

## 모기유충에 살충력이 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 delta-endotoxin의 화학적 처리에 따른 안정성

김광현<sup>1\*</sup> · 조경순<sup>1</sup> · 이광배<sup>2</sup>

<sup>1</sup>동원대학교 자연대학 미생물학과, <sup>2</sup>대구보건전문대 위생학과

### Stability on Chemical Treatment of Mosquitocidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2

Kim, Kwang-Hyeon<sup>1\*</sup>, Kyung-Soon Cho<sup>1</sup> and Kwang-Bae Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Science, Dongyei University, Pusan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Hygiene, Taegu Health Vocational College, Taegu 702-260, Korea

**Abstract** — The delta-endotoxin from *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 was resistant to high concentration of salt (4 M NaBr), organic solvents (50% acetone), denaturants (4 M urea), and neutral detergents (10% triton X-100). In contrast, the toxin was inactivated by treating with charged detergents as well as guanidine hydrochloride or carbon tetra-chloride. The delta-endotoxin is not a sulfhydryl activated toxin, but modification of the lysine side chains eliminated toxicity against mosquito larvae.

*Bacillus thuringiensis*의 flagellar antigen에 따른 분류에 의하면 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*는 serotype 14(H-14)에 속하지만 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2는 serotype 10(H-10)에 속하므로 양 균주는 아종에 차이가 있으나, 숙주특이성에서 모기유충에만 독작용이 있는 delta-endotoxin(내독소)을 생산한다는 점에서 공통성이 있다(1, 2). 특히 모기유충에만 독작용이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소는 다른 *B. thuringiensis*의 내독소와 다른 특성이 있다; (i) 나방류에는 독작용이 전혀없고 모기유충에만 독작용이 있는 점(2); (ii) 28 Kda에서 135 Kda까지 많은 단백질의 subunit로 구성되어 있는 점(3, 4); (iii) 알칼리로 용해시키면 cytolytic과 hemolytic 활성을 가지는 점(5)이다. 이 같은 특성을 가진 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소에 대한 연구는 실험실이나 field에서 많

이 행해져 왔으나, *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소에 대한 연구는 모기유충에 대한 독성시험에서 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 내독소보다 약 10배 정도 약하기 때문에(6) 많은 연구자들로부터 관심을 끌지 못하였다. 그러나, 이들 두 균주의 내독소간에는 숙주의 특이성 및 독소단백질의 화학적 특성 등이 유사함에도 불구하고 최근에 면역화적인 상이성이 인정되었다(7). 따라서 본인 등은 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소로부터 hemolysin을 정제하는 과정 중에 그 활성이 불안정하여 내독소의 모기유충에 대한 생물학적 활성까지도 영향이 있어 내독소의 분리과정 중에 사용되는 화학약제에 대한 내독소의 안정성을 검토하였다. 아울러 장차 내독소의 *in vivo*상에서 모기유충에 대한 작용양상에 관한 연구나 내독소의 상품화를 위하여 가공하는 공정 중에 노출될 가능성이 있는 화학약제 또는 모기유충의 생활환경인 오염된 수질에 내독소를 산포함으로써 야기될지도 모르는 내독소의 생물학적 활성의 변화 등을 알아보기 위하여 각종 강력한 단백질변성제로 내독소를 처리하였을 때

**Key words:** *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2, mosquitocidal delta-endotoxin, *Aedes aegypti*

\*Corresponding author

모기유충에 대한 내독소의 생물학적인 독성의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양방법

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti)와 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2 (Btd)를 일본 Kyushu대학 Aizawa 교수로부터 분양받았다. 이들 균주는 TYG 배지(8)에 접종하고 28°C에서 완전히 포자가 형성될 때까지 배양하였다.

### 내독소의 분리

Cheung와 Hammock의 방법(9)을 사용하고 8500 ×g에서 30분간 원심분리하여 내독소를 분리하였다. 분리된 내독소는 10 mM EDTA 용액에 현탁시킨 후 -20°C에 보존하면서 사용하였다.

### 단백질 정량 및 LC<sub>50</sub> 측정

내독소의 정량은 Lowry 등의 방법(10)에 따라 측정하였으며, LC<sub>50</sub> (50% lethal concentration)는 Reed와 Muench 방법(11)에 따라 산출하였다. 이 때 사용된 모기유충은 본 실험에서 사육한 *Aedes aegypti*의 알을 28°C에서 부화시키고 4일간 사육하여 미리 증류수로 현탁시킨 내독소단백질에 10마리의 모기유충을 넣고 25°C에서 48시간까지 관찰하였다.

### 내독소의 화학적 처리

유기용매의 처리는 내독소를 증류수에 20 µg/ml가 되도록 현탁시켜서 유기용매를 각각 50%가 되도록 첨가시켰으며, 변성제에 대한 처리는 8 M urea, 8 M guanidine·HCl 및 60% urografin을 각각 동일한 양으로 내독소 현탁액과 섞었으며, 계면활성제에 대한 처리는 내독소 현탁액에 계면활성제를 각각 0.5%와 5.0%가 되도록 가하여 25°C에서 12시간 방치하였다.

그 후 유기용매와 변성제 및 계면활성제로 처리된 내독소는 증류수를 가하여 원심분리함으로써 화학약제를 제거시키는 조작을 3회 반복하였다.

### Sulfhydryl기의 변형

Pfannenstiel 등의 방법(12)을 다소 변형시킨 것

으로 dithioerythritol이 함유된 0.2 M carbonate buffer(pH 9.0)로 내독소를 4°C에서 하룻밤 동안 용해시켜서 disulfide기를 유리시켰다. 200 µg/ml의 용해된 내독소는 2 mM 2,2'-dithiodipyridine, 0.4 mM dithio-bis(2-nitro benzoic acid), 0.004% 1,3-propane sulfone, 4 mM iodoacetamide 및 4 mM mercuric chloride를 각각 1 : 1(v/v)로 섞은 후 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 반응용액에 진한 초산용액을 pH 4.5가 될 때까지 첨가하여, 생성된 침전물은 원심분리(13000 ×g, 30 min, 4°C)시켜서 여분의 화학약제와 초산을 제거하고 다시 증류수에 현탁하여 침전물을 원심분리(2회)하고 증류수에 5배씩 단계별로 희석시킨 후 nitrogen gas를 주입하여 모기유충에 대한 LC<sub>50</sub>를 산출하였다.

### Lysine기의 변형

내독소는 0.1 N NaOH 용액내에서 4°C를 유지하면서 하룻밤 동안 용해되었다. 400 µg/ml의 용해된 독성단백질은 Kimmel의 방법(13)에 따라 o-methyl-isourea로 guanidination시키고, dansylation은 dansyl chloride를 6 mg/ml acetone에 용해시킨 후 Pfannenstiel 등의 방법(12)에 따라 4°C에서 1시간 동안 처리시켰다. 그 후 상기와 동일한 방법으로 LC<sub>50</sub>를 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 유기용매에 대한 안정성

내독소를 유기용매로 처리함으로써 powder로 만들어 저장하기 쉽게 하기 위하여 Btd균주의 내독소가 상온에서 유기용매에 노출되었을 때 그 안정성을 조

**Table 1. Stability of delta-endotoxin by treatment of organic solvent**

Organic solvent	LC <sub>50</sub> (µg/ml)
None	0.175
Methanol	0.455
Aceton	0.143
Carbon tetra-chloride	above 2.000
Ethyl ether	0.309

The 20 µg/ml delta-endotoxin was treated with the same volume of organic solvent at 25°C for 12 hr.

사해 본 결과 acetone에서는 독력이 가장 잘 유지되었으나, carbon tetra-chloride에서는 그 독력을 완전히 소실하였다(Table 1).

#### 변성제에 대한 안정성

내독소의 분리를 위해 사용되는 sodium bromide (13)와 urografin(14) 및 단백질 변성제인 urea와 guanidine·HCl에 Btd균주의 내독소가 처리되었을 때 단지 guanidine·HCl만이 내독소의 독력을 크게 약화시켰다(Table 2).

#### 계면활성제에 대한 안정성

Btd균주의 내독소가 계면활성제로 처리되었을 때 중성인 triton X-100은 내독소의 독력에 변화를 주지 않았으나, 음이온인 SDS(sodium dodecyl sulfate)와 양이온인 TTAB(tetradecyl trimethyl ammonium bromide)는 그 독력을 크게 소실시켰다(Table 3). 이는 Bti균주의 내독소를 용해시켜서 유기용매, 변성제 및 계면활성제로 처리하여 모기유충에 대한 독력을

**Table 2. Stability of delta-endotoxin by treatment of denaturant**

Denaturant	LC <sub>50</sub> (μg/ml)
None	0.143
Sodium bromide	0.146
Urea	0.146
Guanidine·HCl	0.894
Urografin	0.179

The 20 μg/ml delta-endotoxin was treated with the same volume of denaturant at 25°C for 12 hr.

**Table 3. Stability of delta-endotoxin by treatment of detergent**

Detergent	% Larval mortality*	
None		100
Triton X-100	0.5%	102.3
	5.0%	98.7
SDS	0.5%	65.8
	5.0%	58.5
TTAB	0.5%	18.2
	5.0%	0.0

\*Larval mortality was determined with intact crystals at 10 μg/ml. Abbreviations; SDS: sodium dodecyl sulfate, TTAB: tetradecyl trimethyl ammonium bromide.

시험한 Pfannenstiel 등(12)의 결과와 아주 유사하였다.

#### Thiol reagents에 의한 내독소의 용해도 및 식이법

Btd균주의 내독소가 thiol reagents를 함유한 알칼리 용액에서 용해되었다. 그 결과 0.1 N NaOH에 내독소를 용해시킨 경우가 76.7%로서 용해도가 가장 컸으나, LC<sub>50</sub> 측정에서 dithioerythritol을 함유한 0.2 M carbonate buffer(pH 9.0)에서 내독소를 용해한 경우가 모기유충에 대한 가장 강한 독성을 나타내었다(Table 4). 이는 dithioerythritol에 의한 내독소의 용해도가 다른 thiol reagent에 비해 크기 때문이라고 생각된다. 따라서 25 mM dithioerythritol을 함유한 carbonate buffer에 내독소를 용해(4°C, 하룻밤)시킨 후 Schnell 등(15)의 방법에 따라 용해된 내독소를 latex beads(φ0.8 μm; Sigma Chem. Co.)에 흡착시킨

**Table 4. Solubility of delta-endotoxin**

Reagent	LC <sub>50</sub> (μg/ml)	Solubility (%)
0.1 N NaOH	2.36	76.7
25 mM Na-thioglycolate	6.25	13.9
25 mM Dithiothreitol	none toxic	13.9
25 mM Dithioerythritol	0.449	54.4
0.2 M Potassium thiocyanate	none toxic	27.8
2% 2-mercaptoethanol	10.0	22.2

Delta-endotoxin was solubilized in 0.2 M carbonate buffer (pH 9.0) containing each thiol reagent at 4°C overnight, and precipitation of toxic protein with acetic acid was introduced into test tubes for feeding on mosquito larva after treatment of nitrogen gas.

**Table 5. Treatment of solubilized delta-endotoxin for feeding of mosquito larvae**

Treatment condition	LC <sub>50</sub> (μg/ml)
Precipitated toxic protein with acetate	0.94
Precipitated toxic protein with acetate + N <sub>2</sub> gas	0.47
Solubilized toxic protein in Latex beads	4.36
Solubilized toxic protein in Latex beads + N <sub>2</sub> gas	3.43
Solubilized toxic protein only	65.7

Delta-endotoxin was solubilized in 0.2 M carbonate buffer (pH 9.0) containing 25 mM dithioerythritol at 4°C overnight.

구와 Angus의 방법(16)에 따라 초산으로 침전시킨 구로 나누어서 각각 모기유충에 투여하여 그 감수성을 시험하였다(Table 5). 그 결과 용해된 내독소보다는 초산으로 침전시키거나 latex beads에 흡착시키면 모기유충에 대한 독력이 강하게 나타났으며, 이는 용해된 내독소의 독력이 약화된 것이 아니라 모기유충이 filter feeder임으로 독소단백질에 대한 감수성 때문에 용액상태보다 latex beads의 흡착이나 초산에 의한 침전상태가 용해된 내독소보다 더욱 강하게 독력을 나타낸다고 사료된다.

### Sulfhydryl기의 변형

Bt균주의 내독소에 대한 독작용의 주요 radical을 검토하고자 25 mM dithioerythritol을 함유한 0.2 M carbonate buffer(pH 9.0)에서 내독소의 disulfide 결합이 절단(4°C, 하룻밤)되었다. 그 후 용해된 내독소의 sulfhydryl기를 화학적으로 변형시켜서 그 독성의 변화를 조사해 본 결과 독력의 변화는 거의 나타나지 않았다(Table 6).

**Table 6. Toxicity of solubilized delta-endotoxin on sulfhydryl group modifying agent**

Reagent	Modification	% Toxicity*
Dithioerythritol	Disulfide cleavage	100
2,2'-dithiopyridine	Disulfide interchange	60.9
5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	Blocks sulfhydryls	106.7
1,3-propane sultone	Blocks sulfhydryls	87.9
Iodoacetamide	Blocks sulfhydryls	72.1
HgCl <sub>2</sub>	Blocks sulfhydryls	832.5

\*Percent toxicity =  $LC_{50}$  (untreated toxin) /  $LC_{50}$  (modified toxin). Delta-endotoxin was solubilized in 0.2 M carbonate buffer (pH 9.0) containing 25 mM dithioerythritol before modification of sulfhydryl group. Nitrogen gas was introduced into all solubilized toxic protein before test of toxicity.

**Table 7. Toxicity of delta-endotoxin on lysine group modifying agent**

Reagent	μg of reagent/μg of protein	Modification	% Toxicity*
o-Methyisourea	0.05	Guanidination	3.2
Dansyl chloride	0.04	Dansylation	39.3
	1.20		below 3.1

\*Percent toxicity =  $LC_{50}$  (untreated toxin) /  $LC_{50}$  (modified toxin). Delta-endotoxin was solubilized in 0.1 N NaOH at 4°C for 12 hr before modification of lysine.

### Lysine기의 변형

Btd균주의 내독소를 0.1 N NaOH로 4°C에서 하룻밤 동안 용해시킨 후 유리된 lysine의 ε-amide기를 변형시켜서 그 독력을 조사하였다(Table 7). 그 결과 guanidination과 dansylation 모두에서 독력이 대단히 약화되었다. 따라서 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 같은 나방류에 특이적으로 독작용하는 내독소는 sulfhydryl기가 그 활성화에 중요하나(18, 19), 모기유충에만 선택적으로 독성을 나타내는 Bti균주의 내독소는 lysine기가 독성에 필수적이라는 결과(12)와 동일하게 Btd균주의 내독소도 lysine기를 변형시켰을 때 그 독력이 크게 소실되었다.

## 요 약

*B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2의 내독소에 대한 화학적 처리에서 고농도의 중성염(4 M NaBr), 유기용매(50% acetone), 변성제(4 M urea) 및 중성 계면활성제(10% triton X-100)로 내독소를 처리하였을 때 모기유충에 대한 독력의 소실이 거의 나타나지 않았으나, guanidine·HCl이나 CCl<sub>4</sub> 또는 양이온 및 음이온 계면활성제로 처리함으로써 그 독력이 크게 소실되었다. 또한, 내독소의 sulfhydryl기의 변형은 모기유충에 대한 독력에 영향을 나타내지 못하였으나, lysine기의 변형으로 내독소의 독력이 거의 완전히 소실되었다.

## 감사의 말

본 연구는 1990년도 한국과학재단 학술연구조성비(과제번호: KOSEF 891-0407-063-2)에 의해 연구되었음을 알려드리며 관계되시는 분들께 깊이 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Goldberg, L.J. and J. Margalit: *Mosquito News*, **37**, 355 (1977)
2. De Barjac, H.: *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.*, **286**, 797 (1978)
3. Pfannenstiel, M.A., E.J. Ross, V. C. Kramer and K.W. Nickerson: *FEMS Microbiol. Lett.*, **21**, 39 (1984)
4. Yamamoto, T., T. Iizuka and J.N. Aronson: *Curr. Microbiol.*, **9**, 279 (1983)
5. Thomas, W.E. and D.J. Ellar: *J. Cell. Sci.*, **60**, 181 (1983)
6. Kim, K.H., M. Ohba and K. Aizawa: *J. Invertebr. Pathol.*, **44**, 214 (1984)
7. Drobniowski, F.A. and D.J. Ellar: *J. Bacteriol.*, **171**, 3036 (1989)
8. Hwang, J.Y. and K.H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 425 (1987)
9. Cheung, P.Y. and D. Hammock: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 984 (1985).
10. Lowry, O.H., H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
11. Reed, L.E. and H. Muench: *Amer. J. Hyg.*, **27**, 493 (1938)
12. Pfannenstiel, M.A., G.A. Couche, G. Muthukumar and K.W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1196 (1985)
13. Kimmel, J.R.: *Methods Enzymol.*, **11**, 584 (1967)
14. Ang, B.J. and K.W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 625 (1978)
15. Sharpe, E.S., K.W. Nickerson, L.A. Bulla, Jr. and J.A. Aronson: *Appl. Microbiol.*, **30**, 1052 (1975)
16. Schnell, D.J., M.A. Pfannenstiel and K.W. Nickerson: *Science*, **223**, 1191 (1984)
17. Angus, T.A.: *Can. J. Microbiol.*, **2**, 416 (1956)
18. Nickerson, K.W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1305 (1980)
19. Schesser, J.H., K.J. Kramer and L.A. Bulla, Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 878 (1977)

(Received March 18, 1991)