

Bacillus thuringiensis 結晶性毒素의 生化學的 特性

李 永 根·姜 錫 權*·金 尙 賢*

農村振興廳蠶業試驗場·*서울대학교 農科大學

Biochemical Characterization of Entomocidal Parasporal Crystals of *Bacillus thuringiensis* Strains

Yung Keun Lee, Seok Kwon Kang* and Sang Hyun Kim*

Sericultural Experiment Station, R.D.A. Suwon, Korea

*College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

Summary

The parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*, *dendrolimus*, *finitimus*, *aizawai* and *israelensis* were compared by polyacrylamide electrophoresis, amino acid composition and immunological analysis. In the subspecies of *kurstaki*, *dendrolimus*, *finitimus* and *aizawai*, the molecular weights of main subunits of crystal solubilized by alkaline solution were 1.3×10^5 and 6.5×10^4 while those of subsp. *israelensis* were 4×10^4 and 1.4×10^4 . The degradation of lepidopteran toxic subspecies crystals by silkworm midgut protease showed $6.0 \sim 6.4 \times 10^4$ molecular weight and the pattern of degradation of subsp. *israelensis* crystals was similar to that of alkaline solution treatment. In the amino acid composition, aspartic acid in subsp. *israelensis* and glutamic acid in the other four subspecies were the most abundant. The immunological characteristics of the crystals revealed that the antibody produced against the alkali-solubilized crystal protein of subsp. *israelensis* reacted with only its antigen, but the crystal antigens from the other four lepidopteran toxic subspecies did cross-react with each other as well as with their own homologous antisera.

緒 言

*Bacillus thuringiensis*는 나비목 곤충에 독성을 나타내는 結晶性毒素(δ -endotoxin)를 생산한다. 이 毒素의 分子量을 Holmes와 Monro(1965)는 X-ray 廻折에 의하여 230,000으로 測定報告하였고 Norris(1969, 1971)도 電子顯微鏡에 依한 觀察로 같은 크기의 分子量을 報告한 바 있다. 그리고 이 균의 subspecies인 *kurstaki*가 생산하는 結晶性毒素의 subunit는 分子量이 1.34×10^5 인 glycoprotein이고 이것은 毒性이 나타나기 이전의 protoxin으로 다시 分解되어 6.8×10^4 인 작은 분

량으로 될 때 비로소 곤충에 毒性이 나타난다고 하였다(Tyrell et al., 1981). 또 다른 subspecies인 *dendrolimus*가 생산하는 結晶性 毒素의 subunit는 그 분자량이 1.45×10^5 이고 이를 trypsin으로 溶解시킨 分子量이 5.8×10^4 인 毒性物質로 分解된다고 하였다(Nagamatsu et al., 1984).

이러한 *B. thuringiensis*의 結晶性毒素가 昆蟲 幼蟲에 添食되어 毒性이 나타나기까지는 昆蟲消化管의 높은 alkali와 消化液中的 protease 酵素의 作用에 依한다고 한다(Lecadet & Dedonder, 1967).

著者들은 本 研究에서 *B. thuringiensis* subspecies 중 나비목 昆蟲에 毒性을 나타내는 4個의 菌株와 모기

에 毒性을 나타내는 subspecies *israelensis*를 供試하여 이들이 생산하는 結晶性毒素의 subunit의 分子量을 조사하였고 이들 蛋白質 毒素의 누에消化液의 protease에 의한 分解像을 調査하여 菌株間 누에에 대한 毒性이 다르게 나타나는 것과(李·姜, 1989) 연관시켜 검토 하였다.

또 한편 나비목에 독성을 나타내는 絹주의 結晶性毒素과 subspecies *israelensis*의 結晶性毒素間에 免疫學的으로 어떠한 관계가 있는가도 조사하였다.

材料 및 方法

1. 供試菌株 및 培養

供試된 *Bacillus thuringiensis* subspecies 가운데서 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *dendrolimus*, *B. thuringiensis* subsp. *finitimus*는 美農務省 Faust博士로부터, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*는 日本九州大學 農學部 鮎澤教授로부터 分讓 받았으며 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*는 Ohio大學校 Dean教授로부터 各各 分讓받아 蠶業試驗場 蠶桑保護科 누에病理 研究室에서 nutrient agar 斜面培地에 培養하여 保管하고 있는 菌株들이다. 本試驗을 위하여 위의 菌株들을 250ml의 triple baffled flask에 100ml의 G.Y.S.培地(Nickerson & Bulla, 1974)를 넣고 진탕배양기에서 28°C, 140rpm으로 7~8시간 培養한 對數期에 있는 菌을 1l의 G.Y.S.培地를 넣은 Biostat M 醱酵器에 培地의 6%로 接種하여 28°C, 300 rpm 條件下에서 菌의 autolysis가 일어날때까지 배양하였다.

2. 結晶性毒素의 分離, 溶解 및 電氣泳動

結晶性毒素의 分離

醱酵器에서 培養한 菌株들을 crystal violet 染色으로 영양세포의 有無를 確認하여 胞子和 結晶性毒素가 完全히 分離되었을 때 7,000g에 10分間 遠心分離하여 沈澱物을 收集하고 다시 0.01% Triton X-100을 포함한 1M NaCl溶液으로 3回 洗滌하여 超音波 攪拌器를 利用 22,000 cycle/sec의 速度로 30秒間 攪拌한 후 Renografin 60 (E.R. Squibb and Sons, Inc.)의 60~90%의 discontinuous density gradient를 만들어 超高速遠心分離機(Beckman) SW28 rotar를 利用 28,000g에 40分間 遠心分離하였다. 遠心分離가 끝난후 注射바늘 23號로 結晶性毒素帶 밑에서 튜브를 구멍내어 結晶性 毒素만을 收集하고 이를 蒸溜水로 3回 以上 7,000g에 20分間 遠心分離로 洗滌한 후 冷凍乾燥시켰다.

結晶性毒素의 alkali溶液에 의한 溶解

冷凍乾燥된 結晶性毒素을 6N HCl로 pH가 조정된 1N NaOH alkali 溶液(pH 12.0)에 28°C에서 溶解시켜(0.4%, w/v) 5시간 후 부터 0.02N phosphate 緩衝液(pH 7.5)에 하룻밤 透析시킨 후 電氣泳動하는 한편 精製된 結晶性毒素들을 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 6M urea-0.01M NaH_2PO_4 -0.01M Na_2HPO_4 (pH 7.2)의 완충액으로 28°C에서 1시간 동안 溶解시킨 후 電氣泳動하여 위의 alkali 溶液處理와 比較하였다.

結晶性毒素의 누에消化液 및 누에消化液 protease에 의한 溶解

5齡盛食期の 누에를 24時間 絶食시킨 후 chloroform으로 자극하여 消化液을 吐液하게 하고 얼음물에 담긴 용기에 이를 收集하여 4°C에서 7,000g로 遠心分離한 후 上層液을 收集하고 이에 冷却된 methanol을 同量 加하여 1時間정도 4°C에 두었다가 7,000g에 30分間 遠心分離하여 沈澱物을 모았다. 沈澱物을 0.5M NaCl을 포함한 少量의 0.1M sodium bicarbonate緩衝液(pH 9.5)에 溶解시켜 1mM EDTA를 포함한 同一緩衝液에 4°C에서 약 18시간동안 透析시킨 후 Sephadex G-75 (Column: 2.5×75cm)에 20ml/h의 速度로 濾過시켜 protease를 分離하였다.

分劃한 protease의 活性은 0.5ml의 蛋白質 酵素液과 1.5ml의 0.2M glycine-NaOH 緩衝液(pH 12)의 혼합액에 0.5%의 結晶性 毒素 2.0ml을 섞어 37°C에서 20分間 處理한 후 280nm에서 吸光度를 測定하여 protease의 活性을 검정하였다.

結晶性毒素의 溶解는 收集한 누에 消化液과 위에서 部分精製된 消化液 protease에 의하여 이루어졌다. 消化液과 protease 各各 0.2ml에 증류수 0.3ml, 0.2M glycine-NaOH 緩衝液(pH 10.2) 1.0ml을 混合하여 37°C에서 10分間 經過시킨 후 0.5%의 結晶性毒素懸濁液 0.5ml을 加하여 37°C에서 20分間 酵素反應시켰다.

Polyacrylamide slab gel 電氣泳動

溶解시킨 結晶性毒素을 水直型電氣泳動機(Bio-RAD)에서 0.1% SDS를 포함한 7% polyacrylamide slab gel을 만들어서 各 slot當 20 μ l의 試料를 넣은 후 15 mA 電流로 30分間, 20mA 電流로 8시간동안 泳動을 수행하였다. 電氣泳動槽로부터 分離한 gel은 methanol, acetate, 증류수 混合液(25:7.5:62.5, v/v/v)에 0.25%(w/v) coomassie brilliant blue 溶液을 만들어 50°C에서 4시간 染色한 후 같은 混合液에서 24~28시간 脱色시켰다.

3. 結晶性毒素蛋白質의 amino酸分析

分離된 結晶性毒素들을 6N HCl로 25시간동안 加水 分解시킨 후 amino酸 分析機(Hitachi 835)로 分析하

었다. Tryptophane은 少量의 tryptomine을 포함한 3 M의 p-toluensulfonic acid로 加水分解한 試料로 定量하였으며 cystine과 cysteine은 cysteic acid로, methionine은 performic acid로 酸化시킨 뒤에 sulfone으로 各各 定量하였다.

4. 結晶性毒素蛋白質의 抗原抗體反應

結晶性毒素들을 1N NaOH(pH 12)로 28°C에서 溶解(0.4%, w/v)시킨 후에 5시간 동안 같은 條件下에 두었다가 動物實驗用으로 기른 무게 2.0kg의 토끼(New Zealand white albino rabbit)에 溶解된 結晶性毒素蛋白質 1ml을 Complete Freund adjuvant와 잘 混合하여 4군데에 皮下注射하였다. 4週 후에 同量의 溶解된 結晶性毒素蛋白質을 Incomplete Freund adjuvant와 混合하여 再注射하고 그로부터 2週 후에 採血하였다. Cuchterlony 검정은 2% polyethylene glycol 6,000, 0.089M boric acid, 0.089M Tris-base, 0.001 M EDTA (pH 8.3)에 1% agarose gel을 만들어 抗原과 抗體물 well에 채운뒤 室溫에 두어 抗原·抗體의 凝集帶가 形成되게 하였다.

結果 및 考察

1. Polyacrylamide gel 電氣泳動

Alkali 處理와 SDS 處理로 溶解된 結晶性毒素蛋白質의 電氣泳動

Alkali 處理와 SDS 處理에 依한 結晶性毒素의 分解像(그림 1. A,B)을 보면 두 處理間에 별 차이가 없이 subsp. *aizawai*, *kurstaki*, *dendrolimus*, *finitimus* 등은 分子量 1.3×10^5 이 主 band였고 9.5×10^4 이 副 band로 나타났으며 *israelensis*는 2.4×10^4 이 主 band로 그리고 1.4×10^4 과 6.4×10^4 이 副 band로 나타났다. 이것은 Tyrell 등(1981)의 보고와 일치하고 있으며 1.3×10^5 의 band는 protoxin으로서 실제 毒性을 나타내기 이전의 subunit로 알려지고 있다. 이처럼 *B. thuringiensis*의 結晶性毒素의 低分子化現象은 이 毒素의 모양을 維持하고 있는 disulfide band가 mercaptoethanol이나 thioglycollate와 같은 sulphhydryl reagent와 높은 alkaline에 依해서 끊어져 작은 peptide가 되기 때

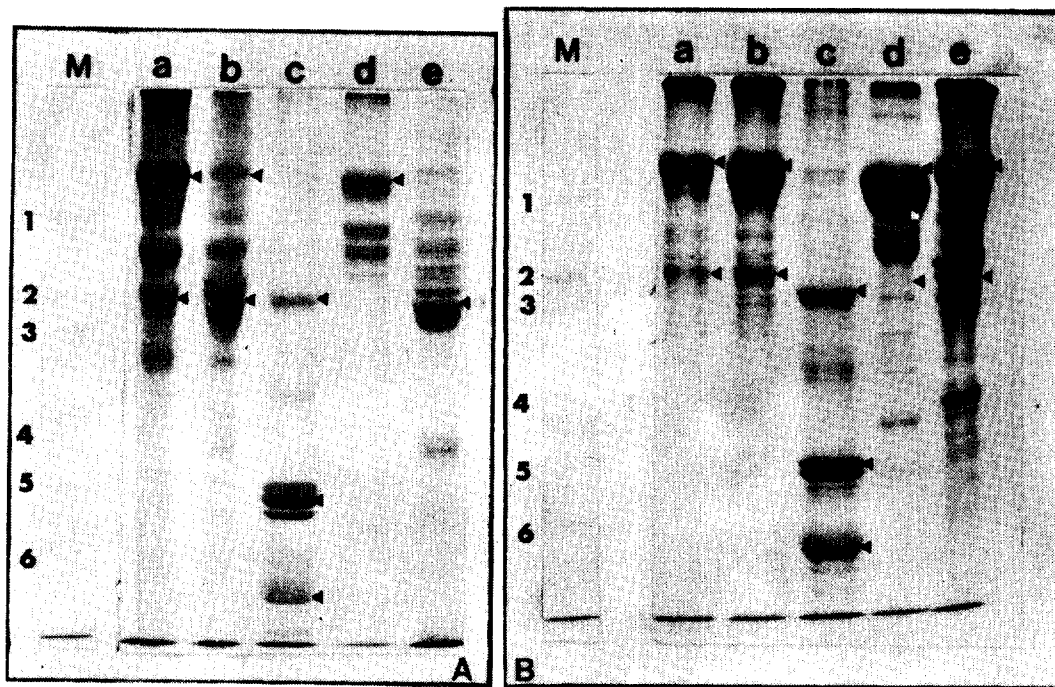


Fig. 1. SDS-Polyacrylamide slab gel electrophoresis of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals solubilized in NaOH (pH 12.0) (A) and in 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 6M urea, 0.01 M NaH_2PO_4 -0.01M Na_2HPO_4 (pH 7.2) (B). This slab contained 7% acrylamide, a: *aizawai*, b: *kurstaki*, c: *israelensis*, d: *finitimus*, e: *dendrolimus*, M: Molecular weight standards, α -lactalbumin(14,400), soybean trypsin inhibitor(20,100), carbonic anhydrase (30,000), ovalbumin(43,000), bovine serum albumin(67,000) and phospholylase b(94,000).

문이다(Bulla et al., 1970, 1977, 1979). 또 한편 *B. thuringiensis*가 sporulation이 일어나는 동안 여러 종류의 protease가 생성되어서 結晶性毒素에 附着되어 있는데 alkali 溶液은 이들 protease들을 活性化시켜 結晶性毒素의 分解를 돕는다고 하였다(Bulla et al., 1981).

또 alkaline이나 SDS, urea, guanidine-HCl 등은 結晶性毒素을 denature시켜 毒素蛋白質과 protease와의 反應에 있어서 毒素蛋白質을 protease에 보다 適合한 基質(substrate)로 만들어 酵素의 蛋白質分解能力을 增加시킨다고 한다(Nickerson, 1980).

그리고 供試된 모든 菌株로부터 나타난 $6.4 \sim 6.5 \times 10^4$ 의 band는 subsp. *kurstaki*의 경우는 封入體(embedded body)로부터 그리고 subsp. *dendrolimus*를 除外한 다른 3개의 菌株는 不定立方體形의 結晶性毒素로부터 오는 것으로 推測된다. Iizuka와 Yamamoto (1983)는 subsp. *kurstaki* 중에서 22개의 strain을 檢討한 結果 Sharpe와 Baker(1979)가 報告한 封入體가 觀察되는 strain에서는 이와 같은 分子量이 나타나는 것을 볼 때 이 subunit는 封入體로부터 오는 것임이 틀림없다고 報告하였다.

또 subsp. *israelensis*의 電氣泳動像이 다른 4개의 供試菌의 것과 다른 것은 宿主昆蟲에 대한 毒性差異와도 관계가 있는 것으로 생각된다.

누에消化液 및 消化液 protease에 의하여 溶解된 毒

素蛋白質의 電氣泳動

5齡盛食期에 採取한 누에消化液과 消化液으로부터 分離된 protease에 의한 毒素蛋白質의 分解 現象을 보기 위하여 各各을 結晶性毒素에 處理하여 溶解시킨 후 電氣泳動을 遂行하였다. 누에消化液에 溶解시킨 것을 보면(그림 3, A) alkali溶液이나 SDS로 處理했을 때와 별 차이는 없으나 分子量 1.3×10^5 의 band가 상당량 分解되어 작은 分子量의 peptide로 나타난 것을 볼 수 있는데 subsp. *dendrolimus*의 경우는 分子量 1.3×10^5 의 band가 alkali 溶液處理때와 비슷한 상태로 남아 있어 누에消化液에 의한 分解速度가 느린 것을 알 수 있었다. subsp. *israelensis*의 경우에도 alkali 溶液이나 SDS 處理때와 같은 結果를 보임으로써 누에 消化液에 영향받지 않음을 보여주고 있다.

그림 2는 누에消化液 protease를 分離키 위하여 누에 消化液을 Sephadex G-75 column chromatography로 分割한 結果이다. 전체의 試驗管 40個中에서 11번과 13번 試驗管 사이에서 peak(P1)가 나타났고 또 22번과 25번 사이에서 peak(P2)가 나타났다. 結晶性毒素에 대한 protease의 活性을 보면 P1은 弱하였고 P2는 높은 活性을 보였으며 第3의 peak(P3)도 活性이 弱하게 나타났다. 이상의 結果에서 보는 바와 같이 누에消化液에는 3種의 protease가 存在하고 그 가운데 1種이 結晶性毒素에 대한 活性이 높게 나타났는데 關等(1982)

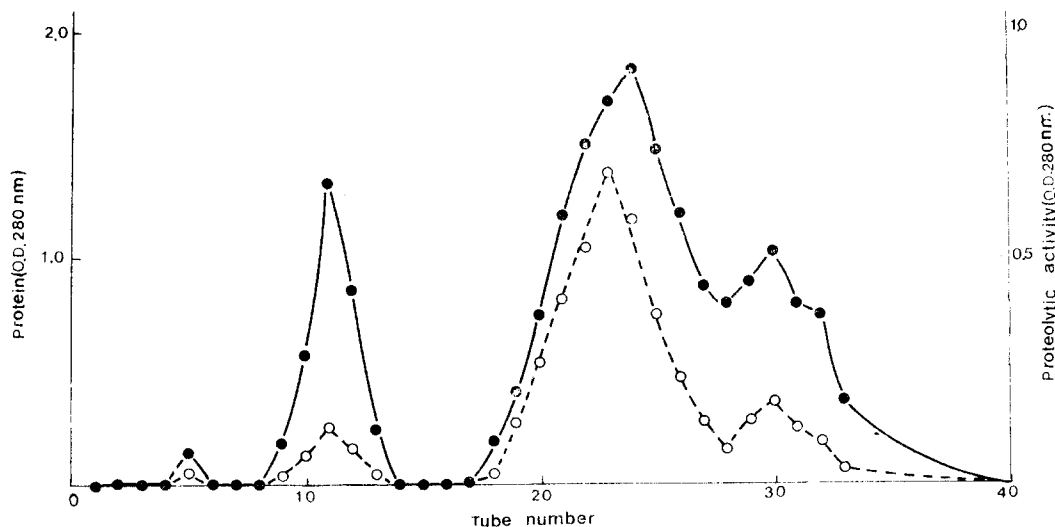


Fig. 2. Gel filtration on Sephadex G-75(2.5×75cm) of silkworm gut juice treated with methylalcohol. The juice treated with methylalcohol was eluted with 0.1M bicarbonate buffer(pH 9.5) containing 1mM EDTA at a flow rate of 20ml per hour. Each fraction contained 10ml of elute. ●—●: protein, ○—○: proteolytic activity.

도 비슷한 報告를 하였다. 이처럼 정제된 protease (P2)로 結晶性毒素을 溶解시켜 電氣泳動을 수행한 결과(그림 3, B) alkali 溶液이나 누에消化液으로 處理했을 때와는 뚜렷하게 다른 像을 나타내 주고 있다. 即 subsp. *dendrolimus*와 *israelensis*를 除外한 다른 3個의 subsp.에서는 1.3×10^5 의 band는 거의 나타나지 않았거나 微細하게 觀察된 반면 分子量 6.0×10^4 (subsp. *kurstaki*와 *aizawai*)와 6.6×10^4 (subsp. *finitimus*)의 band가 뚜렷하게 主 band로 나타났다. 이때도 subsp. *dendrolimus*는 다른 subsp.와는 다르게 alkali 溶液이나 SDS 處理때와 마찬가지로 分子量 1.3×10^5 의 band가 主 band로 나타났고 누에消化液處理와 비교하면 상당량이 分解된 것을 알 수 있는데 그것은 精製된 protease이기에 毒素에 對한 分解能力이 누에消化液보다 크기 때문이라고 생각된다.

Subsp. *israelensis*의 경우는 alkali 溶液이나 SDS 그리고 누에消化液處理에서는 2.4×10^4 과 1.4×10^4 의 band가 거의 비슷한 濃度로 나타났으나 protease 處理에서는 2.4×10^4 의 band가 상당량 分解된 반면에 1.4×10^4 의 band는 다른 處理때 보다 더 強하게 나타났다.

結晶性毒素의 누에에 대한 毒性檢定에서 가장 弱한 毒性을 나타낸 subsp. *dendrolimus*(李·姜, 1989)가 누에消化液處理나 누에消化液 protease 處理에서 強한 毒性을 나타낸 다른 subsp.와는 달리 分解度가 떨어진 것은 毒性의 정도와 관련이 있음을 示唆해 주고 있다. 따라서 結晶性毒素의 毒性을 檢定하는데에는 生物的檢定以外에 昆蟲消化液 protease에 依한 結晶性毒素의 分解정도로도 判定가능함을 나타내 주고 있다. 또 subsp. *israelensis*가 누에消化液이나 누에消化液 protease處理에서 alkali 溶液이나 SDS 處理때와 별다른 變化 없이 거의 같게 나타난 것은 subsp. *israelensis*가 나비목 昆蟲에는 毒性을 나타내지 않는 사실과 관계가 있음을 시사 해 주고 있다. 지금까지의 報告를 보면 *B. thuringiensis* 結晶性毒素의 低分化된 peptide의 分子量은 供試菌株, 溶解條件 그리고 試驗方法 등에 따라 研究者마다 약간씩 다르게 報告하고 있다(Cooksey, 1968; Pendleton, 1968; Faust et al., 1974; 關等, 1982; Tyrell, 1981). Nickerson(1980)은 15個의 subsp. 들을 低分化된 peptide의 分子量에 따라 6個의 group 으로 分類하기도 하였다.

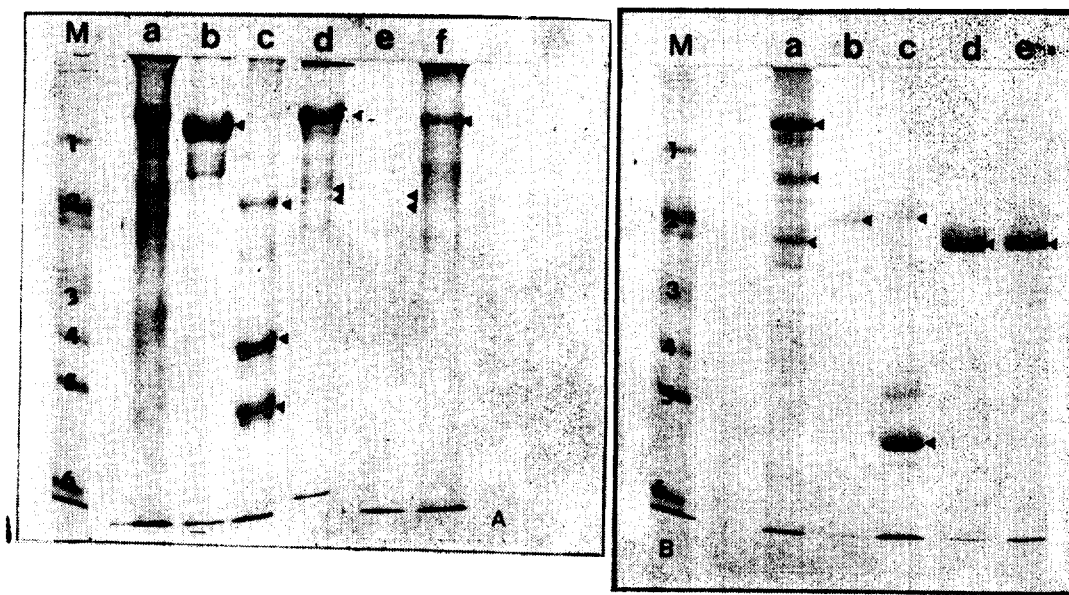


Fig. 3. SDS-Polyacrylamide slab gel electrophoresis of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals solubilized in silkworm gut juice at 37°C for 20 minutes (A) and in silkworm digestive protease at 37°C for 20 minute (B). A, a: silkworm gut juice; b: *dendrolimus*; c: *israelensis*; d: *kurstaki*; e: *finitimus*; f: *aizawai*. B, a: *dendrolimus*; b: *finitimus*; c: *israelensis*; d: *kurstaki*; e: *aizawai*. M: Molecular weight standards, α -lactalbumin(14,400), soybean trypsin inhibitor(20,100), carbonic anhydrase(30,000), ovalbumin(43,000), bovine serum albumin(67,000) and phosphorylase b(94,000).

2. Amino酸 組成

供試된 subsp.들의 結晶性 毒素의 amino酸 組成을 調査키 위하여 純粹分離된 結晶性毒素을 6N HCl로 加水分解한 후 amino酸 組成을 分析하였다.

그 結果를 보면(표 1) 供試된 subsp. 중에서 *israelensis*를 除外한 기타 4개의 菌株에서 共通으로 가장 많은 것은 glutamic酸으로서 13.9~14.6%이었으며 그 다음으로 共히 많은 비율을 차지하고 있는 amino酸은 aspartic酸으로 12.1~12.5%를 차지하고 있었다. subsp. *israelensis*에서는 aspartic酸이 14.5%로 가장 많은 비율을 차지했고 그 다음 많은 것은 glutamic酸으로 12.7%이었다.

이러한 結晶性毒素의 amino酸 組成에 대하여 既히

報告된 것을 보면 *kurstaki*(Bulla et al., 1977), *thuringiensis* (Holmes & Monro, 1965), *alesti*, *entomocidus*, *kenya*(Spencer, 1968), *sotto*(Angus, 1956) 등에서는 glutamic酸이, 그리고 *tolworthy*(Chestukhina et al., 1978)에서는 aspartic酸이 가장 많이 포함되어 本研究의 結果와 一致하는 傾向을 보였으나 Tyrell 等(1981)의 報告에서는 *kurstaki*, *berliner*, *alesti*, *tolworthy*와 *israelensis* 等 어느 菌株에서나 aspartic酸이 glutamic酸 보다 더 많이 포함되어 있는 것으로 되어 있어 本研究의 結果와 다르게 나타났으나 나비목 昆蟲에 毒性을 나타내는 菌株의 結晶性毒素의 amino酸組成과 *israelensis*가 생산하는 結晶性毒素의 amino酸組成은 서로 다른 可能性이 있으리라고 생각된다.

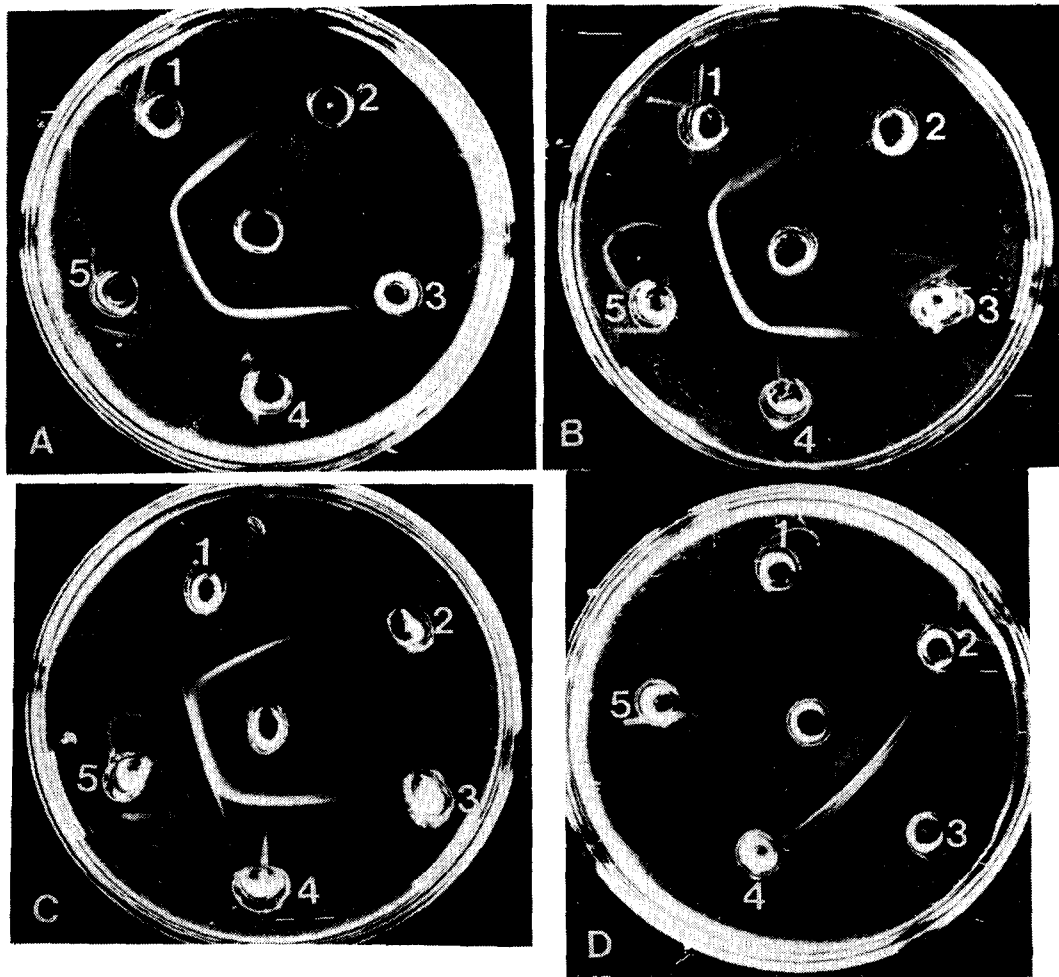


Fig. 4. Ouchterlony double diffusion immunological analysis of parasporal crystals. Center wells of A to D contain crystal antibodies of *kurstaki*, *aizawai*, *finitimus* and *israelensis*. Wells 1, 3, 4, 5 contain crystal antigens of *kurstaki*, *israelensis*, *aizawai* and *dendrolimus* respectively and well 2 contains distilled water as a blank.

Table 1. Amino acid composition(mg%) of the δ -endotoxin from 5 strains of *Bacillus thuringiensis*.

Strain	<i>istaele-nsis</i>	<i>finitimus</i>	<i>aizawai</i>	<i>kurstaki</i>	<i>dendr-olimus</i>
Cystine	1.7	1.1	1.7	1.4	1.5
Methion-ine	2.5	1.8	1.8	1.8	1.3
Aspartic acid	14.5	12.5	12.2	12.1	12.2
Threonine	8.4	6.6	6.3	6.6	5.8
Serine	5.9	5.4	6.1	5.8	6.0
Glutamic acid	12.7	13.9	14.6	14.6	14.4
Proline	2.1	1.8	2.0	2.1	1.9
Glycine	3.7	4.2	4.2	4.8	6.9
Alanine	4.8	6.8	4.3	4.4	3.7
Valine	6.9	6.5	5.9	5.9	5.8
Isoleucine	6.9	5.6	5.7	5.7	5.2
Leucine	8.6	7.9	8.7	8.4	8.4
Tyrosine	1.7	4.7	5.6	5.2	5.1
Phenylal-anine	5.6	5.6	5.9	6.0	5.5
Lysine	5.9	6.9	3.6	4.1	4.2
Histidine	3.9	4.2	3.0	3.1	4.2
Arginine	4.1	4.6	8.3	8.2	8.1

3. 免疫學의 特性

Alkali 溶液에 溶解된 結晶性毒素蛋白質의 抗原性을 Ouchterlony double-diffusion 方法에 의하여 檢定하였다. 그림 4에서 보는 바와 같이 subsp. *kurstaki*, *aizawai*, *finitimus*의 항체는 이들의 抗原과 서로 交互해서 結合하고 subsp. *israelensis*의 抗原과는 結合하지 않았으며 subsp. *israelensis*의 抗體는 그것의 抗原과만 反應하고 다른 抗原과는 反應하지 않았다.

*B. thuringiensis*가 생산하는 結晶性毒素蛋白質의 菌株間 免疫學의 特性에 對하여는 報告된 것이 많지 않다. Tyrell 等(1981)이 subsp. *kurstaki*, *berliner*, *alesti*, *tolworthy* 그리고 *israelensis*의 結晶性毒素에 대한 이들 菌株間에 있어서 免疫學의 關係를 檢討한 바 本研究의 結果와 같이 subsp. *israelensis* 이외의 4개의 菌株는 그들의 抗原과 抗體가 서로 交互反應하는 대신 그중의 어느 subsp.도 subsp. *israelensis*의 抗原과 抗體와는 反應하지 않았으며 subsp. *israelensis*의 抗原은 오직 그것의 抗體와만 反應하였다고 한다.

따라서 subsp. *israelensis*의 結晶性毒素蛋白質의 免疫學의 性質도 供試된 菌株중 나비목昆蟲에 毒性을 나타내는 다른 subsp.와는 다르게 나타남을 알 수 있다.

摘 要

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki*, *aizawai*, *dendrolimus*, *finitimus* 그리고 *israelensis*의 結晶性毒素의 特性을 구명하기 위하여 이들 菌株들이 生産하는 結晶性毒素들을 alkali溶液, SDS溶液, 누에消化液 그리고 部分精製된 누에消化液 protease에 溶解시켜 電氣泳動을 實施 이들 毒素의 低分子化 現象을 조사하였 으며 또한 amino酸 組成과 免疫學의 特性을 조사하여 아래와 같은 結果를 얻었다.

1. Alkali 溶液과 1% SDS-1% β -mercaptoethanol 에 結晶性毒素들을 溶解시킨 結果 subsp. *kurstaki*, *dendrolimus*, *finitimus* 그리고 *aizawai*로 부터는 分子量 1.3×10^5 과 6.5×10^4 의 subunit가 主 band로 나타났고 subsp. *israelensis*에서는 分子量 4×10^4 과 1.4×10^4 의 subunit가 主 band로 나타났다.

2. 누에消化液에 依한 結晶性毒素의 分解像은 alkali 溶液이나 SDS-mercaptoethanol 處理때와 같은 pattern 을 보여 주었다.

3. 部分精製된 누에消化液 protease로 結晶性毒素를 溶解시켰을 경우 subsp. *kurstaki*, *aizawai*, *finitimus* 에서는 分子量 1.3×10^5 의 subunit는 溶解되어 거의 나타나지 않았고 $6.0 \sim 6.4 \times 10^4$ 의 subunit가 主 band로 나타났으며 subsp. *dendrolimus*에서는 分解정도가 弱하게 나타났고 subsp. *israelensis*에서는 alkali나 SDS 處理때와 비슷한 電氣泳動像을 나타냄으로써 누에消化液 protease에 依하여 溶解되지 않음을 보여 주었다.

4. 結晶性毒素의 amino酸 組成은 subsp. *israelensis* 에서는 aspartic酸이 14.5%로 가장 많은 비율을 차지 하였고 그의 4개의 subsp.에서는 glutamic酸이 13.9~14.6%로 가장 많았다.

5. 結晶性毒素의 免疫學의 特性을 보면 subsp. *israelensis*의 抗體는 그것의 抗原과만 反應하고 그의 4개의 subsp.의 抗體는 各各의 抗原과 그리고 서로 다른 抗原과 交互하여 反應하였다.

引 用 文 獻

Angus, T.A. (1956). Extraction, purification and properties of *Bacillus sotto* toxin. Can. J. Microbiol. 2:416-426.
 Bulla, L.A., Jr., G.A. Bennett, and O.L. Shotwell (1970). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. II. Lipids of vegetative cells.

- J. Bacteriol. 104:1246-1253.
- Bulla, L.A., Jr., R.A. Rholes and G. S. Julian (1975). Bacteria as insect pathogens. Annu. Rev. Microbiol. 29:163-190.
- Bulla, L.A. Jr., K.J. Krammer, D.M. Cox, B.S. Jones, L.I. Davidson, and G.L. Lockhart (1981). Purification and characterization of the entomocidal protein of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 256:3000-3004.
- Bulla, L.A., Jr., K.J. Kramer and L.I. Davidson (1977). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 130:375-383.
- Bulla, L.A., Jr., L.I. Davidson, K.J. Kramer and B.L. Jones (1979). Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91:1123-1130.
- Chestukhina, G.G., I.A. Zaluennin, L.I. Kostina, T.S. Kotova, S.P. Katrukha, L.A. Lyublinskaya and V.M. Stepanova (1978). Proteinases bound to crystals of *Bacillus thuringiensis* Biokhimiya. 43: 857-864.
- Cooksey, K.E.(1968). Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxin to larvae of lepidoptera. Biochem. J. 106:445-454.
- Faust, R. G. Hallam and R. Travers (1974). Degradation of the parasporal crystal produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Invert. Pathol. 24:365-373.
- Holmes, C.A. and R.E. Monro (1965). Studies on the Structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. J. Mol. Biol. 14:572-581.
- Iizuka, T. and T. Yamamoto, (1983). FEMS Microbiol. Lett. 19:187-192.
- Lecadet, M. and R. Dedonder (1967). Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. I. Preparation and fractionation of the lysates. J. Invertebr. Pathol. 9:310-321.
- 李永根·姜錫權(1989). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 누에에 대한 毒性和 뽕밭에서의 結晶性毒素의 殘效力. 農試論文(蠶業·農利·菌根篇). 32(2):24-28.
- Nagamatsu, Y., Y. Itai, C. Hatanaka, G. Funatsu and K. Hayashi (1984). A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Agric. Biol. Chem. 48(3):611-619.
- Nickerson, K.W. and L.A. Bulla Jr. (1974). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. 28:124-128.
- Nickerson, K.W. (1980). Structure and function of the *Bacillus thuringiensis* protein crystal. Biotech. and Bioengin. Vol. XXII: 1305-1333.
- Norris, J.R. (1969). Macromolecule synthesis during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. In "spores" (L.L. Campbell ed.). Vol. 4. pp.45-58. American Society for Microbiology, Bethesda, MD.
- Norris, J.R. (1971). The protein crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. Biosynthesis and physical structure. In "Microbial Control of Insects and Mites (H.D. Burges and N.W. Hussey, ed.), pp.229-246. Academic Press, New York and London.
- Pendleton, I.R.(1968). Toxic subunits of the crystal of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol. 31: 208.
- Pendleton, I.R. (1973). Characterization of crystal protoxin and an activated toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus*. J. Invertebr. Pathol. 21:46-52.
- 關武純·安部一紀·筒井亮毅·渡邊忠雄(1982). *Bacillus thuringiensis* 結晶性毒素の溶解に關する家蠶消化液プロテアーゼの分離·精製. 日蠶雜. 51(4):279-285.
- Sharpe, E.S. and F.L. Baker (1979). Ultrastructure of the unusual crystal of the HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol. 34:320-322.
- Spencer, E. (1968). Comparative amino acid composition of the parasporal inclusions of five entomogenous bacteria. J. Invertebr. Pathol. 10:444-445.
- Tyrell, D.J., L.A. Bulla, R.E. Andrews, K.J. Kramer, L.I. Davidson and P. Nordin (1981). Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. J. Bacteriol. 145:1052-1062.