

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1 CryIIA

내독소 단백질 유전자의 클로닝 및 발현

Cloning and Expression of an Insecticidal Crystal Protein CryIIA Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1

金祐山¹ · 金尙賢² · 諸連鎬¹ · 柳鏞萬¹ · 徐淑才³ · 姜錫權¹ · 趙鏞涉⁴

Ho San Kim¹, Sang Hyun Kim², Yeon Ho Je¹, Yong Man Yu¹,

Sook Jae Seo³, Seok Kwon Kang¹, and Yong Sup Cho⁴

ABSTRACT The CryIIA gene encoding the insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 has been cloned in *Escherichia coli*, and its nucleotide sequences were determined completely. 5kb Hind III fragment harboring CryIIA gene was screened in the large ca. 225kb plasmid DNA by southern blot. Hind III digested 5kb fragment was ligated into pUC19 and transformed in *E. coli*. The 4kb BamHI-Hind III fragment containing the CryIIA gene was subcloned and named pSKIIA. DNA sequence analysis demonstrates that pSKIIA is the gene of an operon which is comprised of three open reading frames (designated orf1, orf2 and orf3). The CryIIA gene is composed of 3,952bp-long BamHI-Hind III DNA restriction fragment. The orf3 code for a polypeptide of 633 amino acid residues. The protoxin protein has a predicted molecular weight of 70,780. The *E. coli* derived protoxin gene product is biologically active against three species of Lepidopteran (*Plutella maculipennis*, *Heliothis assulta*, *Spodoptera litura*) and a species of Dipteran (*Culex pipines*) larvae in bioassay.

KEY WORDS *Bacillus thuringiensis*, cloning, sequence, crystal protein, Lepidopteran and Dipteran bioassay

초 록 *Bacillus thuringiensis* Subsp. *kurstaki* HD-1으로 부터 생산된 살충성 내독소 단백질을 coding 하는 CryIIA 유전자를 클로닝하고 염기서열을 조사하였다. HD-1 균주의 12개 plasmid 중 225kb plasmid를 분리하여 CryIIA 유전자를 포함하는 5kb Hind III 절편을 hybridization하여 찾아냈다. 이 절편을 plasmid pUC19에 ligation하여 *E. coli*에 형질 전환하였다.

이 독소 유전자를 포함하는 4kb BamHI-Hind III 절편은 vector pT7-5에 ligation하여 pSKIIA라 하였다. pSKIIA는 3개의 open reading frames(orf1, orf2, orf3)로 구성되어 있으며 염기서열은 3,952base로 되어 있었다. 이러한 3개의 orf 각각의 발현 여부를 확인하기 위하여 생물검정을 하였다. 그러나 orf1 또는 orf2에 의한 형질 전환체는 독성이 없는 것으로 나타났다. orf3를 포함하는 형질 전환체는 3종의 나비목 곤충(배추좀나방, 담배거세미나방, 담배나방) 및 1종의 파리목 곤충(집모기) 유충에 대하여 독성을 나타내었다.

검 색 어 *Bacillus thuringiensis*, 클로닝, 염기서열, 내독소 단백질, 나비목 및 파리목의 생물 검정

1 서울대학교 농업생명연구소 연구센터(Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University)

2 농촌진흥청 잠업시험장(Sericultural Experiment Station, RDA)

3 경상대학교 자연과학대학(College of Natural Sciences, Gyeong Sang National University)

4 서울대학교 농업생명과학대학(College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University)

최근 미생물 살충제로서 가장 많이 사용되고 있는 것은 *Bacillus thuringiensis* 균주이다. 곤충 병원성 세균인 *B. thuringiensis*는 포자 형성시 내독소 단백질(parasporal inclusion, parasporal body, crystal)을 생산한다. 이 내독소 단백질은 나비목, 파리목 및 딱정벌레목의 유충에 대하여 독성을 나타낸다(Dulmage & Rhodes 1971, Goldberg & Margalit 1977, Krieg et al. 1983). 나비목 유충에 대한 이러한 내독소 단백질의 독성의 경우 대부분 130~140kDa의 분자량으로 확인되었다. 이러한 protoxin(P1)은 곤충의 소화액 또는 trypsin과 같은 것으로 처리되었을 때 50~70kDa의 활성단백질로 남게 된다. 또한 어떤 *B. thuringiensis*의 균주는 P1 독소 단백질 뿐만 아니라 제 2의 독소 단백질(P2)도 생산하는데 이는 P1과는 다르게 나비목 및 파리목에 대하여 동시에 독성을 나타낸다(Yamamoto & McLaughlin 1981). 이 균주는 cuboidal형태의 내독소 단백질을 생산하며 분자량이 66kDa이다.

Donovan(1988) 등은 subsp. *kurstaki* HD-1 균주로부터 P2 유전자를 분리하여 *B. megaterium* 균주에 형질 전환하였으며 분자량이 66kDa인 내독소 단백질의 생산을 확인하였고 나비목 및 파리목에 대하여 독성도 증명하였다.

본 연구는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주의 내독소 단백질 유전자를 분리하고, Cloning 및 염기서열을 결정하였다. 또한 나비목 및 파리목 유충에 대하여 생물검정을 행하였으며, 이 유전자의 몇가지 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1 균주는 미국 농무성의 Faust박사로부터 분양받아 본 실험에서 보관중인 것을 사용하였다. *Escherichia coli* MC1061, JM109 및 BL21(DE3) 균주는 미국 캘리포니아 대학의 Boyer박사로부터

분양받아 사용하였다. 한편 *E. coli* 및 *B. thuringiensis*에 사용된 배지는 L.B 및 G.Y.S (Glucose Yeast Extract Salt)였다.

내독소 단백질의 분리

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1의 내독소 단백질의 분리는 균체를 5일 동안 30°C로 G.Y.S배지에서 배양한 다음 원심분리하여 얻은 침전물을 1M NaCl 용액에 0.01% Triton X-100을 첨가하여 3회 세척하였다. 균체를 초음파로 교반한 후 Renografin 60(E.R. SQUIBB and Sons. Inc.)으로 25%, 50%, 65%, 75%의 불연속 중층 밀도 구배를 만들어 초원심분리하여 내독소 단백질을 분리하여 사용하였다.

Plasmid DNA의 분리

E. coli 및 *B. thuringiensis* 균주로부터 plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis방법(Brinboim & Doly 1979)을 일부 수정하여 사용하였다. 일정 시간 배양한 균체를 회수하여 10ml의 Sol. I 용액(50mM Glucose, 25mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA)을 넣고 균체를 lysis시킨 다음 세로로 만든 20ml의 Sol. II 용액(0.2N NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 균질화시킨 다음 얼음속에 10분간 정치하였다. 15ml의 Sol. III 용액(5M Potassium acetate 60ml, Glacial acetic acid 11.5ml, 멸균증류수 28.5ml)을 넣어 천천히 섞은 다음 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 얻어진 DNA는 농도를 측정하여 사용하였다.

내독소 단백질 유전자의 cloning

B. thuringiensis HD-1의 균주로부터 내독소 단백질 유전자의 Cloning은 Masson(1990)등의 방법을 일부 수정하여 행하였다. 순수하게 분리된 plasmid DNA은 제한효소인 Hind III로 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. Agarose gel에서 분리된 5kb Hind III절편은 pUC19 vector에 ligation하여 *E. coli* JM109균주에 형질 전환하였다. Recombinant clone을 분석하기 위해 내독소 단백질 유전자를 포함하는 제조합 DNA

를 순수 분리하고 4kb BamHI-HindIII 절편을 subcloning하여 pSK II A라 하였다. pSK II A의 염기서열 분석 결과 open reading frame이 orf1, orf2 및 orf3의 세부분으로 결정되었다. 각 orf의 역할을 확인하기 위하여 pT7-5 및 pT7-6 vector를 사용하여 subcloning을 하였다. Gel blotting 및 DNA hybridization은 이미 보고된 Southern(1975)의 방법을 사용하였다.

SDS-PAGE

재조합 DNA가 삽입된 발현백터를 함유하고 있는 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 Ampicillin (100 μ g/ml)이 들어 있는 L.B배지에서 16시간 배양하여 원심분리하였다. 얻어진 침전물은 50mM Tris-HCl, pH7.4로 균체를 씻고 초음파를 사용하여 세포를 파괴하였다. 이 세포 추출물은 Laemmli(1970)가 이미 보고한 것과 같이 10% SDS-PAGE에 의하여 분석되었다. Gel은 0.4% Coomassie blue R 250으로 염색하였다.

독성검정

Cry II A 유전자를 갖고 있는 *E. coli* BL21 (DE3) 형질 전환체는 Ampicillin 및 IPTG가 들어 있는 L.B 배양액에서 37 $^{\circ}$ C로서 16시간 배양하였다. 집균된 형질 전환체는 0.1M Sodium phosphate buffer(pH7.4)로 세척한 후 초음파를 사용하여 세포를 파괴하여 시료로서 사용하였다. 공시 유충으로서는 나비목에 배추좀나방(*Plutella Xylostella*), 담배나방(*Helicoverpa assulta*), 담배저세미나방(*Spodoptera litura*)의 3령 유충을 사용하였다. 또한 파리목 곤충으로서는 집모기 유충(*Culex pipiens*)을 사용하였으며, 시료 200 μ l을 증류수 10ml에 희석하여 20마리의 3~4일된 유충을 넣고 24시간후 사망율을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Cry II A 유전자의 특성 및 클로닝

Kronstad등(1983)은 *Bacillus thuringiensis*의

22균주로부터 plasmid DNA를 추출 비교·분석하였다. Plasmid DNA의 수는 1개인 Subsp. sotto균주로부터 12개인 Subsp. *kurstaki* HD-1균주에 까지 다양하게 나타났다. 또한 Subsp. *kurstaki* HD-1 Dipel은 13개의 plasmid DNA를 갖고 있는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 Yamamoto등(1988)이 wildtype균주와의 차이점으로 지적하였다.

본 실험에서 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주로부터 분리한 plasmid DNA는 Fig. 1에서 볼 수 있는 것과 같이 몇개의 밴드로 나타내고 있다. 이것으로부터 내독소 단백질을

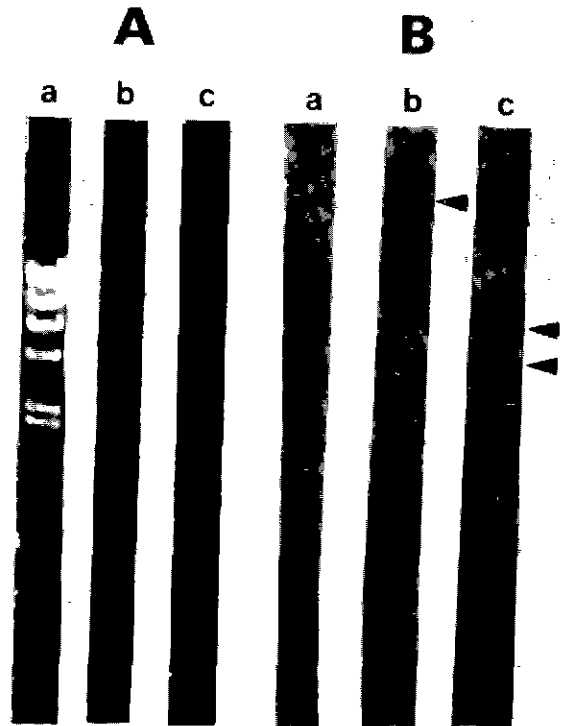


Fig. 1. Plasmid DNA of entomocidal *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1. The plasmid contents of the *B. thuringiensis* strain were analyzed on a 0.7% agarose gel.

A: DNA separation of *B. thuringiensis* strain HD-1
B: Southern blot hybridization of DNA from panel A. Lane a, λ HindIII: lane b, total DNA from *B. thuringiensis* HD-1 strain: lane c, DNA digested by HindIII from lane b.

coding하는 Cry II A 유전자를 탐색하기 위하여 인공 합성한 18-mer oligonucleotide probe를 사용한 hybridization에서 화살표로서 표시한 것 같이 wildtype의 경우 225kb plasmid에 (Fig. 1. Bb), 그리고 이것을 Hind III로 처리한 경우는 5kb 및 9kb의 절편에서 2개의 밴드가 관찰되었다 (Fig. 1. Bc), 이러한 결과는 이미 보고된 Widner & Whiteley(1989)의 결과와 일치하였다. 또한 Donovan 등(1988)의 보고와도 일치하는데 5kb는 cryB1으로 9kb를 cryB2로 표시하였다. 이러한 두 유전자는 87%의 아미노산 상동성을 나타내고 있으나 cryB1의 경우 나비목인 *Manduca sexta* 및 파리목인 *Aedes aegypti* 유충에 대하여 독성이 있는 단백질을 생산하는 반면, cryB2는 나비목 유충에만 독성을 나타낸다. 이러한 사실로 하나의 polypeptide가 두종의 유충에 동시 독성을 나타내는 작용기작에 대하여 관심이 모아진다.

이러한 정보를 기초로 하여 pUC19 vector DNA의 Hind III 절단 부위에, HD-1의 plasmid DNA를 Hind III로 절단하여 분리한 5kb 절편을 ligation하였다. 선택 배지상에서 얻어진 *E. coli*의 형질 전환체의 DNA를 분리하여 clone된 유전자의 존재를 확인하기 위하여 hybridization으로 조사한 결과 CryIIA 유전자의 존재를 확인하고 4kb BamHI-Hind III 절편을 subcloning하여 pSKIIA로 명명하였다 (Fig. 2).

Cry II A 유전자의 염기서열 결정

Clone된 내독소 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 4kb BamHI-Hind III 절편의 염기서열을 결정하였다. pSKIIA는 3,952 염기로 구성되어 있으며, 3개의 open reading frame(orf)이 존재하는 operon 구조임을 알 수 있었다 (Fig. 3). 또한 orf1은 175개 아미노산, orf2는 252개 아미노산, 그리고 orf3는 633개의 아미노산으로 구성되어 있음을 확인하였다. 이것은 65kDa는 내독소 단백질을 code하는데 충분한 orf로 추측된다. 최근 Schnepf(1985) 등

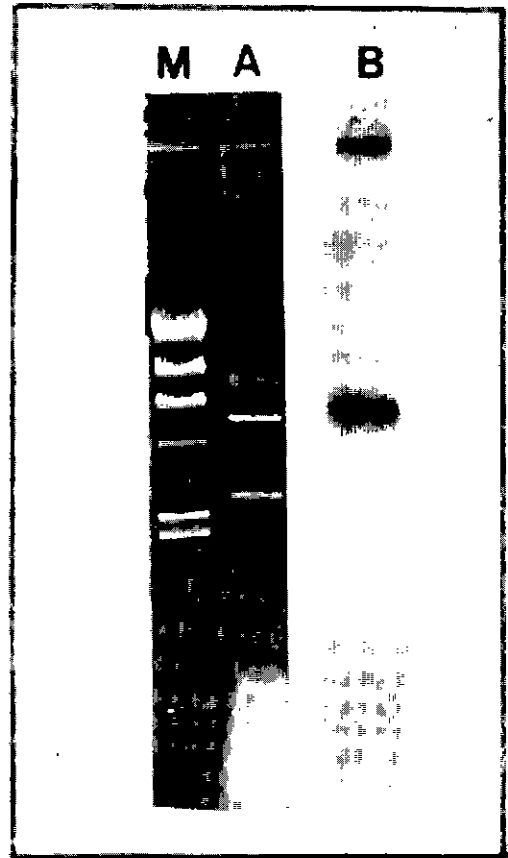


Fig. 2. Location of sequences homologous to the *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1(Btk) probe in pSKIIA.

(A) Photograph of EtBr stained agarose gel showing pSKIIA cut with BamHI-HindIII (B) Autoradiograph resulting from Southern hybridization of the Btk probe to blot of gel in (A).

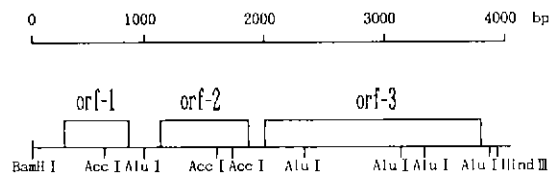


Fig. 3. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequence for the CryIIA gene portion of the operon from *Bacillus thuringiensis* HD-1.

도 HD-1 Dipel로부터 내독소 단백질 유전자를 결정하였다. 또한 3개의 open reading frame

의 transcription과 translation 방향도 Kondo (1987) 등이 보고한 것과 같으며, 내독소 단백질 유전자의 조절부위에 공통적으로 존재하는 강력한 ribosome결합 부위와 transcription termination signal로서 작용하는 inverted repeats sequence도 확인하였다. orf1과 orf2의 분자량은 각각 19,960Da와 29,080Da이고 orf3은 70,780Da로 추정된다.

*E. coli*에서 CryIIA 유전자의 발현

pSKIIA를 구성하는 3개의 open reading frame의 각각의 기능을 조사하기 위하여 pT7-5 및 pT7-6 vector에 ligation하여 *E. coli*에 형질 전환하였다. orf1은 pT7-6의 SmaI-BamHI site에 대하여 pSKIIA의 BamHI-AluI 절편을 분리한 다음, ligation하였다(Fig. 4. A). orf2는 pT7-5의 SmaI-BamHI site에 pSKIIA의 AluI 1kb 절편을 elution한 후 Sau3A로 처리하여 li-

gation하였다(Fig. 4. B). orf3는 pT7-5의 SmaI-HindIII site에 pSKIIA의 AccI 절편을 HindIII로 처리하여 약 2.3kb를 subcloning하여 pSKIIA-3이라 명명하였다(Fig. 4. D). 한편 pSKIIA(orf1, orf2, orf3)는 pT7-5에 ligation하였다(Fig. 4. C). 각각의 vector를 *E. coli* 균주에 형질 전환하여 선발된 균주로부터는 내독소 단백질의 형상을 위상차현미경하에서는 관찰할 수 없었다.

형질 전환체에서 CryIIA 유전자의 발현을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 행하였다(Fig. 5). Wildtype인 HD-1의 내독소 단백질은 분자량이 130kDa 및 65kDa로 나타났다(Fig. 5. 1). 그러나 형질 전환체인 *E. coli* BL21(DE3) 균주의 추출물은 전기영동 분석상으로는 이 두 개(130kDa, 65kDa)와 비슷한 밴드는 보이지 않았다.

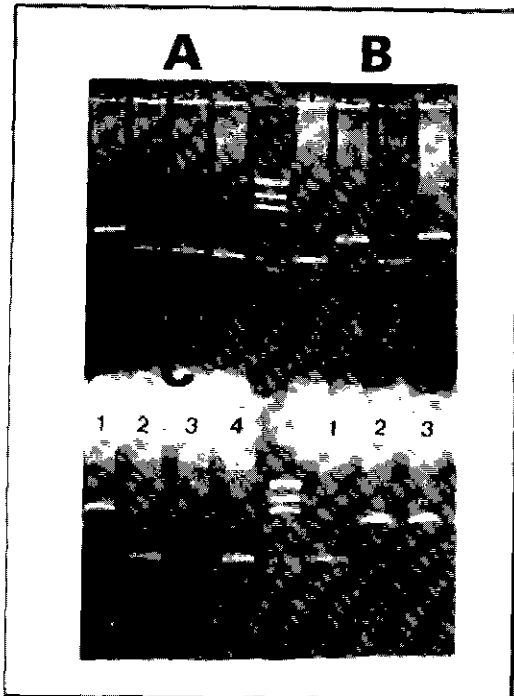


Fig. 4. Subcloning of the pSKIIA into *E. coli* expression vector pT7-5 and pT7-6. (A) ORF1+pT7-6 (lan 1) (B) ORF2+pT7-5(lane 2, 4) (C) pSKIIA +pT7-5(lane 1) (D) ORF3+pT7-5(lane 2, 3)

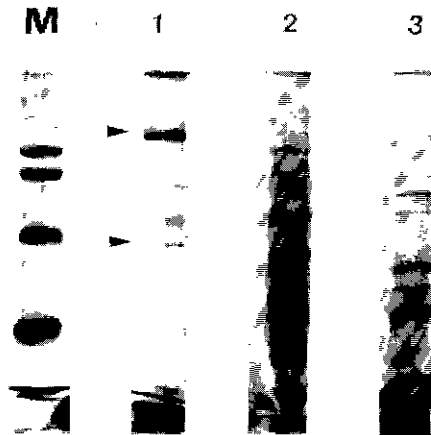


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis profiles of crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1. lane 1, purified protein from *B. thuringiensis* HD-1; lane 2, *E. coli* harboring pSKIIA; lane 3, *E. coli* BL21(DE3).

형질 전환체의 특성검정

감수성 곤충에 대한 생물검정을 수행하기 위하여 형질 전환체인 SKIIA-1, SKIIA-2, SKIIA-3 및 대조군으로 HD-1, *E. coli* BL21(DE3)를 사용하였다. 형질 전환 균주는 Ampicillin 및

Table 1. Assays for toxicity of extracts purified from recombinant *E. coli* strains

Strain	Cloned gene	Tested larvae			
		<i>P. maculipennis</i>	<i>H. assulta</i>	<i>S. litura</i>	Dipteran <i>C. pipiens</i>
HD-1	—	+++	+++	++	+
SK II A-1	<i>orf1</i>	—	—	—	—
SK II A-2	<i>orf2</i>	—	—	—	—
SK II A-3	<i>orf3</i>	+++	+++	—	+
SK II A	<i>orf1, orf2, orf3</i>	+++	+++	—	+
<i>E. coli</i>	—	—	—	—	—
BL21(DE3)	—	—	—	—	—

+, ++, +++; toxic effects for microbial pesticidal

cillin 및 IPTG가 들어 있는 배양액에서 증식시킨 후 사용하였다. 공시충으로서는 3종의 나비목과 1종의 파리목 곤충을 사용하였다(Table 1).

그 결과 *orf1*과 *orf2*는 공시충에 대하여 독성을 나타내지 않았다. 그러나 SK II A와 *orf3*의 독성은 100% 정도의 사망율을 보였다. 이러한 결과는 *orf3*이 독소 단백질에 관여하고 있음을 증명해 준다. 한편 담배나방 유충은 B.t에 대한 저항성이 높은 것으로 보고되고 있다. 우리는 CryIIA 유전자의 특성을 조사하여 나비목 곤충에 저항성인 형질 전환체 식물을 만들기 위하여 연구를 계속 수행하고 있다.

사 사

이 연구는 교육부 유전공학 연구비와 서울대학교 농업연구소재 연구센터 지원에 의하여 수행된 것이다.

인 용 문 헌

- Birnboim, J.C. & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513~1523.
- Carlton, B.C. & J.M. Gonzalez, Jr. 1985. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*, p. 211~249. In D.A. Dubnau(ed.), *The molecular biology of the bacilli*, Vol. 2. Academic Press, Inc., New York.
- Donovan, W.P., C.C. Dankocisk, M.P. Gilbert, M.C. Gawron-Burke, R.G. Grot & B.C. Carlton. 1988.

Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. *J. Biol. Chem.* 263: 561~567.

Dulmage, H.T. & R.A. Rhodes. 1971. Production of pathogens in artificial media, p. 507~540. In H.D. Burgess and N.W. Hussey(ed.), *Microbiol control of insects and mites*, Academic Press, Inc., New York.

Goldberg, L.J. & J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles serengetii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Ades aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 37: 355~358.

Kondo, S.I., N. Tamura, A. Kunitate, M. Hattori, A. Akashi & I. Ohmori. 1987. Cloning and Nucleotide Sequencing of two insecticidal δ -endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 DNA. *Agric. Biol. Chem.* 51: 455~463.

Krieg, V.A., A.M. Huger G.A. Langenbruch & W. Schnetter. 1983. *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of coleoptera. *Z. Angew. Entomol.* 96: 500~508.

Kronstad, J.w., H.E. Schnepf & H.R. Whiteley. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.* 154: 419~428.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*. 227: 680~685.

Masson, L., G. Prefontaine, L. Peloquin, P.C. K. Lau & R. Brousseau. 1990. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269: 507~512.

Nichollas, C. & D.J. Ellar. 1989. Cloning and expression of an entomocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis galleriae* toxic to both lepidop-

- tera and diptera. FEMS. Micro. Lett. 59: 197~202.
- Schnepf, H.E., H.C. Wong & H.R. Whiteley. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. 260: 6264~6272.
- Southern, E.N. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503~517.
- Widner, W.R. & H.R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. 171: 965~974.
- Yamamoto, T., A. Ehmann, J.M. Gonzalez & B.C. Carlton. 1988. Expression of three genes coding for 135kDa entomocidal proteins in *B. thuringiensis kurstaki*. Curr. Microbiol. 17: 5~12
- Yamamoto, T. & R.E. McLaughlin. 1981. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103: 414~421.

(1993년 3월 31일 접수)