I., W. Beckman and P. Dunn: *Microbiol. Rev.*, **50**, 1 (1986).
- Hwang, J.Y. and K.H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 425 (1987).
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- Reed, L.J. and H. Muench: *Am. J. Hyg.*, **27**, 493 (1938).
- Yu, Y.M., M. Ohba and K. Aizawa: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**, 459 (1987).
- Smith, A. and J. Ulrich: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 586 (1983).
- Johnstone, A. and R. Thorpe: *Immunochemistry in Practice* (2nd ed.), Blackwell Scientific Pub., Oxford, London, 139 (1987).
- Laemmli, U.K. and M. Favre: *J. Mol. Biol.*, **80**, 575 (1973).
- Johnson, D.E. D.M. Niezgodski and G.M. Twaddle: *Can. J. Microbiol.*, **26**, 486 (1980).
- Pfannenstiel, M.A., G.A. Couche, E.J. Ross and K.W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 644 (1985).
- Wu, D. and F.N. Chang: *FEBS Lett.*, **190**, 232 (1985).
- Ibarra, J.E. and B.A. Federici: *J. Bacteriol.*, **165**, 527 (1986).

(Received March 6, 1989)