

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* 균주의 Hemolysin 성질

황지연·김광현*

동의대학교 자연대학 생물학과

Characteristics of Hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Hwang, Ji Yeon, and Kwang Hyeon Kim*

Department of Biology, College of Natural Science,
Donggeui University, Pusan 601, Korea

The extra-cellular hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* was purified in the process of salting with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sephadex G-200 gel filtration, and DEAE-cellulose column chromatography. The purified hemolysin had molecular weight of approximately 47,000 dalton on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The activity of purified hemolysin on human red blood cells was increased by thiol agents, but that was inhibited by cholesterol, protease treatment, and metal salts such as CuSO_4 , and FeSO_4 , respectively.

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis*(serotype 14) 균주는 나방이 유충에는 독성을 나타내지않으나, 모기에는 아주 강한 독성을 나타내는 δ -endotoxin을 생산하는 균주(1-5)로서 생물학적 방제방법으로 모기방제에 가장 유망한 균주 중의 하나이다. 최근 연구에서 이 균주가 생산하는 δ -endotoxin을 알카리로 용해시키면 적혈구를 용해시키는 단백질 fragment가 나타난다는 보고가 있다(6-8). 그러나, 이 적혈구 용해성 단백질 fragment가 모기유충에 어떤 작용을 하는지, 또는 δ -endotoxin에 존재하는 적혈구 용해성 단백질 fragment와 독성단백질 fragment의 상호관계는 어떤지에 관해서는 전혀 알려지지 않았다.

따라서, 본인 등은 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주로부터 δ -endotoxin을 생산하는 과정에서 균체외로 분리되는 hemolysin과 δ -endotoxin의 알카리 분해에 따른 hemolysin fragment와의 상호관계를 규명하기 위한 기초조사로서 균체 외로 분리되는 hemolysin을 분리정제하여 그 성질을 조사

하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용된 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주는 일본 구주대학 Aizawa 교수로부터 분양받았다.

배지조성 및 배양방법

LB 배지(9) 및 TYG 배지, 즉 tryptone 0.5%, yeast extract 0.5%, glucose 0.1% 및 KH_2PO_4 0.1%가 함유되었으며 pH는 7.2로 조정되었다. 10 ml의 LB 배지를 함유한 25 ml용 삼각후라스크에 본 공시균주를 1백금이 접종시켜서 28°C에서 하룻밤 진탕 배양시킨 후, 그 배양액 0.5 ml를 50 ml의 TYG 배지가 함유된 250 ml용 삼각후라스크에 재접종하여 28°C에서 4시간 진탕 배양시켰다.

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, extra-cellular hemolysin

* Corresponding author.

조정제 hemolysin의 조제

상기에서 설명한 바와 같이 배양한 배양액을 원심 분리(4°C, 10,000 rpm, 10 min)하여 그 상등액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 60% 포화되도록 첨가하고, 4°C에서 하룻밤 방치시켰다. 생성된 침전물을 원심분리(4°C, 10,000 rpm, 30 min)하여 모으고, 3.3 mM 인산완충액(pH 7.2)에 용해시켜서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 완전히 제거될 때까지 4°C에서 탈염시키고 그 탈염된 용액을 조정제 hemolysin 용액으로 사용하였다.

Hemolysin 활성측정

Braun의 변법(10)을 사용하였다. 즉, hemolysin 용액 0.5 ml에 2-mercaptoethanol을 60 mM되도록 첨가하여 37°C에서 30분간 전처리시킨 후, 0.9% saline이 함유된 3.3 mM 인산완충액(pH 7.2)으로 1×10^6 cell/ml가 되도록 희석시킨 사람의 적혈구 1.75 ml를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 7,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜서 유리된 hemoglobin 1.0 ml를 상기의 인산완충액 2.0 ml로 희석하여 파장 420 nm에서 분광광도계(spectronic 20 U, S. A)로 측정하였다.

Hemolysin의 분자량측정

Fairbanks(11)가 기술한 방법에 따라 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS)가 함유된 5.6% polyacrylamide gel을 사용하여 8 mA/gel로 전기영동하였다.

결과 및 고찰

Sephadex G-200 gel filtration

조정제된 hemolysin 용액을 Sephadex G-200 gel filtration 시켜서 각 fraction의 hemolysin 활성을 조사해 본 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 fraction No. 45-65에 걸쳐 그 활성이 나타났다. 이때 사용된 column은 2.8×50 cm였으며, 3.3 mM 인산완충액(pH 7.2)으로서 hemolysin을 용출시켰다.

DEAE-cellulose column chromatography

Sephadex G-200 column에서 용출된 hemolysin 함유 fraction(No. 45-65)을 모아서 Diaflo ultrafiltration membrane(PM-30; Amicon Co.)으로 농축시킨 후, 이 용액을 DEAE-cellulose column chro-

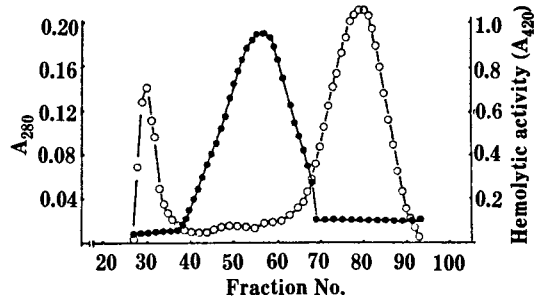


Fig. 1. Sephadex G-200 gel filtration. The column was charged with 3.3 mM phosphate buffer (pH 7.2). The hemolysin was eluted with the same buffer, and elution ratio was 15 ml/hr. Symbols: ○; protein concentration, ●; hemolytic activity.

matography 하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 2개의 protein peak가 나타났다. 이들 peak 1(fraction No. 72-92)과 peak 2(fraction No. 142-155)를 각각 모은 후 다시 ultrafiltration시켜, 각 용액의 hemolysin 활성을 측정해 본 결과 peak 1에서 0.63, peak 2에서 0.18이었다. 이때 사용된 column은 2.8×16 cm였고, hemolysin 용출은 0.2 M과 0.4 M NaCl이 함유된 3.3 mM 인산완충액(pH 7.2)으로서 charge된 hemolysin을 단계별로 용출시켰다.

Hemolysin의 분자량 측정

DEAE-cellulose column에서 용출된 peak 1의 fraction에서 hemolysin의 순도 및 그 분자량을

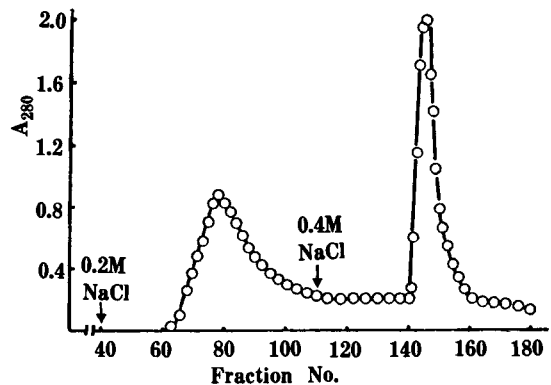


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography. The column was charged with 3.3 mM phosphate buffer (pH 7.2). The hemolysin was stepwise eluted the same buffer containing 0.2M NaCl, and 0.4M NaCl, respectively. The elution ratio was 60 ml/hr.

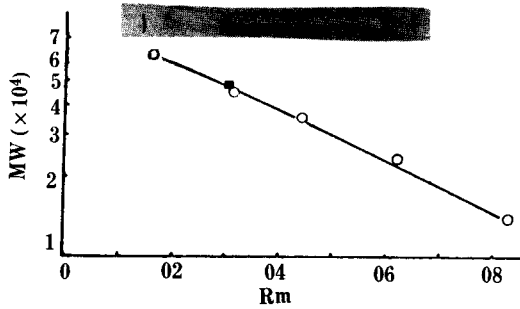


Fig. 3. Determination of the molecular weight of the purified hemolysin. The molecular weight (47,000) of the purified hemolysin was interpolated(■). The standard markers(○)were bovine albumin (MW 66,000), egg albumin (MW 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MW 36,000), trypsin inhibitor (MW 20,100), and lactoalbumin (MW 14,200).

SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 측정해 본 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 47,000 dalton의 단일 band가 나타났다. 이는 Hurley 등(12, 13)이 기술한 δ -endotoxin의 알카리분해에서 hemolysin 활성을 나타내는 단백질 fragment는 분자량이 28,000 dalton으로서 그 분자량이 상이함을 나타내었다. 그러나 Pendleton 등(14)은 *B. thuringiensis* subsp. *berliner* (serotype 1)가 분비하는 균체의 hemolysin 중 thuringiolysin의 분자량과 동일하였으며, 그 활성이 약하지만 29,000 dalton의 또 다른 hemolysin이 함유되어 있다고 보고하였다.

열안정성

정제된 hemolysin(DEAE-cellulose column에서 peak 1의 fraction)을 37°C와 56°C에서 30분간 열처리시킨 후, 그 잔존 활성을 조사해 본 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 열처리를 행하지 않은 대조구

Table 1. Heat stability of hemolysin

Temp.(°C)	Hemolytic activity(A ₄₂₀)
None	1.32
37	1.20
56	1.20
65	0.14

Hemolysin was heated for 30 min at each temperature. After preincubation with hemolysin of heat treatment and 60 mM 2-mercaptoethanol for 30 min at 37°C, the activity of hemolysin was measured.

Table 2. The activity of hemolysin on the thiol agents

Thiol agents	Hemolytic activity(A ₄₂₀)
None	0.24
2-Mercaptoethanol	1.30
Dithiothreitol	0.62
Cysteine	1.20

The hemolytic activity was determined at 37°C for 60 min, after each thiol agents was treated with hemolysin for 30 min at 37°C. The thiol agents were 6 mM cysteine, 60 mM dithiothreitol, and 60 mM 2-mercaptoethanol, respectively.

에 비해 그 활성에 차이를 나타내지 않았다. 그러나 조정제된 hemolysin의 경우는 56°C에서 10분간 열처리로 80% 이상이 실패되었다(data 미제출). 이같은 현상은 Wiseman 등(15)이 보고한 *staphylococcus aureus*가 분비하는 hemolysin의 경우와 유사하였다.

Thiol agents에 대한 영향

Hemolysin 중에서 thiol agents에 의해 그 활성이 회복되는 hemolysin group을 thiol activated cytolysin이라 하며 Albesa(16), Stephen(17), Kiredjian(18) 및 Barberis(19) 등에 의해 연구되었다. 본 공시균주로부터 정제된 hemolysin의 thiol agents에 대한 활성을 조사해 본 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 thiol agents에 의해 그 활성이 증가되었다. 이는 Albesa 등(16)이 기술한 *Klebsiella pneumoniae*의 hemolysin 활성에는 thiol agent 중에서 2-mercaptoethanol이 가장 현저하게 그 활성을 증가시켰으나, 본 균주의 hemolysin 경우에는 cysteine에 의한 활성증가도 2-mercaptoethanol의 효과와 거의 유사하였다. 한편 정제과정 중에 본 hemolysin의 활성이 크게 감소되어 2-mercaptoethanol로 전처리시켜도 그 활성이 거의 나타나지 않는 경우에는 N₂ gas로 가압하여 thiol agent로 처리시키면 그 활성이 크게 증가됨(data 미제출)으로 본 hemolysin은 oxygen-labile hemolysin으로 사료된다.

Protease 처리에 대한 영향

단백질성 toxin 중에는 protease 처리에 의해 생성된 toxin fragments가 다소 그 활성을 유지하는 경우가 많다. Bernheimer 등(20)은 *B. cereus*가 생산

하는 cereolysin이 trypsin, chymotrypsin 및 papain에 의해 생성된 fragment가 hemolysin 활성을 유지하였다고 보고하였다. 따라서 본 정제된 hemolysin을 protease로 처리(37°C, 30분간)시킨 후, 그 잔존 활성을 조사해 본 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 95% 이상 실패되었다.

Cholesterol에 대한 영향

Thelestam 등(21)은 streptolysin 0와 같이 thiol-activated hemolysin의 포유동물 세포의 막 투과성을 cholesterol과 같은 지질이 방해한다고 하였다. 또한 Gill 등(22)은 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 subsp. *morrisoni*의 δ -endotoxin의 적혈구 용해성 단백질 fragment가 diodeolyl phosphatidyl choline에 의해 그 활성을 소실하였다고 보고하였다. 따라서 Pendleton(14)이 행한 방법으로 조제된 cholesterol을 본 정제된 hemolysin과 전처리(37°C, 30분간)시킨 후, 그 hemolysin의 활성을 조사해 본 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 그 활성이 거의 소실되었다.

Table 3. The activity of hemolysin on protease treatment

Protease	Hemolytic activity(A ₄₂₀)
None	1.30
Protease*	0.04
Protease K	0.09
Trypsin	0.06

The protease concentration was 100 μ g/ml of reaction mixture at 37°C for 30 min. For determination of the hemolytic activity, 60 mM 2-mercaptoethanol was used.

* The protease was a product (Sigma Co.) from *Streptomyces griseus*.

Table 4. The activity of hemolysin on cholesterol

Cholesterol conc. (μ g/ml)	Hemolytic activity(A ₄₂₀)
None	1.30
1	1.20
10	0.06
100	0.06

For determination of hemolytic activity, 60 mM 2-mercaptoethanol was used.

금속이온에 대한 영향

Van Epps(23)와 Oberly(24) 등은 streptolysin 0와 같은 유리 sulfhydryl group을 가진 hemolysin은 2가의 금속이온과 결합하여 그 활성이 감소된다고 하였다. 따라서 금속이온들을 본 hemolysin과 전처리(37°C, 30분간)시켜서 그 활성을 조사해 본 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 FeSO₄와 CuSO₄에 의해서만 그 활성이 감소되었으나, 그 이외의 금속이온에 의해서는 그 활성이 변화되지 않았다. 이는 Braun 등(10)이 기술한 *Serratia marcescens*의 hemolysin은 FeCl₃에 의해 그 활성이 감소되며, Albesa 등(16)이 기술한 *Klebsiella pneumoniae*의 thiol-activated hemolysin 경우 CaCl₂ 및 MgCl₂에 의해서도 그 활성이 억제된다고한 것과는 상이한 결과를 얻었다.

혈액종류에 따른 hemolysin 활성

Thomas 등(25)은 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 δ -endotoxin에서 알카리로 용해된 용

Table 5. The activity of hemolysin on metal salts

Metal salts	Hemolytic activity(A ₄₂₀)
None	1.30
FeSO ₄	0.06
CuSO ₄	0.08
CaCl ₂	1.30
MgCl ₂	1.30
FeCl ₃	1.25
Na ₂ -EDTA*	1.25

* EDTA means ethylenediaminetetraacetic acid. The concentration of each metal salt was 1 mM. For determination of the hemolytic activity, 60 mM 2-mercaptoethanol was used.

Table 6. The activity of hemolysin on kinds of RBC

Source of RBC*	Hemolytic activity(A ₄₂₀)
Hen	1.30
Rat	1.30
Rabbit	1.30
Human	1.30

* RBC means red blood cells. The concentration of each RBC was 1×10^6 cell/ml. For determination of hemolytic activity, 60 mM 2-mercaptoethanol was used.

혈성 fragment가 쥐, 양, 말 및 인간의 적혈구에 비 선택적으로 작용한다고 하였다. 따라서 본 정제된 hemolysin의 동물에 대한 적혈구의 용해성을 조사해 본 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 비선택적으로 그 활성을 나타내었다.

요 약

B. thuringiensis subsp. *israelensis* 균주가 생성하는 δ -endotoxin의 alkali 용해에서 생성되는 hemolysin fragment와 extra-cellular hemolysin의 상관관계를 조사하기 위한 기초자료로서 extra-cellular hemolysin을 분리 정제하여 그 성질을 조사하였다. 균체 배양액에 유안을 염석 및 투석시킨 후, Sephadex G-200 gel filtration과 DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 균체의 hemolysin을 정제하였다. 정제된 extra-cellular hemolysin은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에서 47,000 dalton의 분자량을 가진 단일 단백질 band를 얻었다. 또한 정제된 hemolysin은 thiol agents에 의해 그 활성이 증가되었으나, cholesterol 및 protease 처리 또는 금속이온 즉, $FeSO_4$ 나 $CuSO_4$ 에 의해 그 활성이 감소되었다.

사 사

본 연구는 1987년도 문교부 학술연구 조성비에 의해 연구 되었음을 알려드리며 관계되시는 분들께 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- De Barjac, H.: *Entomophaga*. **23**, 309 (1978).
- Schnell, D.J., and K.W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1691 (1983).
- Klowden, M., G.A. Held, and L.A. Bulla, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 312 (1983).
- Insell, J.P., and P.C. Fitz-James: *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 56 (1985).
- Ibarra, J.E., and B.A. Federici: *J. Bacteriol.* **165**, 527 (1986).
- Chilcott, C.N., J. Kalmakoff, and J.S. Pillai: *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 259 (1984).
- Lauret, P., and J.F. Charles: *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **135A**, 473 (1984).
- Thomas, W.E., and D.J. Ellar: *J. Cell Sci.* **60**, 181 (1983).
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook: *Molecular cloning (A laboratory manual)* Cold Spring Harbor Laboratory. 68 (1982).
- Braun, V., H. Günther, B. Neuß, and C. Tautz: *Arch. Microbiol.* **141**, 371 (1985).
- Fairbanks, G., T.L. Steck, and D.F.G. Wallach: *Biochem.* **10**, 2606 (1971).
- Hurley, J.M., S.G. Andrews, Jr., M.J. Klowden, and L.A. Bulla, Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 961 (1985).
- Hurley, J.M., L.A. Bulla, Jr., and R.E. Andrews, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1316 (1987).
- Pendleton, I.R., A.W. Bernheimer, and P. Grushoff: *J. Invertebr. Pathol.* **21**, 131 (1973).
- Weiseman, G.M.: *Bacteriol. Rev.* **39**, 317 (1975).
- Albesa, I., L.I. Barbelis, M.C. Pajaro, M.C. Farnochi, and A.J. Eraso: *Can. J. Microbiol.* **31**, 297 (1985).
- Stephen, J., R.A. Pietrowsk: *Bacterial toxins, (Aspects of microbiology)* Thomas Nelson and Sons LTD. 46 (1981).
- Kiredjian, M.: *Ann. Biol. Clin.* **35**, 325 (1977).
- Barbelis, L.I., A.J. Eraso, M.C. Pajaro, and I. Albesa: *Can. J. Microbiol.* **32**, 884 (1986).
- Bernheimer, A.W.: *Mechanism in bacterial toxicology*, Wiley LTD. 85 (1976).
- Thelestam, M., and R. Mollby: *Infect. Immun.* **29**, 863 (1980).
- Gill, S.S., J.M. Hornung, J.E. Ibarra, G.J.P. Singh: *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1251 (1987).
- Van Epps, D.E., and B. Andersen: *Infect. Immun.* **3**, 648 (1971).
- Oberly, T.D., and J.L. Duncan: *Infect. Immun.* **4**, 683 (1971).
- Thomas, W.E., and D.J. Ellar: *J. Cell. Sci.* **60**, 181 (1983).

(Received November 14, 1987)