

Double-stranded RNA 발현 세균의 동결건조 제형화와 적용 대상 해충 선택성

김은성 · 김용균*
안동대학교 생명자원과학과

A Freeze-drying Formulation and Target Specificity of Double-stranded RNA-expressing Bacteria to Control Insect Pests

Eunseong Kim and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 36720, Korea

ABSTRACT: Double-stranded RNA (dsRNA) has been applied to control insect pests by its suppressive activity against specific target genes. Integrin is a heterodimer (α and β) transmembrane protein and plays a critical role in cell-to-cell or cell-to-extracellular matrix interactions in eukaryotes. Suppression of β subunit integrin gene expression by its specific dsRNA (= dsINT) induces significant mortality against target insects. Furthermore, a recombinant bacterium expressing dsINT is potent to kill target insects. However, it is necessary to develop a formulation technique of the dsRNA-expressing bacteria to apply the bacterial insecticide against field populations. This study formulated the recombinant bacteria by freeze-drying and tested its control efficacy against target insects. The formulation maintained significant insecticidal activity against last instar larvae of *Spodoptera exigua*. While a commercial *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticide exhibited only about 60% insecticidal activity against *S. exigua* last instar, an addition of the dsINT-expressing bacterial formulation significantly enhanced the Bt insecticidal activity. The dsINT-expressing bacterial formulation exhibited relative selectivity to target insects depending on sequence similarity. These results indicate that a freeze-dried form of dsRNA-expressing bacteria keeps its insecticidal activity.

Key words: dsRNA, insecticide, *Spodoptera exigua*, recombinant bacteria

조 록: 이중가닥 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)는 표적 유전자의 발현을 억제하는 기능으로 해충방제에 응용되었다. 인테그린은 α 와 β 단위체로 구성된 이량체 막 단백질이다. 진핵생명체에서 인테그린은 세포-세포 및 세포-세포외기질의 상호연결에 중요한 역할을 담당한다. 인테그린 β 단위체 발현을 억제하는 특정한 dsRNA (= dsINT)는 해당 곤충에 뚜렷한 치사효과를 유발한다. 또한, dsINT를 발현시키는 형질전환된 대장균도 해당 곤충에 뚜렷한 살충력을 가진다. 그러나 이 세균 살충제의 야외 적용을 위해서는 제형화 기술이 필요했다. 본 연구는 dsINT를 발현하는 재조합 세균을 동결 건조시켜 대상 곤충에 대해 살충효능을 검증하였다. 동결 건조된 세균은 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 종령 유충에 높은 섭식독을 일으켰다. 파밤나방에 대해서 *Bacillus thuringiensis* 상용 살충제 처리는 불과 60%의 살충력을 보이는 반면, 동결 건조된 dsINT 발현 세균과 혼합 처리할 때 살충력은 크게 증가하였다. dsINT 발현 세균은 해당 인테그린 염기서열 유사성에 따라 차이를 보이는 해충 종에 선택적 독성을 나타냈다. 이 결과는 인테그린에 특이적 dsRNA를 발현하는 세균이 동결 건조 제형화 조건하에서도 살충력을 유지한다는 것을 나타냈다.

검색어: 이중가닥 RNA, 살충제, 파밤나방, 재조합 세균

유전자 발현 조절 양식은 원핵생명체와 진핵생명체 사이에

큰 차이를 보인다. 원핵생명체는 전사와 번역이 같은 공간에서 거의 동시에 이루어지며 전사 조절에 의해 전체적 유전자 발현을 조절하는 반면, 곤충을 포함한 진핵생명체는 전사는 핵내에서 번역은 세포질 내에서 이루어지기에 두 단계 모두에서 유전

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received February 1 2016; Revised February 27 2016

Accepted March 10 2016

자 발현 조절이 가능하다. 특히 진핵생명체의 mRNA는 전사후 과정을 통해 비교적 오랜 시간 안정적으로 단백질 번역에 주형으로 이용되게 된다. 따라서 진핵생명체의 mRNA의 수명조절은 전체적 유전자 발현량을 결정하는데 중요하다. RNA 간섭(RNA interference: RNAi)은 20-25개 뉴클레오타이드로 구성된 RNA 조각이 RNA-induced silencing complex (RISC)를 형성하면서 대상 mRNA의 절편화 또는 단백질 번역 억제를 유도하는 세포내 기작이다(Macrae et al., 2006). RNAi는 세포내에서는 microRNA 또는 piwiRNA에 의해 유발되지만, 외부의 double-stranded RNA (dsRNA)가 세포내로 들어가서 유발될 수도 있다(Fire et al., 1998). 이를 환경 RNAi라 부르며 해충방제기술에 이용되고 있다(Scott et al., 2013; Kim et al., 2015b).

인테그린(integrin: INT)은 세포막에 존재하는 막 단백질이다(Hughes, 2001). 두 단위체(α 와 β)로 구성되는 이량체 단백질이며 다른 세포막에 존재하는 단백질 또는 세포외기질(extracellular matrix: ECM) 단백질과 결합하여 세포-세포 또는 세포-ECM 연결을 증대하게 된다(Hynes and Zhao, 2000). 따라서 이 단백질 발현 교란은 다양한 세포 작용을 억제하며 생명현상에 위협을 주게 된다. Surakasi et al. (2011)은 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 INT β 단위체 유전자를 동정하고, RNAi 기술에 의해 이 유전자의 발현을 억제할 경우 혈구세포의 세포성 면역 반응을 뚜렷이 저하시켰다. 유사하게 배추좀나방(*Plutella xylostella*)과 담배나방(*Helicoverpa assulta*)에서도 INT β 단위체 유전자가 동정되었으며, 이들 유전자에 대한 dsRNA 처리는 유충의 생존력을 크게 제한시켰다(Mohamed and Kim, 2011; Park et al., 2014).

Kim et al. (2015a)은 파밤나방 INT에 특이적인 dsRNA (= dsINT)를 대장균(*Escherichia coli*)에 형질전환하여 세균 내에서 대량으로 발현시키는 기술을 개발하였다. 이 형질전환된 대장균은 파밤나방 유충에 대해서 섭식독을 유발하였다. 또한 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 Cry1Ca 독소 단백질을 발현하는 세균과 혼합할 경우 살충력이 증가되는 것을 관찰하였다(Kim et al., 2015a). 그러나 이 재조합 세균의 제형화 및 상용 Bt제와의 혼용성에 대해서는 분석되지 않았다.

본 연구는 dsINT를 발현하는 대장균을 동결건조 기술로 제형화하였다. 이 제형화된 재조합 대장균을 대상으로 살충력을 검증하였다. 또한 이 제형화된 대장균과 상용 Bt 살충제와의 혼용에 따른 살충력 제고효과를 분석하였다. 아울러 이 세균 복합체의 타 곤충에 대한 살충력을 분석하여 이들 곤충의 INT 유전자 서열 상동성과 비교하여 차등 살충력을 설명하였다.

재료 및 방법

곤충 사육

본 실험에 사용된 모든 곤충은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16:8 (L:D) h, 상대습도 $60 \pm 5\%$ 사육실에서 누대 사육하였다. 파밤나방 유충의 경우 인공사료로 사육하였고(Goh et al., 1990), 성충은 10% 설탕물을 먹이로 제공하였다. 배추좀나방은 안동시 송천동에 소재한 배추포장에서 채집한 유충을 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 사용하였다. 유충은 배추를 먹이로 사육하였고, 성충은 10% 설탕물을 먹이로 공급하고 배추잎을 이용하여 산란을 유도하였다. 담배나방의 유충은 인공사료로 사육하였고(Ahn et al., 2011), 성충은 10% 설탕물을 먹이로 제공하였다.

dsRNA 제조 및 재조합 세균

dsINT를 발현하는 재조합 대장균을 Kim et al. (2015a)의 방법으로 제조하였다. 간략하게, integrin β 단위체의 세포외 영역에서 dsRNA에 대응하는 단편(SeINT)이 PCR.2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 재조합되었고 다시 Xba I 및 Hind III로 잘라 L4440 벡터에 존재하는 두 개의 T7 프로모터 사이에 삽입하였다. 재조합 벡터 L4440-SeINT는 RNase III가 결합된 대장균 HT115에 형질전환되었다. T7 RNA 중합효소는 isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) 첨가에 의해 유도 발현되었다.

dsRNA 추출 및 정량화

재조합 세균에서 생성된 dsRNA는 RNase Mini-Kit (Qiagen Korea, Seoul, Korea)을 사용하여 추출하였다. 추출된 dsRNA는 1% 아가로오스 겔 상에서 분리하고, etidium bromide 용액으로 염색하였다. 시험관내 전사방법(Surakasi et al., 2011)에 의해 합성된 dsRNA 양을 기준 Image Analyzer (Bio-Rad Korea, Seoul, Korea)로 밴드 강도와 비교하여 표준방정식을 얻었다. 이 방정식을 기준으로 재조합 세균에서 생성된 dsRNA의 양을 산출하였다. 정량 분석은 각 처리 당 3 개의 독립적으로 추출된 시료를 토대로 반복 측정하였다.

RT-PCR를 이용한 파밤나방 INT 발현 분석

총 RNA는 Trizol (Invitrogen) 시약 제조사의 지시에 따라

추출하였다. RNA 추출(반응 당 1 µg)은 3 분 동안 72°C에서 분리한 후 RT-PREMIK (Intronbio, Seoul, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA는 파밤나방 INT에 특이적인 정방향 프라이머(5'-TCTAGACAGCTTGCCAGTGTGAAAG-3')와 역방향 프라이머(5'-AAGCTTCCGTTCTTCTGTGCTCTAAT-3')로 증폭시켰다. PCR은 5 분 동안 94°C에서 초기 변성 후 35 회 반복하였다. 각 주기는 30 초 동안 94°C에서 변성시키고, 이후 30 초 동안 50°C에서 프라이머 재결합을 유도하고, 30 초 동안 72°C에서 사슬연장이 이뤄지게 구성하였다. 이후 PCR 반응은 10 분 동안 72°C에서 사슬 추가 연장 과정으로 종료시켰으며, 최종 생성물은 4°C에서 보관하였다.

살충제 생물검정

dsRNA를 생산하기 위해 L4440-SeINT로 형질전환된 세균을 37°C에서 100 µg/mL의 ampicillin을 함유하는 Luria-Bertani (LB) 배지에서 진탕하면서 16 시간 동안 배양시켰다. 배양액(5 mL)을 LB 배지 500 mL에 첨가하고 OD₆₀₀ = 0.6까지 배양시켰다. T7 RNA polymerase 유전자의 발현은 0.1 mM IPTG 첨가에 의해 유도하였고 IPTG가 처리된 세균은 다시 37°C에서 4 시간 동안 진탕 배양하였다. 만들어진 세균 배양액은 생물 검정을 위해 원심 분리로 침전시키고 동일한 배지에서 100 배로 희석시킨 후 초음파 처리를 하였다. 그 후 인테그린 세균을 동결 건조시켰다. 동결건조기(MCFD5510, IIShinBioBase, Seoul, Korea)를 이용하여 동결 온도는 -40°C 이하 그리고 진공 조건은 5×10⁻³ kPa을 유지하며 3 일간 진행하였다. 동결 건조된 dsINT 발현 세균은 0-2,000 ppm의 농도 별로 제조한 후 엽침지법으로 살충력을 분석하였다.

사용된 엽침지법은 배추 잎(3×3 cm)을 재조합 세균 현탁액에 1 분간 침지시키고, 이후 여과지 위에서 10 분간 건조시켜 사용하였다. 검정에 사용된 파밤나방 5령충은 처리 전 6 시간 동안 절식시켜 처리 후 섭식을 촉발시켰다. 처리구당 10 마리씩 3 반복으로 실시되었고, 생존 개체수는 24 시간을 주기로 7 일 동안 관찰하였다. 본 연구에 사용된 상용 비티 살충제는 토박이[®] (Dongbu Farm Hannong, Seoul, Korea)를 사용하였다. 토박이 역시 0-2,000 ppm의 농도 별로 희석한 후 상기의 방법으로 처리하였다.

인테그린 유전자 서열 비교

NCBI/GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 BLAST program을 이용하여 염기서열 정보를 얻은 후 계통분류학적

유연관계를 분석하였다. 각 염기서열의 상동성은 DNASTAR program (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 MegAlign의 Clustal W 알고리즘으로 정렬하였다.

통계분석

모든 살충효과에 대한 생물검정 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS 프로그램의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 하였다.

결과

dsINT 발현 세균 제형화

파밤나방 인테그린 β 단위체의 410 bp 영역이 증폭되어 L4440 벡터에 클로닝 되었다(Fig. 1A). 재조합 벡터를 RNase III 유전자가 없는 HT115 대장균에 형질전환되었으며, dsINT를 발현하였다. dsINT 발현량은 동결 건조된 세균(Fig. 1B)의 질량에 따라 비례하였다(Fig. 1C).

제형화된 dsINT 발현 세균의 살충력

파밤나방 5령 유충을 대상으로 제형화된 dsINT 발현 대장균을 섭식 처리 하였다(Fig. 2). 처리된 세균의 농도 증가에 따라 살충력은 증가하였다. 분석 농도 가운데 2,000 ppm은 최고 높은 처리 농도로서 이 이상의 처리는 대장균의 용해도 한계에 이르러 불가능했다. 따라서 이후의 처리는 비교적 안정적으로 현탁액을 만들 수 있는 1,000 ppm 농도를 이용하였다. dsINT 발현 세균의 농도가 높아짐에 따라 파밤나방 INT 유전자의 발현량은 현격하게 감소하였다(Fig. 2B).

dsINT와 Bt 세균혼용과 살충력 증가

상용 Bt 제품을 이용하여 파밤나방 4, 5령충에 대한 살충력을 검정하였다(Fig. 3A). Bt 농도가 증가함에 따라 살충력은 증가하였다. 4령에 비해 5령은 Bt에 대해 감수성이 낮은 것으로 나타났다. 두 유충령기 모두 최대 처리농도인 2,000 ppm에서 60% 또는 이하의 살충력을 나타냈다.

Bt제를 1,000 ppm 으로 고정하고, dsINT 발현 세균의 농도를 증가하면서 살충력 증가 효과를 분석했다(Fig. 3B). dsINT 발현 세균의 농도가 증가할수록 Bt의 살충력은 증가하였다. 두 세균 모두 1,000 ppm 처리에서 파밤나방 4, 5령의 방제효과는

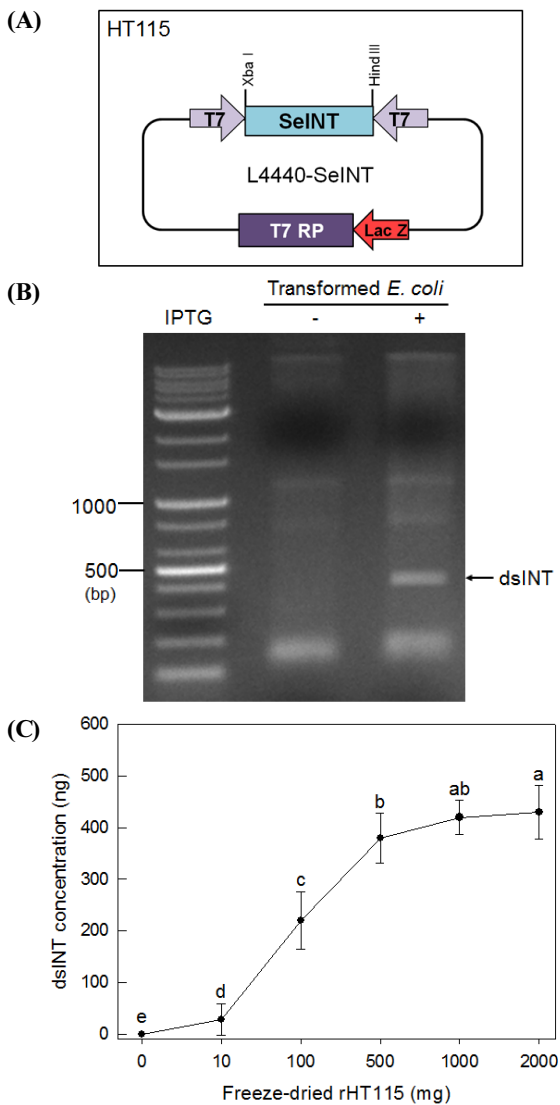


Fig. 1. Construction and formulation of dsINT-expressing *E. coli*. (A) Transformed HT115 strain (rHT115) of *E. coli* with recombinant L4440 vector containing dsINT. T7 RNA polymerase (T7 pol) is expressed under Lactose operon (Lac Z) by addition of IPTG inducer. The T7 RNA polymerase recognizes its own promoter (T7) and transcribes *S. exigua* β integrin gene in both directions to form dsRNA. (B) Freeze-dried *E. coli* expressing dsINT. (C) A linear relationship between rHT115 weight and dsINT amount. dsINT amount between rHT115 weight and dsINT amount. dsINT amount was estimated from RNA gel by an image densitometer (Image analyzer, Bio-rad Korea, Seoul, Korea).

75-78%를 나타냈다.

dsINT 발현 세균의 살충력 특이성

인테그린은 모든 다세포 생명체가 가지고 있고, 유전자의 상동성이 비교적 높다. 이는 이 살충제가 타 동물에 대해 독성을

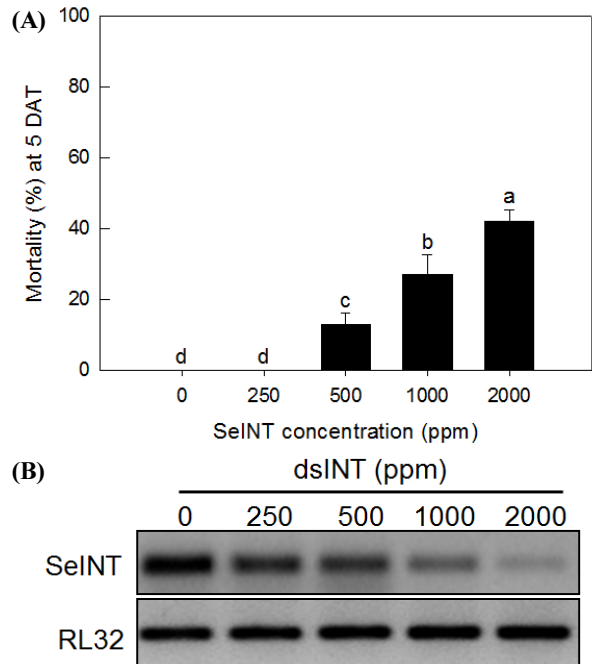


Fig. 2. Insecticidal activity of dsINT expressing *E. coli*. (A) Leaf-disc assay against 5th instar larvae of *S. exigua*. Each dose treated 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 5 day after treatment (DAT). Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). (B) Reduction of SeINT expression by oral treatment of dsINT to the larvae. RL32 expression was monitored to represent nontarget expression.

유발시킬 수 있다. 이러한 가설을 검증하기 위해 유사한 나비목 해충에 대해 파밤나방 dsINT의 살충력 차등1성을 분석하였다 (Fig. 4). 파밤나방, 배추좀나방, 담배나방의 인테그린 β 단위체 염기서열을 비교한 결과(Fig. 4A) 거의 모든 영역에서 동일한 서열을 지니고 있음을 확인하였다. 이들의 염기서열 상동성을 비교한 결과(Fig. 4B) 71.5-83.1%의 유사성을 보였다. dsINT 발현 세균의 단독처리는 파밤나방을 제외하고 매우 낮은 살충력을 나타냈다(Fig. 4C). 그러나 Bt 살충제에 대해서는 오히려 담배나방이 감수성이 높고 파밤나방과 배추좀나방은 낮았다 (Fig. 4D). dsINT 발현 세균과 Bt를 혼합한 결과 파밤나방에서는 두 세균의 상승효과를 현격하게 보인 반면, 담배나방에서는 이러한 상승효과가 나타나지 않았고, 배추좀나방의 경우 유의성이 있는 차이를 보였으나 파밤나방과 같은 큰 차이를 나타내지 못했다.

고찰

전사 후 형성된 mRNA의 수명을 조절하기 위한 방편으로 RNA 간섭 현상은 진핵생물체의 유전자 발현 조절 가운데 하나

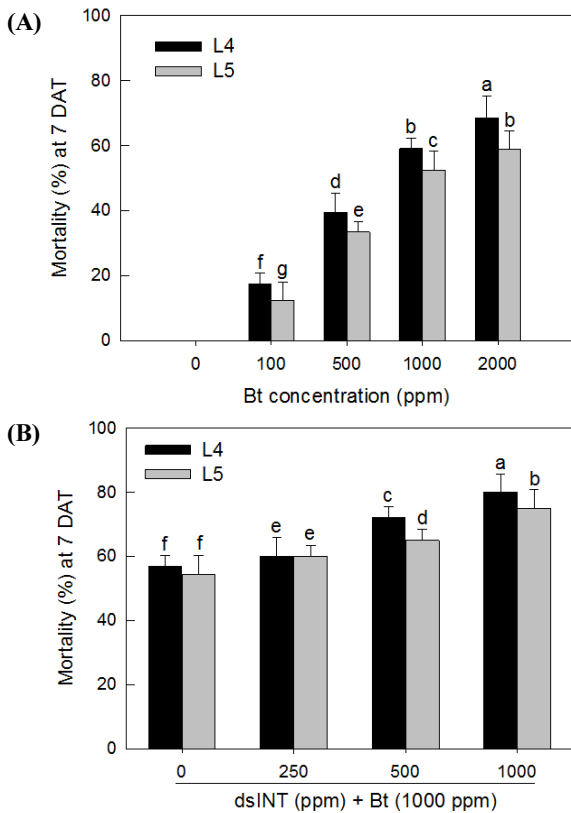


Fig. 3. Enhancement of Bt toxicity by addition of dsINT-expressing bacteria. (A) Toxicity of Bt alone against 4th (L4) and 5th (L5) instar larvae of *S. exigua*. (B) Toxicity of Bt (1,000 ppm) mixed with different dsINT-expressing bacterial amounts. Each dose at leaf-disc assay treated 10 larvae and was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

의 생체 과정이다(Fire et al., 1998). 대상 유전자의 mRNA에 상보적 RNA 조각이 이중나선형 RNA를 형성하면서 이를 제거하려는 RISC가 결합하여 대상 mRNA의 절단을 이뤄 수명을 단축하게 하거나 단백질 번역 기구의 작동을 억제하여 mRNA에서 단백질로의 유전자 발현 과정을 억제하게 한다. 또한 RNA 바이러스나 전이인자들의 침입에 대해서 RNA 간섭 현상은 생체 방어적 기구로도 작용할 수 있다(Fire, 2005; Fabelt, 2014). 본 연구는 RNA 간섭 현상을 해충방제에 응용하려 시도되었다. 특별히 파밤나방 인테그린 β 단위체 유전자에 특이적 상보성을 지니는 dsRNA가 살충성을 지니고(Surakasi et al., 2011), 이를 발현시키는 재조합 대장균도 살충력을 유지한다(Kim et al., 2015a)는 사실에 기초하여 본 연구를 수행하였다. 특히 본 연구에서는 이 재조합 세균을 동결건조 조건에서 살충력이 유지되고, 유사한 나비목 해충에 대해서 선택성을 갖는다는 사실을 발견하게 되었다.

dsRNA를 발현하는 재조합 대장균을 제작하였고, 동결 건조

한 조건에서 dsRNA는 대장균의 밀도에 비례하여 존재하였다. dsRNA는 파밤나방 인테그린 β 단위체의 3' 말단 쪽에서 디자 인되었다(Surakasi et al., 2011). 이 dsRNA 영역의 PCR 생성물을 L4440 벡터에 재조합하였다. 이 벡터의 클로닝 부위는 양쪽 말단에 T7 RNase 프로모터를 지니고 있다. 또한 이 벡터는 Lac 프로모터에 T7 RNA 중합효소 유전자를 갖고 있어, IPTG의 유전자 발현 유도체에 의해 T7 RNA 중합효소가 발현되고, 이에 따라 dsRNA 양쪽 말단에 형성된 T7 프로모터를 인식하고 양방향에서 전사를 유도하면서 dsRNA를 형성하게 된다. 이 재조합 벡터를 RNase III가 결합된 HT114 대장균 세포를 형질전환시키는 데 이용되게 한다. 이 형질전환된 대장균은 인테그린 유전자에 특이적 dsRNA를 발현시켰으며, 이 대장균을 동결 건조하였을 경우에도 dsRNA 양이 유지되었다. 특별히 형성된 dsRNA 양은 동결 건조된 세균의 질량에 비례하여 나타나 dsRNA 세균 살충제의 산업화가 이뤄질 경우에 품질 검사의 지표로 이용되게 할 수 있다.

동결 건조된 dsRNA 발현 대장균을 섭식 처리하여 파밤나방의 치사효과를 유발시켰다. 이러한 치사효과는 세균이 장내에서 분해되어 발현한 dsRNA가 장내로 분비되었을 것이고, 이 dsRNA가 중장세포 또는 혈강으로 침입하여 표적세포의 세포질에서 인테그린 β 단위체의 전사체에 결합하여 발현을 억제하여 나타나는 결과로 추정해볼 수 있다. 실제로 dsRNA 세균을 섭식한 곤충은 인테그린 β 단위체의 전사체 함량이 줄었다. 그리고 이러한 RNA 간섭 현상은 비교적 중 특이적으로 나타나, 유사한 나비목 곤충인 담배나방과 배추좀나방에서는 치사효과가 낮았는데 이러한 이유는 이들 사이에 인테그린 β 유전자의 상동성의 차이와 관련을 가질 수 있다. Kim et al. (2015a)은 이 인테그린 전사체의 RNA 간섭 효과가 한 층을 이루는 중장세포에 영향을 주어 세포 사이의 간격을 넓히고, 크기 성장에서도 크게 왜소한 모습을 관찰하였다. 중장에서 곤충은 소화와 흡수를 수행하기에 이 중장세포의 기형은 파밤나방의 발육에 영향을 주어 발육 지연 및 치사에 이르게 할 수 있다. 또한 중장세포는 한 층으로 이뤄지기에 이 세포들의 붕괴는 중장 내에 존재하는 다양한 세균들이 혈강으로 침입할 수 있는 기회를 얻게 되어 패혈증을 유발하여 치사를 일으킬 수 있다. dsRNA 세균을 처리하고 치사된 개체들이 체색이 검게 변하는 이유가 이러한 패혈증과 관계가 있을 것으로 추정된다. 여기서 dsRNA의 이동 경로에 대해서 고찰해 볼 필요가 있다. 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)의 경우 세포내로 dsRNA의 이동은 막통로 단백질인 SID-1을 이용하게 된다(Shih and Hunter, 2011). 파밤나방의 전사체를 살펴보면 SID 유사 유전자의 발현을 찾게 된다(Huvenne and Smagghe, 2010). 따라서 중장 내

류인 *Bactrocera dorsalis* (Li et al., 2011) 그리고 여러 나비목 곤충류인 *Epiphyas postvittana* (Turner et al., 2006), 배추좀나방(Bautista et al., 2009), *S. frugiperda* (Griebler et al., 2008) 및 파밤나방(Tian et al., 2009)을 포함하고 있다. 따라서 dsRNA를 이용한 해충방제의 가능성은 다양한 곤충으로 확대가 가능할 것으로 본다.

그러나 이러한 RNA 간섭 효과에도 불구하고 최대 처리 농도에서도 살충력은 40% 이상을 나타내지 못하였다. 이러한 낮은 살충력은 RNA 간섭 효과가 낮아서라기보다는 인테그린 단백질의 복잡성에서 기인될 수 있다. 인테그린은 α 와 β 의 두 단위체가 결합하여 형성되는 이량체 단백질이다(Hynes, 2002; Humphries et al., 2004). 이 인테그린은 세포-세포 또는 세포-세포외기질을 연결하여 세포내골격의 재구성 및 다양한 세포 내 신호전달을 증대하게 된다(Burridge et al., 1988; Loftus et al., 1994). 두 단위체의 조합적 결합에 의해 다양한 세포외기질과의 특이적 결합을 이루게 되는 데 포유동물의 경우 18개의 α 단위체와 8개의 β 단위체의 조합에 의해 최소 24개의 기능적 이량체 인테그린을 형성하게 된다(van der Flier and Sonnenberg, 2001). 반면에 초파리 인테그린은 5개의 α 단위체($\alpha 1-5$)와 2개의 β 단위체($\beta PS, \beta v$)를 갖으며 배자발육, 근육 수축, 소화관 형성 및 세포외기질 연결 등의 다양한 생리적 기능을 수행한다(Hynes and Zhao, 2000; Brower, 2003). 두 종류의 나비목 곤충(*Pseudoplusia includens*, *Manduca sexta*)에서 인테그린은 최소 3개의 α 단위체와 1개의 β 단위체가 혈구세포에서 발현되어 세포성 면역반응에 관하여 한다고 보고하였다(Lavine and Strand, 2003; Zhuang et al., 2008). *M. sexta* 인테그린은 다른 세포의 neuroglian과 tetraspanin 막 단백질을 인식하여 혈구세포의 피낭형성 면역과정에 관여한다고 보고하였다(Zhuang et al., 2007a,b). 초파리 또는 과실파리의 경우에서도 인테그린은 혈구세포의 피낭형성 및 식균작용에 관여하는 것으로 보고되었다(Irving et al., 2005; Mamali et al., 2009). 따라서 단위체들의 조합에 의해서 기능적 인테그린을 형성하기에 하나의 인테그린 β 단위체의 발현억제는 유사한 다른 β 단위체에 의해 보상이 가능할 수 있다고 사료된다. 따라서 이러한 보상적 치환은 본 연구에서 관찰된 낮은 살충력을 해석할 수 있다. 따라서 높은 살충력을 기대하기 위해서는 다양한 증장 발현 유전체를 대상으로 스크리닝하여 최적의 dsRNA 농약을 개발하게 할 수 있을 것으로 기대한다.

비록 낮은 살충력을 보인 dsRNA 재조합 세균의 경우 기존의 Bt 살충제의 효과를 높여주었다. 파밤나방은 Bt를 포함한 다양한 살충제에 대해서 내성을 보이고 있다. 특히 종령 유충으로 발육하면 이러한 살충제 감수성 저하는 뚜렷하여 진다(Kim et

al., 1998). 본 연구에서도 높은 농도의 Bt 살충제를 처리한 경우에도 60% 이상의 실내 살충력을 나타내지 못하였다. 이를 극복하기 위해 dsRNA 재조합 세균을 함께 처리한 결과 살충력이 크게 증가하였다. 이러한 이유는 dsRNA에 의한 인테그린 유전자 발현 억제와 관련성이 있는 것으로 해석된다. 즉, 인테그린 β 단위체의 발현 억제로 기능적 인테그린 형성이 둔화되기에 증장의 세포-세포 및 세포-세포외기질 증가가 어려워져서 소화관의 발육 및 기능 둔화로 이뤄졌고, 이는 Bt 살충제 처리에 따라 증장세포의 방어 기능 또한 억제하였을 것으로 추정된다. 즉, Bt 살충제의 주요 성분인 Cry 독소단백질은 증장막 수용체인 캐드헤린 단백질에 부착되고(Park and Kim, 2013), 이를 통해 활성화된 Cry 독소단백질은 올리고머를 이루면서 증장막에 구멍을 뚫는 독성작용을 발휘하게 된다(Bravo et al., 2011). 이때 곤충의 증장세포에서 mitogen-activating protein kinase (MAPK) p38의 활성이 높아지면서 Cry 단백질에 대한 방어기작을 발휘하게 된다(Cancino-Ronezno et al., 2010). 따라서 MAPK p38의 발현을 억제하는 경우 Bt 활성이 높아지게 된다. 인테그린의 생리적 기능 가운데 하나가 외부의 환경 변화를 인식하고 세포 내 신호전달과정을 활성화하는 것으로 Cry 단백질의 영향에 인테그린의 MAPK p38 증대 가능성을 제기하여 본다. 따라서 RNA 간섭에 의해 인테그린 β 단위체의 발현 억제는 세포내 방어기작을 무력화하여 Bt 살충제의 독성을 높여주는 결과를 초래할 수 있다. 추후 인테그린과 MAPK p38 활성 조절과의 관계를 분석해 볼 필요가 있다.

이상의 결과는 곤충의 인테그린 단위체 유전자에 특이적인 dsRNA를 대장균에 발현시키는 기술을 보여 주었으며, 이러한 기술을 이용하여 새로운 dsRNA 살충제 개발이 가능하다는 것을 제시하고 있다. 특별히 본 연구에서 진행한 이 재조합 세균의 동결건조 기술은 이 dsRNA 농약의 제제화에 대한 기본 자료로 이용될 수 있다. 또한 유사한 나비목 곤충이라도 인테그린 유전자에 대한 dsRNA 살충제가 선택적이라는 것은 향후 이 유전자 살충제의 안전성을 확보하는 차원에서도 의미 있는 결과로 해석된다.

사사

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업 지원에 의해 이루어졌습니다.

Literature Cited

Ahn, S.J., Badenes-Pérez, F.R., Heckel, D.G., 2011. A host-plant

- specialist, *Helicoverpa assulta*, is more tolerant to capsaicin from *Capsicum annuum* than other noctuid species. *J. Insect Physiol.* 57, 1212-1219.
- Aroujo, R.N., Santos, A., Pinto, F.S., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H., 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophenol 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 683-693.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilangan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotech.* 25, 1322-1326.
- Bautista, M.A.M., Miyata, T., Miura, K., Tanaka, T., 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 38-46.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423-431.
- Brower, D.L., 2003. Platelets with wings: the maturation of *Drosophila* integrin biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 607-613.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C., 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 487-525.
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A., 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 58-63.
- Fablet, M., 2014. Host control of insect endogenous retroviruses: small RNA silencing and immune response. *Viruses* 6, 4447-4464
- Fire, A., 2005. Nucleic acid structure and intracellular immunity: some recent ideas from the world of RNAi. *Q. Rev. Biophys.* 38, 303-309
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Goh, H.G., Lee, S.G., Lee, B.P., Choi, K.M., Kim, J.H., 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29, 180-183.
- Griebler, M., Westerlund, S.A., Hoffmann, K.H., Meyerringe-Vos, M., 2008. RNA interference with the allatopregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *J. Insect Physiol.* 54, 997-1007.
- Hughes, A.L., 2001. Evolution of the integrin α and β protein families. *J. Mol. Evol.* 52, 63-72.
- Humphries, M.J., Travis, M.A., Clark, K., Mould, A.P., 2004. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 822-825.
- Huvenne, H., Smagghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.* 56, 227-235.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Hynes, R.O., Zhao, Q., 2000. The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.* 150, F89-F95.
- Irving, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., Meister, M., 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell. Microbiol.* 7, 335-350.
- Kim, E., Park, Y., Kim, Y., 2015a. A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin $\beta 1$ enhances Bt toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *PLoS One* 10, e0132631.
- Kim, Y., Lee, J., Kang, S., Han, S., 1998. Age variation in insecticide susceptibility and biochemical changes of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Asia Pac. Entomol.* 1, 109-113.
- Kim, Y.H., Soumaila Issa, M., Cooper, A.M., Zhu, K.Y., 2015b. RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120, 109-117.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2003. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple α and β integrin subunits. *Insect Mol. Biol.* 12, 441-452.
- Li, X., Zhang, M., Zhang, H., 2011. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS One* 6, e17788.
- Loftus, J.C., Smith, J.W., Ginsberg, M.H., 1994. Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J. Biol. Chem.* 269, 25235-25238.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., Doudna, J.A., 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- Mamali, I., Lamprou, I., Karagiannis, F., Karakantza, M., Lampropoulou, M., Marmaras, V.J., 2009. A beta integrin subunit regulates bacterial phagocytosis in medfly haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 858-866.
- Mohamed, A.A., Kim, Y., 2011. A target-specific feeding toxicity of $\beta 1$ integrin dsRNA against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 78, 216-230.
- Park, Y., Ahn, S.J., Vogel, H., Kim, Y., 2014. Integrin β subunit and its RNA interference in immune and developmental processes of the Oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*. *Dev. Comp. Immunol.* 47, 59-67.
- Park, Y., and Kim, Y., 2013. RNA interference of cadherin gene ex-

- pression in *Spodoptera exigua* reveals its significance as a specific Bt target. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 285-291
- SAS Institute, 1989. SAS/STAT User's Guide. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfired, B.D., Hunter, W.B., Smaghe, G., Zhu, K.Y., Douglas, A.E., 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59, 1212-1221.
- Shih, J.D., Hunter, C.P., 2011. SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA* 17, 1057-1065.
- Surakasi, V.P., Mohamed, A.A.M., Kim, Y. 2011. RNA interference of $\beta 1$ integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 57, 1537-1544.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q. Tang, B., Zhuang, W., 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a Non-Midgut gene. *PLoS One* 4, e6225.
- Turner, C.T., Davy, M.W., MacDiarmid, R.M., Plummer, K.M., Birch, N.P., Newcomb, R.D., 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.* 15, 383-391.
- van der Flier, A., Sonnenberg, A., 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305, 285-298.
- Wynant, N., Santos, D., Van Wielendaele, P., Vanden Broeck, J., 2014. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Mol. Biol.* 23, 320-329.
- Zhou, X.G., Wheeler, M.M., Oi, F.M., Scharf, M.E., 2008. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larva resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 38-46.
- Zhu, F., Palli, R., Ferguson, J., Palli, S.R., 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag. Sci.* 67, 175-182.
- Zhuang, S., Kelo, L., Nardi, J.B., Kanost, M.R., 2007a. An integrin-tetraspanin interaction required for cellular innate immune responses of an insect, *Manduca sexta*. *J. Biol Chem.* 282, 22563-22572.
- Zhuang, S., Kelo, L., Nardi, J.B., Kanost, M.R., 2007b. Neuroglian on hemocyte surfaces is involved in homophilic and heterophilic interactions of the innate immune system of *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1159-1167.
- Zhuang, S., Kelo, L., Nardi, J.B., Kanost, M.R., 2008. Multiple alpha subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 365-379.