

***Bacillus thuringiensis*의 주입에 의해 유도된 담배나방의 항세균 단백질의 정제**

유종명 · 정성은 · 이형철

한남대학교 이과대학 생물학과

담배나방(*Heliothis assulta*) 혈림프 항세균성 단백질의 특성을 알아보기 위해 종령 유충의 혈강으로 *Bacillus thuringiensis* 균을 주입하였다. 혈림프의 항세균적 활성은 주입 후 48시간 경과군에서 가장 높았으며, *E. coli*와 *B. thuringiensis*에 대하여 항세균성을 보이는 두 개의 단백질(G-I 및 G-II)들을 cation exchange chromatography와 gel filtration을 통해 정제하였다. 49KD와 46KD의 두 subunit로 구성된 G-I은 높은 glycine(17.13 mole %) 및 alanine(13.88 mole %) 함량을 보였으며, 14KD의 단일 polypeptide인 G-II에서는 histidine(16.14 mole %)과 glycine(14.27 mole %)의 함량이 높아, 이러한 높은 glycine 함량에 있어서 곤충에서 나타나는 다른 항세균성 단백질과 공통점을 보인다.

KEY WORDS: *Heliothis assulta*, *Bacillus thuringiensis*, *E. coli*.
Antibacterial protein

곤충에서는 체벽의 손상이나 세균 등 이물질의 침입시에 체액성 면역의 일환으로서 항세균 물질(antibacterial substance)들이 유도 생성되며 이들의 생화학적 특성은 감염체의 종류 및 곤충 종에 따라 차이를 보인다(Natori, 1977; Hoffman, 1980; Dunn, 1986; Andersons *et al.*, 1990; Spence *et al.*, 1992; Marchini *et al.*, 1993).

곤충의 체액성 면역(humoral immunity)에서 항세균적 활성을 나타내는 단백질들은 생성 곤충 및 물리화학적 특성 그리고 antibacterial spectrum에 따라 cecropin(Hultmark *et al.*, 1980; Morishima *et al.*, 1990), attacin(Hultmark *et al.*, 1983; Engström *et al.*, 1984), sarcotoxin(Baba *et al.*, 1987; Kanai & Natori, 1990), apidaecin(Casteels *et al.*, 1989) dipterin(Keppi

et al., 1989; Dimarcq *et al.*, 1990; Reichhart *et al.*, 1992), defensin(Lambert *et al.*, 1989; Dimarcq *et al.*, 1990) 등의 여러가지 이름으로 보고되고 있으며, 이들은 세균 세포벽의 peptidoglycan 합성 대사를 저해하거나(Ando & Natori, 1988), ion channel(Boman *et al.*, 1991)에 작용함으로써 용균현상을 일으킨다.

곤충을 치사시키는 대표적인 entomopathogen으로 알려진 Gram 양성인 *Bacillus thuringiensis*는 spore 형성시기에 toxic crystal protein을 생성하며 나비목, 파리목 그리고 딱정벌레목 등의 곤충 장으로의 이입시에 독성물질로 작용하는데(Jarrett, 1985; Chilcott & Wigley, 1993), 이러한 *Bacillus thuringiensis*의 혈강내에 주입에 따라 나타나는 곤충의 방어기전 및 생리·생화학적 특성 또한 관심의 대상이 되는 바, 이에 관한 연구는 *Locusta migratoria*의 혈강으로 *Bacillus thuringiensis*의 주입시에 비록 *E. coli* 나 *P.*

본 연구는 1992-1993년도 한남대학교 기초과학연구소 연구비 지원에 의한 것임.

aeruginosa 같은 다른 세균의 주입시 보다는 낮으나 항세균적 활성이 나타나며 생화학적 변화가 수반된다는 보고(Hoffman, 1980) 이외에는 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 *B. thuringiensis*를 주입시킨 담배나방(*Heliothis assulta*) 혈림프의 항세균적 활성을 확인하고, 이때 유도 생성된 단백질을 분리 정제하였으며 정제된 항세균성 단백질의 항세균적 활성 비교 및 단백질의 특성을 조사하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험재료 및 세균 주입

담배나방(*Heliothis assulta*)은 인공사료(옥수수 가루, 콩가루, 고추기름, skim milk, yeast extract, vitamin mixture, agar)를 먹이로 사육(Temp., $27 \pm 1^\circ\text{C}$; RH, $65 \pm 5\%$; Photoperiod, 16L:8D)하였으며, 종령 유충에 3×10^6 cells/ml로 희석시킨 *Bacillus thuringiensis* KCTC 1508를 주입한 후 12, 24, 48, 72시간의 각 단계 별로 혈림프를 채취하였다. 항세균성 단백질의 분리 및 정제는 항세균력이 높은 것으로 확인된 주입 후 48시간된 혈림프를 대상으로 실시하였다.

2. 단백질의 분리 및 정제

50 mM ammonium acetate buffer(pH 5.5)로 평형시킨 CM-Sepharose column(2.5 × 20 cm)에 혈림프 10 ml을 loading한 후 50 mM과 1 M ammonium acetate buffer(pH 5.5)로 용출하였다. *E. coli*와 *Bacillus thuringiensis*에 대해 항세균적 활성이 있는 CM-A fraction을 모아 농축한 후 0.1 M ammonium acetate buffer(pH 5.5)로 용해하였고 이를 Sephadex G-100 column(2.5 × 50 cm)상에서 재분리하였다. 항세균 활성을 나타내는 fraction을 동결건조한 후 D.W.에 대해 투석시킨 다음 다시 동결건조하여 단일 단백질 fraction으로 정제하였다.

3. 항세균성 검정

면역 혈림프의 항세균성 검정은 *E. coli* KCTC 1116을 대상으로 실시하였다. nutrient broth에서 *E. coli*를 log phase까지 배양한 후 원심분리하여 얻은 pellet에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.4)를 가하여 570 nm에서 O.D. 값을 측정 한 후, 이 세균 부유물 1 ml에 혈림프 10 μl 를 가하여 37°C에서 30분 동안 배양한 이후의 O.D. 값을 비교하여 용균 정도를 환산하였다(Hultmark et al., 1980).

Acid-PAGE 상에서 분리되는 단백질 band의 항세균성은 정상 발생균과 주입 후 48시간된 감염균의 혈림프를 전기영동한 gel 상에 log phase의 *E. coli* KCTC 1116가 포함된 0.8% agar nutrient 배지를 부어 굳힌 다음 37°C에서 18시간 배양하여 나타나는 inhibition area를 확인함으로써 검정하였다.

정제된 단백질의 항세균성 검정은 0.8% agar nutrient 배지에 log phase의 *E. coli* KCTC 1116 및 *B. thuringiensis* KCTC 1508을 각각 주입 평판(pour plate)한 후 멸균된 filter paper를 agar plate 위에 올려 놓은 다음 단백질 시료 4 μg 를 loading하여 37°C에서 18시간 배양한 다음 inhibition zone을 확인하여 실시하였다.

4. Acid-PAGE

Reisfeld 등(1962)과 Hultmark 등(1980)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 10% polyacrylamide gel(pH 4.3)에 시료 10 μl 를 loading하여 350 mM β -alanine buffer(pH 4.5)로 4°C에서 30V로 1시간, 80V로 1시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250으로 2시간 염색한 후 7% acetic acid로 탈색시켜 관찰하였다.

5. SDS-PAGE

Laemmli(1970)방법을 일부 변형하여 실시하였다. 2%의 SDS가 첨가된 sample buffer와 시료를 혼합하여 100°C에 5분 동안 가열한 후

17% polyacrylamide gel상에 50 μ l 씩 loading하였다. 실온에서 처음 2시간 동안은 10 mA로 그 이후는 20 mA로 총 20시간 동안 전기영동시킨 후 gel을 12% trichloroacetic acid 용액에서 4시간 동안 고정하였고 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 염색액으로 염색시킨 다음 EtOH: acetic acid: D.W. (25:10:65, V/V/V) 혼합액으로 탈색시켰다. 분자량 측정은 Pharmacia low molecular weight determination kit를 이용하였다.

6. 항세균성 단백질의 아미노산 조성 분석

순수 분리된 단백질을 6 N HCl로 110°C에서 16시간 동안 가수분해시킨 후 이를 0.01 N HCl에 용해시킨 다음 OPA(o-phthalaldehyde)의 유도체를 형성하고 HPLC(TOSOH 8010 Series)를 이용하여 구성 아미노산을 분석하였다. TSKgel Aminopack column(4.6 mm \times 12 cm)상에서 0.2 N TSCD(pH 3.29), 0.2 N TSCD(pH 4.30) 그리고 0.8 N TSCD(pH 9.40)을 전개액으로 하여 유출속도 0.5 ml/min, 온도 60°C에서 들뜸 파장 340 nm와 방출 파장 460 nm로 측정하였다.

결과 및 고찰

*Bacillus thuringiensis*는 각종 곤충에 대해 강력한 pathogen으로서 해충의 방제와 관련하여 살충효과를 높이기 위한 균주 선발 및 생리, 생화학적 연구가 활발히 진행되고 있으나 (Sekar, 1987; Chilcott & Wigley, 1993; Lemos *et al.*, 1993), *B. thuringiensis*에 대하여 나타내는 곤충의 면역성에 대한 보고는 거의 전무한 실정이다.

담배나방 혈장으로의 *B. thuringiensis* 주입시에 일부 혈림프 단백질의 유도 생성이 확인되었다(Fig. 3). 따라서 본 연구에서는 *B. thuringiensis*주입시 담배나방의 혈림프에서 유도되는 단백질의 항세균력을 확인하기 위해 면역 혈림프의 *E. coli*에 대한 항세균적 활성을 검정

하였으며(Table 1), 항세균적 활성을 나타내는 두 단백질들(G-I, G-II)을 정제하였다.

Hoffman(1980)은 *B. thuringiensis*를 직시목 곤충인 *Locusta migratoria*의 혈강내에 주입하여 미약하나마 혈림프에서 항세균적 활성이 유도됨을 확인하였는데, 본 연구에서도 *E. coli*에 대한 항세균적 활성이 검출되었으며 시간이 경과됨에 따라 증가하여 48시간에서 가장 높았고(0.19 U) 이후 72시간에서는 감소되었다(Table 1).

항세균 효과가 가장 높게 나타난 48시간 경과군의 혈림프 단백질을 CM-Sepharose column 상에서 cation exchange chromatography (Fig. 1)하여 분리된 peak들의 항세균력을 조사한 결과 peak CM-A에서 *E. coli* 및 *B. thuringiensis*에 대한 항세균적 활성이 확인되었으며, 이를 acid-PAGE를 통해 분석한 결과 *B. thuringiensis* 주입시에 강하게 검출되는 band b와 양극 쪽에 치우쳐 분리되는 band들로 구성되어 있음을 확인하였다. CM-A peak의 fraction을 Sephadex G-100 column을 이용하여 gel filtration한 결과(Fig. 2), 4개의 peak가 분리되었다. 이들 중 *E. coli*와 *B. thuringiensis*에 대한 항균적 활성을 나타내는 peak G-I와 G-II를 각각 농축한 후 acid-PAGE로 분석한 결과(Fig. 3-A) band g와 b의 단일 band로 나타났으며, 면역 혈림프의 acid-PAGE 상에서 항세균성을 검정한 결과

Table 1. Antibacterial activity of haemolymph immunized by *B. thuringiensis* against to *Escherichia coli*

Elapsed time after injection (hours)	Antibacterial activity \pm SD*
12	0.06 \pm 0.02
24	0.18 \pm 0.01
48	0.19 \pm 0.01
72	0.15 \pm 0.01

*One unit of activity was defined as giving 50% reduction of O.D. at 570nm (50% lysis) in *E. coli* suspension by haemolymph in comparison with control group (Hultmark *et al.*, 1980). The value is the mean of three times of test.

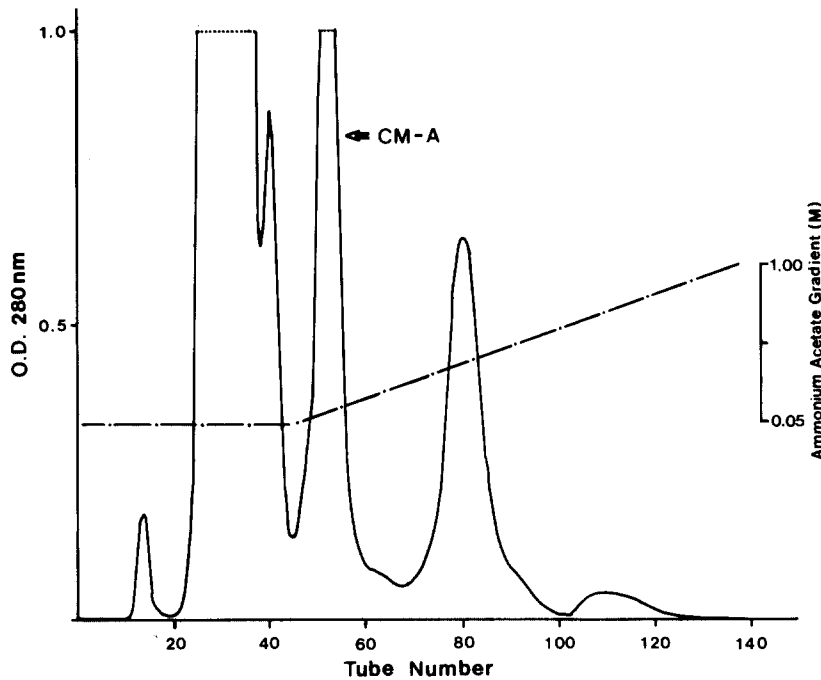


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of haemolymph protein in *Heliothis assulta* injected with *Bacillus thuringiensis*. Immunized haemolymph was loaded on a CM-Sepharose column (2.5 × 20 cm), and then eluted at a flow rate of 0.8 ml/min with a gradient of 0.05~1 M ammonium acetate (pH 5.5). CM-A, a peak with antibacterial activity to *E. coli* and *B. thuringiensis*.

(Fig. 3-B) band a, b 그리고 c부위에서 clear zone이 형성되었다. 또한 *E. coli*와 *B. thuringiensis*에 대하여 G-I fraction(band g) 보다 G-II(band b)에서 항세균적 활성이 높게 나타났다(Fig. 2). 이것은 아미노산의 조성 및 분자량에 따른 단백질의 침투성과 연관성이 있는 것으로 사료된다. 이에 대한 깊은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

G-I fraction의 band g를 SDS-PAGE(17% gel) 상에서 전기영동한 결과(Fig. 4) 분자량 49KD와 46KD의 두 subunit로 구성되어있음이 확인되었다. 한편 G-I fraction의 band b는 분자량 14KD의 단일 band로 확인되어, 13.8KD인 lysozyme(Boman et al., 1991)과 *Pieris rapae*에서 분리된 14KD의 항세균성 단백질(Yoe, 1993)과 유사한 분자량으로 나타났다.

한편 비처리 대조군 혈림프의 acid-PAGE 및 SDS-PAGE 상에서도 이들 항세균성 단백질들

과 동일위치의 band들이 확인되는데(Fig. 3, 4) 비처리 대조군에서는 항세균적 활성이 유의성 있게 검출되지 않아 *B. thuringiensis*주입에 따라 유도되는 이들 단백질들과 동일한지의 여부는 알 수 없다.

정제된 항세균성 단백질의 구성 아미노산 조성을 분석한 결과(Table 2) G-I은 비극성 아미노산인 glycine(17.13 mole %)과 alanine(13.88 mole %)의 함량이 높았으며, G-II는 극성이며 염기성 아미노산인 histidine(16.14 mole %)의 함량이 가장 높았으나 glycine(14.27 mole %)과 alanine(11.32 mole %)의 함량도 높게 나타났다. 정제된 G-I fraction(band g)과 G-II fraction(band b)의 항세균성 단백질 모두 glycine의 함량이 높은 특성을 나타내었다. *Sarcophaga peregrina*에서 나타나는 7KD의 sarcotoxin III는 높은 glycine함량을 보이며(Baba et al., 1987), sarcotoxin IIA

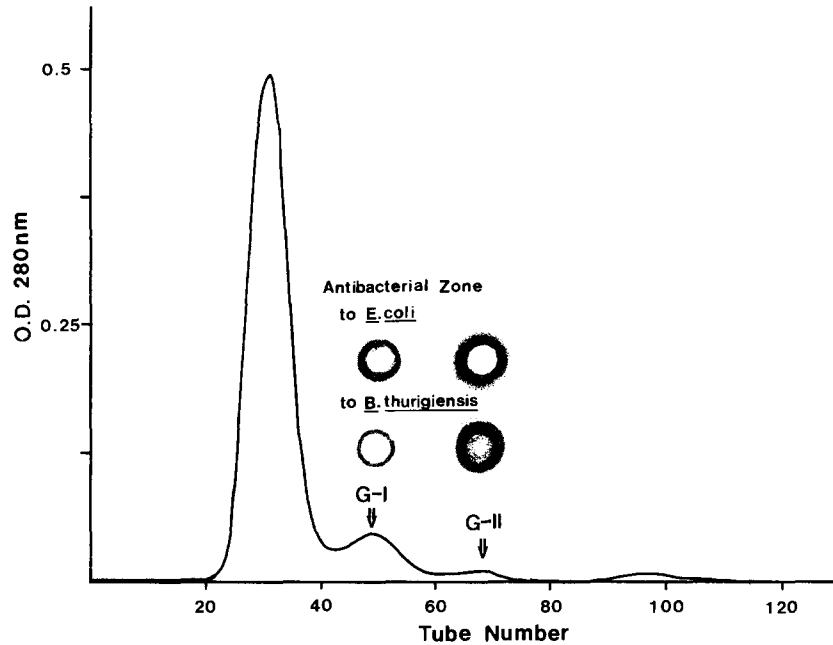


Fig. 2. Gel filtration of CM-A fraction collected by ion-exchange chromatography of haemolymph protein in *Heliothis assulta* injected with *B. thuringiensis*. The fraction (CM-A peak) with antibacterial activity was concentrated, and then applied to a Sephadex G-100 column (2.5 × 50 cm). Photographs are antibacterial zone against *E. coli* KCTC 1116 and *B. thuringiensis* KCTC 1508 of each fraction with antibacterial activity (G-I, G-II).

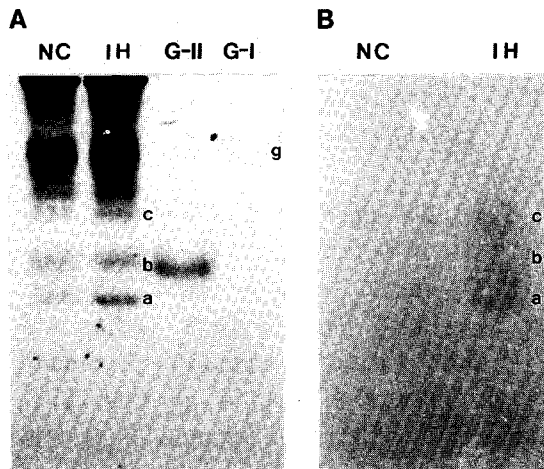


Fig. 3. Acid-PAGE of antibacterial proteins collected by gel filtration. A, Acid-PAGE (10% gel) of haemolymph proteins; B, Antibacterial area formed by the action of protein bands a, b and c to *E. coli* KCTC 1116 in pour plate on the gel; NC, nontreated control haemolymph; IH, immunized haemolymph (48 hrs); G-I & G-II, fractions from gel filtration in Fig. 2.

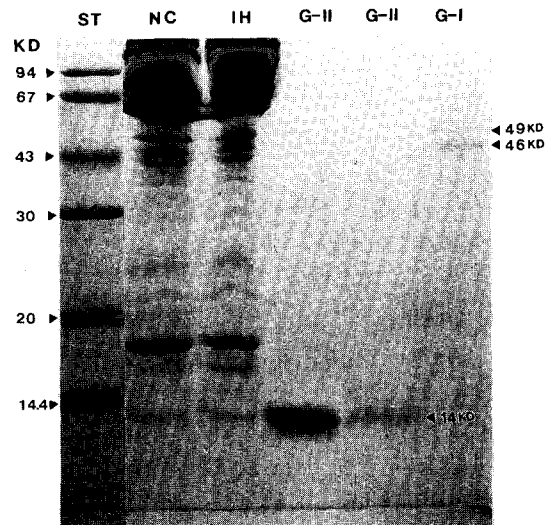


Fig. 4. SDS-PAGE (17% gel) of haemolymph antibacterial proteins in *Heliothis assulta* immunized by *Bacillus thuringiensis*. The symbols are as in Fig. 3.

Table 2. Amino acid composition of antibacterial proteins (G-I, G-II)

Amino acids	Antibacterial Proteins	
	G-I*	G-II*
Asp	6.94	4.58
Thr+Asn	2.66	2.21
Ser	2.36	2.56
Glu	5.02	5.24
Pro	3.69	7.58
Gly	17.13	14.27
Ala	13.88	11.32
Cys	ND	ND
Val	1.18	1.24
Met	8.57	10.61
Ile	8.42	10.03
Leu	7.98	6.17
Tyr	1.92	0.41
Phe	1.48	0.02
His	11.96	16.14
Lys	3.84	3.32
Trp	ND	ND
Arg	2.95	4.29
Total	99.98	99.99

*Values expressed in mole percent. ND, non-detected

는 높은 함량의 glycine과 aspartic acid (Ando & Natori, 1988), 그리고 *Bombyx mori*로 부터 정제된 cecropin A는 높은 함량의 lysine, glycine 그리고 alanine으로 구성된 점(Morishima *et al.*, 1990)들에서, 본 연구 결과와 부분적인 일치성을 보인다.

참고문헌

- Andersons, D., H. Gunne, M. Hellers, H. Johansson, and H. Steiner, 1990. Immune responses in *Trichoplusia ni* challenged with bacteria or baculoviruses. *Insect Biochem.*, **20(5)**: 537-543.
- Ando, K. and S. Natori, 1988. Inhibitory effect of sarcotoxin II A, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, a growth of *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **103**: 735-739.
- Baba, K., M. Okada, T. Kawano, H. Komano, and S. Natori, 1987. Purification of sarcotoxin III, a new antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*. *J. Biochem.*, **102**: 67-74.
- Boman, H.G., I. Faye, G.H. Gudmundsson, J.Y. Lee, and D.A. Lidholm, 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.*, **201**: 23-31.
- Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, and P. Tempst, 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.*, **8**: 2387-2391.
- Chilcott, C.N. and P.J. Wigley, 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habits in New Zealand. *J. Invert Pathol.*, **61**: 244-247.
- Dimarcq, J.L., D. Zachary, J.A. Hoffmann, D. Hoffmann, and J.M. Reichhart, 1990. Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipteracin, in *Phormia terranova*. *EMBO J.*, **9(8)**: 2507-2515.
- Dunn, P.E., 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.*, **31**: 321-339.
- Engström, Å., P. Engström, Z.J. Tao, A. Carlsson, and H. Bennich, 1984. Insect immunity. The primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation to two native attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, **3(9)**: 2065-2070.
- Hoffmann, D., 1980. Induction of antibacterial activity in the blood of the migratory locust *Locusta migratoria* L.. *J. Insect Physiol.*, **26**: 539-549.
- Hultmark, D., Å. Engström, K. Andersson, H. Steiner, H. Bennich, and H.G. Boman, 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, **2(4)**: 571-576.
- Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, and H.G. Boman, 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, **106**: 7-16.
- Jerrett, P., 1985. Potency factors in the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawi* and the significance of plasmids in their control. *J. Appl. Bacteriol.*, **58**: 437-448.
- Kanai, A. and S. Natori, 1990. Analysis of a gene cluster for sarcotoxin II, a group of antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina*. *Molec. Cell. Biol.*, **10(12)**: 6114-6122.
- Keppi, E., A.P. Pugsley, J. Lambert, C. Wicker, J.L. Dimarcq, J.A. Hoffmann, and D. Hoffmann. 1989. Mode of action of dipteracin A, a bactericidal peptide induced in the hemolymph of *Phormia terranova* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **10**: 229-239.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins

- during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lambert, J., E. Keppi, L. Dimarcq, C. Wicker, J.M. Reichhart, B. Dunbar, P. Lepage, A. Van Dorselaer, J. Hoffmann, J. Fothergill, and D. Hoffmann, 1989. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipterian *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 262-266.
- Lemos, F.J.A., A.F. Ribeiro, and W.R. Terra, 1993. A bacteria-digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **23(4)**: 533-541.
- Marchini, D., P.C. Giordano, R. Amons, L.F. Bernini, and R. Dallai, 1993. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta: Diptera). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **23(5)**: 591-598.
- Morishima, I., S. Suginaka, T. Ueno, and H. Hirano, 1990. Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides, from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B(3)**: 551-554.
- Natori, S., 1977. Bactericidal substance induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Insect Physiol.*, **23**: 1169-1173.
- Reichhart, J.M., M. Meister, J.L.D. Zachary, D. Hoffmann, C. Ruiz, G. Richards, and J.A. Hoffmann, 1992. Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterin promoter. *EMBO J.*, **11(4)**: 1469-1477.
- Reisfeld, R.A., U.J. Lewis, and D.E. Williams, 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. *Nature*, **195**: 281-283.
- Sekar, V., D.V. Thompson, M.J. Maroney, R.G. Bookland, and M.J. Adang, 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7036-7040.
- Spence, K.D., J.E. Karlinsey, T.R. Kyriakides, C.S. Datil, and M.F. Minnick, 1992. Regulation and synthesis of selected bacteria-induced proteins in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **22(4)**: 321-331.
- Trenczek, T. and I. Faye, 1988. Synthesis of immune proteins in primary culture of fat body *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.*, **18**: 299-312.
- Yoe, S.M., 1993. Humoral immune responses in insects. *Korean J. Entomol.*, **23(2)**: 91-99.

(Accepted March 2, 1994)

Purification of Antibacterial Proteins in *Heliothis assulta* Injected with *Bacillus thuringiensis*

Yoo, Chong Myung, Seong Eun Jeong, Hyung Chul Lee (Dept. of Biology, Han Nam Univ., Taejon 300-791, Korea)

To investigate characteristics of antibacterial proteins in haemolymph of *Heliothis assulta*, *Bacillus thuringiensis* were injected into haemocoel of the mature larvae. The highest antibacterial activity was induced at 48 hrs after the injection. Two proteins (G-I and G-II) with antibacterial activity to both *E. coli* and *B. thuringiensis* were purified by cation exchange chromatography and gel filtration from haemolymph. G-I of two subunits (49KD and 46KD) contained high glycine (17.13 mole %) and alanine (13.88 mole %) in amino acid composition, whereas high histidine (16.14 mole %) and glycine (14.27 mole %) content was showed in G-II of single polypeptide (14KD). These proteins have a common character in high content of glycine to the other antibacterial proteins characterized in insects.