

***Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*의 내독소 결정체 용해 과정 및 활성기작과 항원 발현 양상**

남기범 · 조재민 · 홍순복 · 이형환 · 조명환*

건국대학교 이과대학 생물학과

In Vitro* Dissolution and Proteolytic Activation of δ-endotoxin and Antigenic Expression Pattern of *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto

Gi-Bum Nam, Jae-Min Cho, Soon-Bok Hong, Hyung-Hoan Lee
and Myung-Hwan Cho*

Department of Biology, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — The solubilization and proteolytic process of δ-endotoxin was analysed to compare the biochemical property of the toxin isolated from *B. thuringiensis* subsp. *sotto*. The purified crystals were dissolved in 50 mM carbonate buffer containing 10 mM dithiothreitol at pH 10 for various times. The electrophoretic pattern showed that a rapid disappearance of 138 kDa protein band. This disappearance of protein with high molecular weight was accompanied by the appearance of new protein fragment with 104 kDa, 60 kDa, and 25 kDa. For proteolytic processing, the soluble crystals were digested with trypsin for various times. The soluble crystal protein of 104 kDa was completely disappeared. However, the protein fragment of 60 kDa and 25 kDa still remained after complete proteolysis. The comparative immunoblot analysis showed that the antiserum against intact crystals showed strong immunoreactivity to the homologous inclusion protein of 138 kDa, 104 kDa, and 25 kDa, and to the intact spores of 221 kDa and 138 kDa, but not to the vegetative cell homogenate. The sera against crystals and spores had no immunoreactivity to the vegetative cell homogenate.

*Bacillus thuringiensis*는 주모성 편모를 가진 그람 양성 간균으로, 아포 형성 시기에 δ-내독소라는 결정 성 단백질을 생산한다(1, 2). 내독소 단백질은 곤충 유충에 독성을 나타내며, 이와 같은 성질은 다른 *Bacilli*와 구분 짓는 *B. thuringiensis*의 특성이다(3). 오늘 날 *B. thuringiensis*는 농작물, 산림 및 인류의 건강을 보호하기 위한 여러 물질 중 전세계적으로 가장 성 공적인 미생물 살충제이며, 이러한 미생물 살충제가 전통적인 화학 살충제를 대체할 수 있을 것으로 보인다. *B. thuringiensis*는 제일 처음 일본의 미생물 학자인 Ishiwata가 병든 누에로부터 분리하였으며, 후에 독일에서 Berliner가 Turingen 지방에서 *Anagaster kuehniella*의 유충으로부터 균을 분리하여 *Bacillus thuringiensis*라고 정식 명명하였다(4-6). De Barjac와 Franchon(7)은 토양에서 분리한 *B. thuringiensis*을 생화학적 성질과 편모 항원(H-항원)에 따

라 23 serovar.로 나누었으며, Norris(8)는 esterases의 전기 영동 패턴에 따라 50종류의 아종들을 분류하였다. 최근에 Höfte와 Whately(9)는 곤충 유충에 대한 내독소 단백질의 살충 성질과 분자 생물학적 성질을 기본으로 하는 새로운 분류 체계를 제시하였다.

δ-내독소의 생산은 *B. thuringiensis*에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 배지 조건에 따라 다르며(10, 11), 곤충이 섭식하기 전에는 134~140 kDa인 전독소(protoxin) 상태로 존재하지만 곤충이 섭식한 후에는 중장 내의 강 알칼리 상태에서 용해된 후 단백질 분해 효소에 의해 분자량이 약 60 kDa 내외인 활성 독소로 바뀌어 곤충 중장의 상피 조직을 파괴시켜 곤충을 치사시킨다(12). Stahly 등(13)은 살충 독소 단백질 유전자가 플라스미드 DNA 또는 염색체 상에 있는 것으로 보고한 이래 균주에 따라 다르게 보고되었고, 하나의 폴리펩타이드에 의해 내독소가 만들어진다는 것이 밝혀지게 되었다(14-16). 최근에는 누에 유충을 이용하여 중장 상피세포내에 특정한 살충성 단백질의 결합 부위가 존재한다는 것이 밝혀졌으며(17, 18), 이

Key words: *Bacillus thuringiensis*, crystals, spores, trypsin, *in vitro* activation

*Corresponding author

러한 내독소-수용체 복합체가 상피 세포와의 작용을 통해 칼륨 이온에 특이적인 구멍을 형성하여 결국 세포가 죽게 된다(19).

본 연구에서는 내독소 단백질의 용해 과정과 단백질 분해 효소에 의한 활성화 기작을 *in vitro* 상에서 실행하여, 각 분해 과정의 중간 산물을 전기 영동으로 살펴보았다. 또한 *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*의 결정성 내독소, 아포 및 영양세포 사이의 항원 연관성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

조건 균주인 *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*는 건국 대학교 유전·공학 연구소에 보관중인 것을 사용하였다. *B. thuringiensis* 배양을 위한 기초 배지로 Nutrient Broth(Difco Co.)와 Nutrient Agar(Difco Co.) 배지를 사용하였고, 아포 및 내독소 단백질 결정체 생성 유도를 위해 Glucose Yeast Salt(GYS) 배지(20)를 수정하여 사용하였다. 100 ml의 Nutrient Broth에 균이 28°C에서 18시간 동안 배양된 후, 균의 농도가 1×10^9 cell/ml에 이르면 멸균된 250 ml의 GYS 배지에 배양액 5 ml을 접균하여 28°C에서 약 38~72시간 회전 진탕 배양하였다. 아포 및 내독소 결정체의 생성 유무는 위상차 현미경으로 관찰 확인하였다. 또한 균주는 Nutrient Agar에 보관 및 유지되었다.

아포 및 살충성 내독소 결정체의 분리

GYS배지에서 72시간 배양후 아포 및 내독소 결정체의 생성이 확인 된 후, 배양액을 20분간 원심 분리(1,000×g, 4°C)하였다. 침전물을 멸균한 인산 완충 용액으로 3회 원심 세척하여 *B. thuringiensis*가 생성하는 단백질 분해 효소를 제거하였다. 아포 및 내독소 결정체의 분리를 위해 50~80%의 Sucrose 선상 밀도구배를 조성하여, 배양 침전액 3 ml을 위에 놓고 4°C에서 28,000×g로 2시간 초원심분리 하였다. 원심 분리 튜브상의 내독소 단백질 결정체 층을 파스테르 파이펫으로 회수하여 위상차 현미경으로 검증한 후 멸균한 증류수로 5회 이상 세척하였다. 위와 같이 분리한 내독소 결정체는 -70°C에서 동결건조(Labconco Co., U.S.A)시켜 별도로 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

단백질 정량

내독소 단백질의 정량은 BCA protein assay kit(Bicinchoninic acid; Pierce, Rockford, Ill., U.S.A)를

사용하였다.

내독소 단백질의 용해와 단백질 분해 효소에 의한 활성화

분리된 내독소 결정체들(5 mg/ml)을 10 mM di-thiothreitol/50 mM carbonate buffer(pH 10) 속 넣고 37°C에서 각각 10분, 20분, 30분, 1시간, 1시간 30분, 2시간, 3시간 동안 용해하였다. 녹지 않은 침전물은 원심 분리하여 제거시키고 용해된 내독소 단백질을 단백질 분해 효소인 trypsin(0.25 mg/ml; Sigma, St Louis, U.S.A)으로 각각 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 트립신에 의한 이와 같은 내독소 단백질의 활성화 반응을 멈추기 위해서 Laemmli sample buffer[60 mM Tris/HCl buffer, 2%(w/v) Sodium dodecyl sulfate, 25%(v/v) glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, pH 6.8]를 첨가하였다. 이 시료는 SDS-PAGE로 분석하기 전까지 -20°C에 보관 하였다.

SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli(21) 방법에 의한 불연속 완충 용액 시스템을 이용하였다. 각 단백질 시료들을 Laemmli sample buffer[60 mM Tris/HCl buffer, 2%(w/v) Sodium dodecyl sulfate, 25%(v/v) glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, pH 6.8] 속에 넣고 약 6분간 100°C에서 끓인 후, 다시 약 1분 동안 원심 분리(10,000×g)하여 상 등액을 SDS-PAGE를 위한 시료로 사용하였다. gel은 10% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였고, 전기 영동이 끊난후 Coomassie brilliant blue R-250 용액[1 g of Coomassie brilliant blue R-250(Sigma, St Louis, U.S.A), 450 ml of methanol, 100 ml of glacial acetic acid, 450 ml of distilled water]에 약 40분간 염색한 후, 탈색 용액(10% methanol, 10% glacial acetic acid in distilled water)으로 약 18시간 탈색하였다. 각 단백질 시료의 분자량을 측정을 위하여 사용한 표준 분자량 측정용 단백질(Bio-rad, U.S.A)은 다음과 같다. : myosin(200 kDa), β-galactosidase(116 kDa), rabbit muscle phosphorylase B(97.4 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), hen egg white ovalbumin(45 kDa), bovine carbonic anhydrase(31 kDa), soybean trypsin inhibitor(21.5 kDa), hen egg white lysozyme(14.4 kDa), bovine pancreas apotinin(6.5 kDa).

실험 동물

면역 처리를 위한 동물은 건국 대학교 생물학과 면역학 연구실에서 분양 받은 6주 된 암컷 Balb/c 마우스를 사용하였다.

항원의 준비 및 면역 처리

0.3% formalin으로 처리한 *B. thuringiensis* subsp. *sotto*를 인산 완충 용액으로 희석시킨 후(1×10^8 cells/ml) 0.5 ml를 6주된 암컷 Balb/c 마우스에 복강내 주사를 하였다. 3주후 0.5 ml의 동일한 항원으로 복강 내에 2차 주사하였다.

또한 내독소 결정체 및 아포(각각 100 µg) 0.25 ml를 각각 동량의 Complete Freund's Adjuvant(Gibco Inc., Grand Island, N.Y. U.S.A)와 잘 혼합시켜 6주된 암컷 Balb/c 마우스에 복강 주사하였다. 3주후 다시 동일한 항원(400 µg/ml) 0.25 ml를 Incomplete Freund's Adjuvant(Gibco Inc., Grand Island, N.Y. U.S.A)와 잘 혼합시켜 6주된 암컷 Balb/c 마우스에 2차 복강 주사하였다.

항혈청의 분리

2차 면역처리후 항체의 역가가 가장 높은 10일째 되는 날 마우스의 혈액을 채취하여 원심 분리(1,000×g, 20분간)하여 상층 액을 분리하였다. 이러한 항혈청은 Immunoblot을 위한 항체로 이용하기 위해 -20°C에 보관하였다.

Immunoblot에 의한 항원 분석

Immunoblot에 의한 항원 분석을 위해, 우선 각 시료들을 SDS-PAGE에 의해 분리되었다. 그후 젤을 transfer buffer(pH 8.3 ; 15.6 mM Trizma base and 120 mM glycine)로 150 mA에서 1시간 동안 nitrocellulose paper(Pharmacia)에 전이시켰다. Standard marker가 전이된 nitrocellulose paper를 amido black 염색액(0.1% Amido black/25% isopropanol/10% acetic acid)으로 2분간 염색하여 단백질 전이를 확인하였다. 전이된 nitrocellulose paper를 3% BSA/TBS 용액(3% BSA in Tris buffered saline ; 10 mM Trizma base, 150 mM NaCl, pH 7.5)에 넣어 37°C에서 혼들면서 18시간 동안 반응시키고 TBS로 3회 세척하였다. 항원-항체 반응을 위해 항혈청을 1 : 1000으로 희석하여 37°C에서 1시간 30분간 반응시키고, 다시 TBS로 3회 세척하였다. 0.5% BSA/TBS에 1 : 4000으로 희석한 goat anti-mouse IgG+IgM conjugated horse radish peroxidase(Jackson Immuno-Research Lab. U.S.A)을 37°C에서 1시간 30분간 반응시킨 후, TBS로 3회 세척하고 발색 용액(30 mg/ml of chloro-

naphtol, 10 ml of methanol, 30 µl of 30% H₂O₂ in 50 ml of TBS)을 가하였다. 발색이 진행된 후, 중류 수로 세척하여 반응을 멈추었다.

결과 및 고찰

아포 및 내독소 단백질 결정체의 분리

B. thuringiensis subsp. *sotto*에서 분리한 내독소 단백질 결정체는 이중 피라미드형이며, 아포의 형태는 타원형 모양이었다(Fig. 1). Sucrose 선상 밀도구배상에서의 내독소 결정체는 65%와 70%(w/v) 사이에 밴드가 형성되었으며, 아포는 75%와 80%(w/v) 사이에 형성되었다(Fig. 1).

SDS-PAGE에 의한 전기 영동 분석

내독소 결정체의 알카리 용해 SDS-PAGE 결과, *B. thuringiensis* subsp. *sotto*의 내독소 단백질 결정체는 분자량이 약 138 kDa, 75 kDa, 45 kDa, 40 kDa 및 37 kDa의 밴드를 형성하였다(Fig. 2). 138 kDa 단백질 외의 다른 단백질 밴드는 내독소 결정체 분리시 *B. thuringiensis* subsp. *sotto* 내에 존재하고 있던 단백질 분해 효소의 작용으로 인해 생긴 분해 산물로 보인다(Fig. 2). 본 실험에서 *B. thuringiensis* subsp. *sotto*의 내독소 단백질이 자가 용해성 작용을 나타내며 이러한 작용은 단백질 분해 효소에 의한 것으로 보인다. 또한 전기영동시 SDS의 분해 작용으로 인해 생성된 것으로도 볼 수 있는데, 이는 Yasunori N. 등(22)이 이전에 보고한 바 있다. Yasunori N. 등(22)은 내독소 단백질의 비(非) 효소적 분해 작용이 SDS의 작용으로도 일어날 수 있다고 하였다. 내독소 결정체를 알카리 완충 용액에 녹인지 10분이 되지 않아서 약 104 kDa 정도의 단백질 밴드가 형성되었으며, 138 kDa의 단백질 밴드는 아직 완전히 용해되지 않은 상태로 남아 있었다(Fig. 2, Lane C). 이와 같은 104 kDa의 단백질 밴드는 내독소 결정체가 전독소(Protixin) 상태에서 곤충의 중장내 알카리 용액으로 독성을 지닌 활성 독소(activated toxin)로 변화하는 과정 중에 생성되는 중간 산물로 볼 수 있다. 알카리 완충 용액으로 1시간 동안 반응시킨 결과 이전의 138 kDa 단백질 밴드가 완전히 사라지고 새로이 60 kDa와 25 kDa의 밴드가 형성된 것을 볼 수 있다(Fig. 2, Lane G). 이와 같은 60 kDa와 25 kDa의 단백질 밴드는 3시간에 걸친 용해 과정후에도 분해되지 않고 계속 남아 있었다(Fig. 2). 그리고 더 이상 새로운 밴드의 출현을 볼 수 없었다(Fig. 2). 일반적으로 내독소 단백질의 용해 과정은 사용하는 알카리 완충 용액의

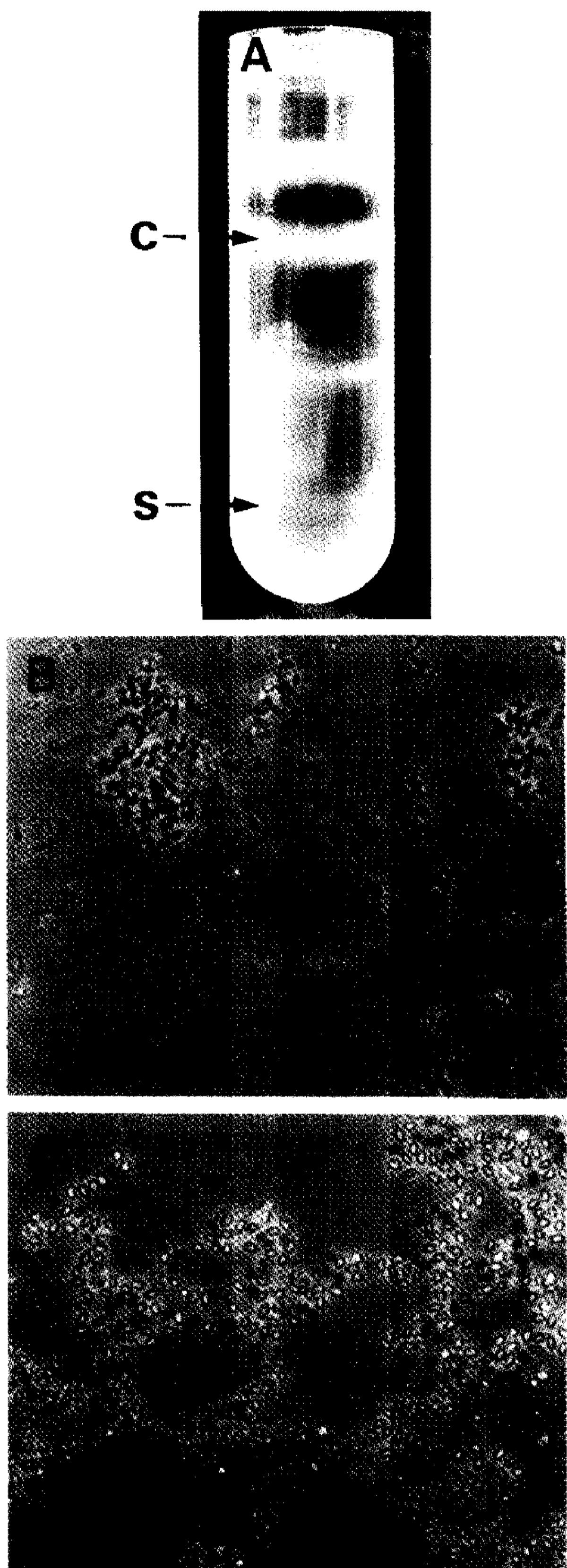


Fig. 1. (A) Separation of δ -endotoxins and spores produced from *B. thuringiensis* subsp. *sotto* by 50~80% discontinuous sucrose density gradient centrifugation. C indicates crystal and S indicates spore. Phase-contrast photographs ($\times 1000$) of the crystals (B) and spores (C) isolated by sucrose density gradient centrifugation.

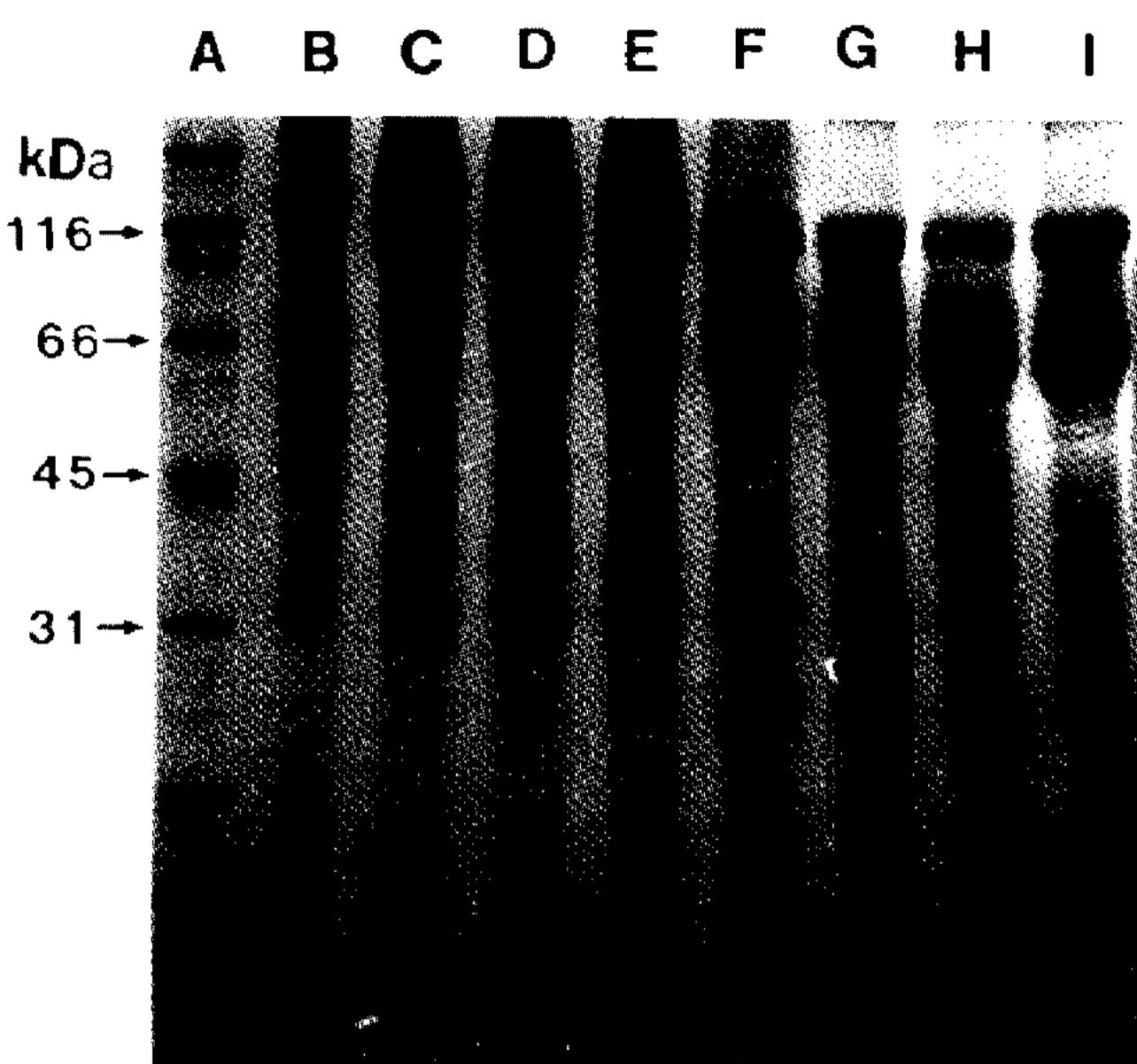


Fig. 2. SDS-PAGE was used for observing the effect of solubilization (pH 10) against intact crystal solution. At the time indicated, samples were withdrawn and subsequently mixed with Laemmli sample buffer. SDS-PAGE was carried out in 10% separating gel and 5% stacking gel, using a micro slab gel electrophoresis system. The gel was stained with Coomassie blue R-250 for 40 min. and then destained for 18 hours. Lanes: A, standard molecular markers (in kilodaltons); B, intact crystalline toxin; C, the crystals solubilized for 10 min.; D, 20 min.; E, 30 min.; F, 1 hour; G, 1 hour 30 min.; H, 2 hours; I, 3 hours

종류에 따라 달라질 수 있다. 즉 일정한 pH를 유지하고 있는 알카리 완충 용액 내의 수소 이온 농도에 따라 내독소 단백질의 용해 양상이 틀려진다(12).

단백질 분해 효소에 의한 내독소 결정체의 활성

알카리 완충 용액으로 용해시킨 내독소 결정체를 단백질 분해 효소인 트립신을 이용하여 시간 별로 처리한 후 각각 SDS-PAGE로 분석 한 결과, *B. thuringiensis* subsp. *sotto*의 내독소 결정체 단백질인 138 kDa 밴드가 완전히 분해되어 볼 수 없었다(Fig. 3). 또한 104 kDa의 단백질 밴드는 트립신으로 처리한지 30분이 경과하면 완전히 분해되어 보이지 않았다(Fig. 3, Lane F). 이와 같은 결과는 104 kDa의 단백질이 실제로 곤충의 중장 내에서 독성을 나타내며 작용하는 단백질 단편이 아니고 활성화 과정 중에서 생기는 중간 산물이라는 것을 간접적으로 증명해 준다.

Immunoblot에 의한 *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* 항원 발현 양상의 분석

Western blot에 의해 *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*의 내독소 단백질, 포자 및 영양 세포간의 면역 학적 연관성을 살펴본 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같

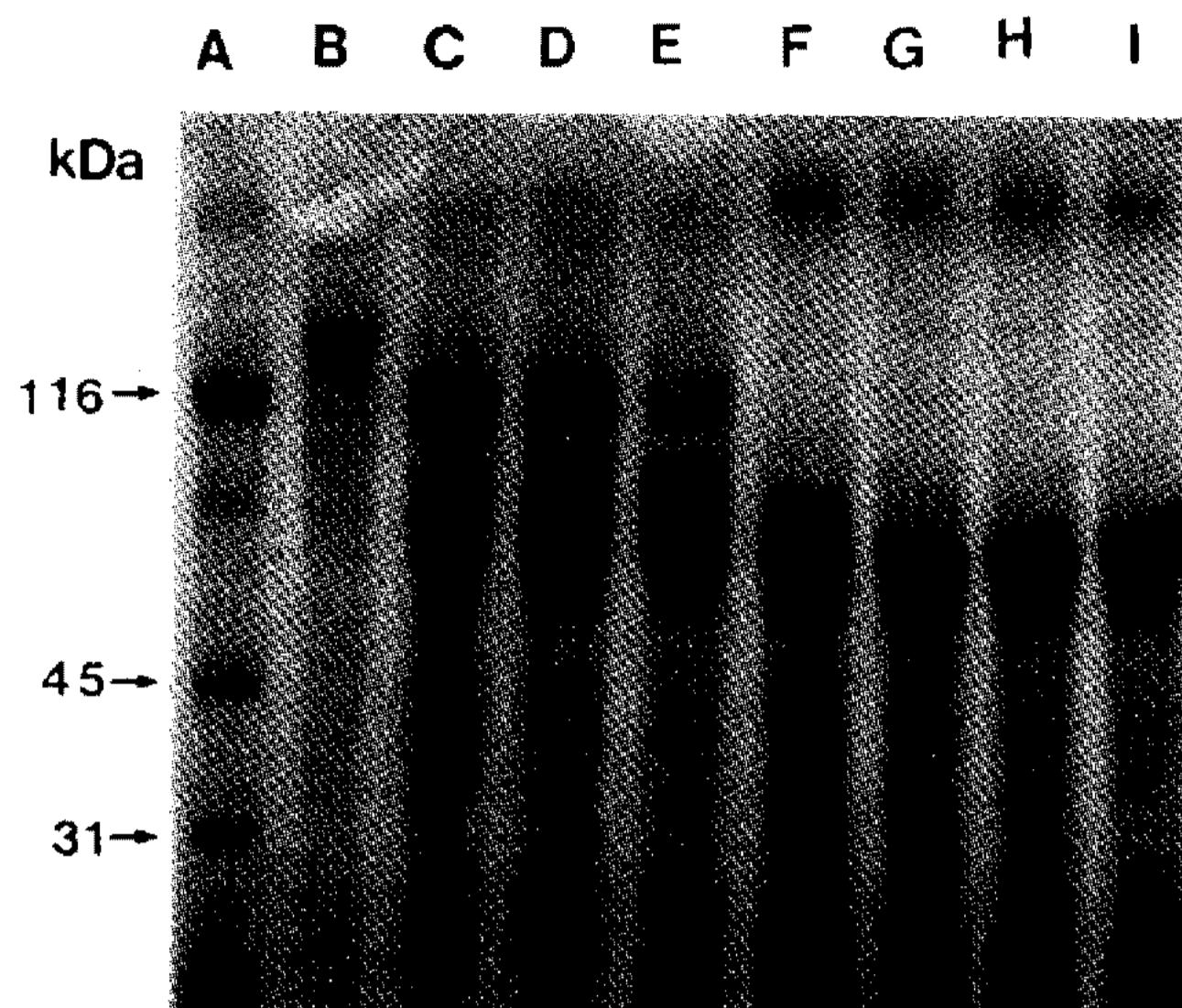


Fig. 3. Effect of trypsin on polypeptide components of the solubilized crystal proteins. Crystal proteins were digested with trypsin at pH 10 for a various times. At the times indicated, trypsin-treated crystals were withdrawn and then added to Laemmli sample buffer to stop the reaction. The trypsin-digested crystal proteins were examined by 10% SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis. The gel was stained with Coomassie blue R-250 for 40 min. and then destained for 18 hours.

Lanes: A, standard molecular markers (in kilodaltons); B, intact crystalline toxin; C, the crystals solubilized for 1 hour; D, the trypsin-digested crystals for 10 min.; E, 20 min.; F, 30 min.; G, 1 hour; H, 2 hours; I, 3 hours

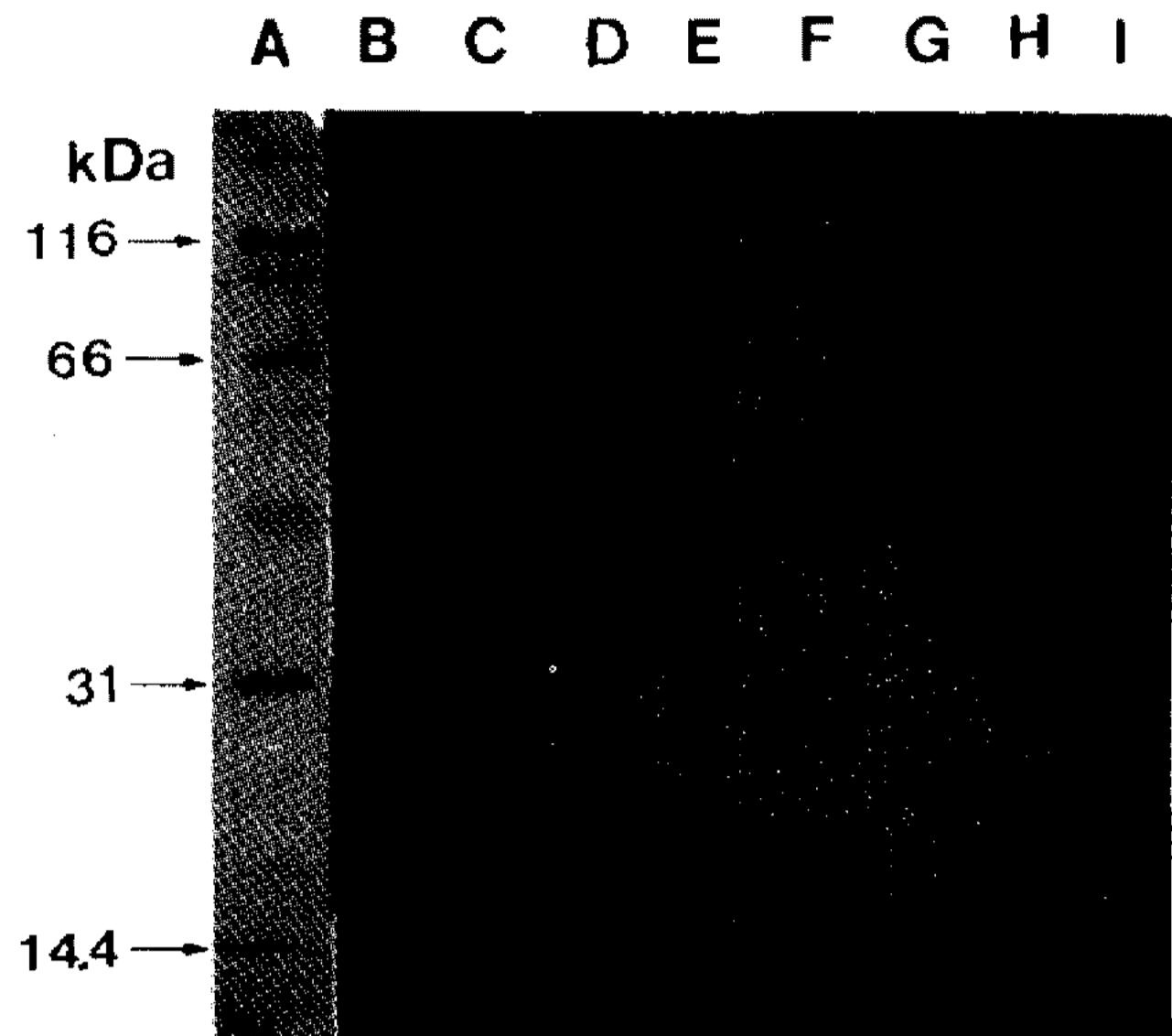


Fig. 4. Western blot analysis of *B. thuringiensis* subsp. *sotto* antigens using antisera against intact crystals. Several samples were separated in 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membrane. After blocked in 3% BSA/TBS solution, the nitrocellulose membrane incubated with anti-sera against intact crystals. Antigen-antibody reactions were detected by a horseradish peroxidase development method. Visualization was performed with chloronaphthol as the color substrate.

Lanes: A, standard molecular markers (in kilodaltons); B, intact crystals; C, the solubilized crystals; D, trypsin-digested crystals; E, GYS-harvested lysates; F, the vegetative cell homogenate; G, intact spores; H, the solubilized spores; I, trypsin-digested spores

이 *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*의 내독소 단백질에 대한 항혈청은 약 138 kDa, 104 kDa 및 60 kDa의 분자량을 가진 homologous 내독소 단백질을 인식하였다(Fig. 4, Lanes B, C, D): 이중 104 kDa의 단백질은 알카리 완충 용액에 의해 생성된 중간 산물이며, 60 kDa의 단백질은 단백질 분해 효소에 의한 활성화 과정중 생성되는 trypsin 저항성 단백질 단편이다(Fig. 3, 4). 이와 같은 결과는 104 kDa 및 60 kDa의 내독소 단백질 단편 내에 결정성 내독소와 비슷하거나 거의 동일한 항원결정기가 존재함을 나타낸다. 또한 알카리 완충용액에 의한 *in vitro* 용해 과정과 단백질 분해 효소에 의한 활성 과정이 내독소 결정체의 표면 항원결정기를 변성시키거나 불활성 시키지 못하는 것으로 볼 수 있다. 결정성 내독소 단백질에 대한 항혈청은 영양 세포 항원과는 전혀 반응을 하지 않았다(Fig. 4, Lane F). 이와 같은 사실은 내독소 결정체가 영양 세포와는 면역학적으로 아주 다른 단백질 조성을 가지고 있다고 생각할 수 있다. 또한 내독소 결정체에 대한 항혈청은 221 kDa와 138 kDa의 이종 항원인 아포 단백질을 인식하였다(Fig. 4, Lane G). 아포에 대한 항혈청은 221 kDa, 138 kDa와

66 kDa의 아포 단백질을 인식하였으며, 특히 221 kDa의 단백질 랜드를 아주 강하게 인식하였다(Fig. 5, Lanes G, H). 이중 66 kDa의 아포 단백질 랜드는 아포를 알카리 완충 용액과 trypsin에 의한 활성화 과정중 생성된 단백질 랜드이다(Fig. 5). 각 항혈청들이 138 kDa의 내독소 결정체 및 아포 단백질을 공통적으로 인식하였는데 이는 이러한 138 kDa의 단백질 단편이 내독소 결정체의 주된 단백질로 볼 수 있다.

Monro는(23)은 내독소 단백질 항원이 영양 세포 내에 존재해 있는 단백질의 단순한 조립에 의한 내독소 형성 과정을 통해서 생성되는 것이 아니라고 주장하였다. 내독소 결정체의 형성은 아포가 형성되는 시기의 말기인 3~5단계에서 형성되며 아포내의 exosporium 바로 옆에서 생성되며, 이러한 exosporium의 막이 내독소 결정체의 형성을 위한 주형으로 작용한다(24, 25). 또한 내독소 결정체 단백질의 약 80%는 포자가 형성되는 과정중 다른 단백질의 분해에 의해 공급되어지는 아미노산으로부터 합성되어지며, 나머지 15% 미만은 아포 형성 시기 이전에 있던 아미노산들로 합성되어 진다고 한다(24, 26). 이와 같은

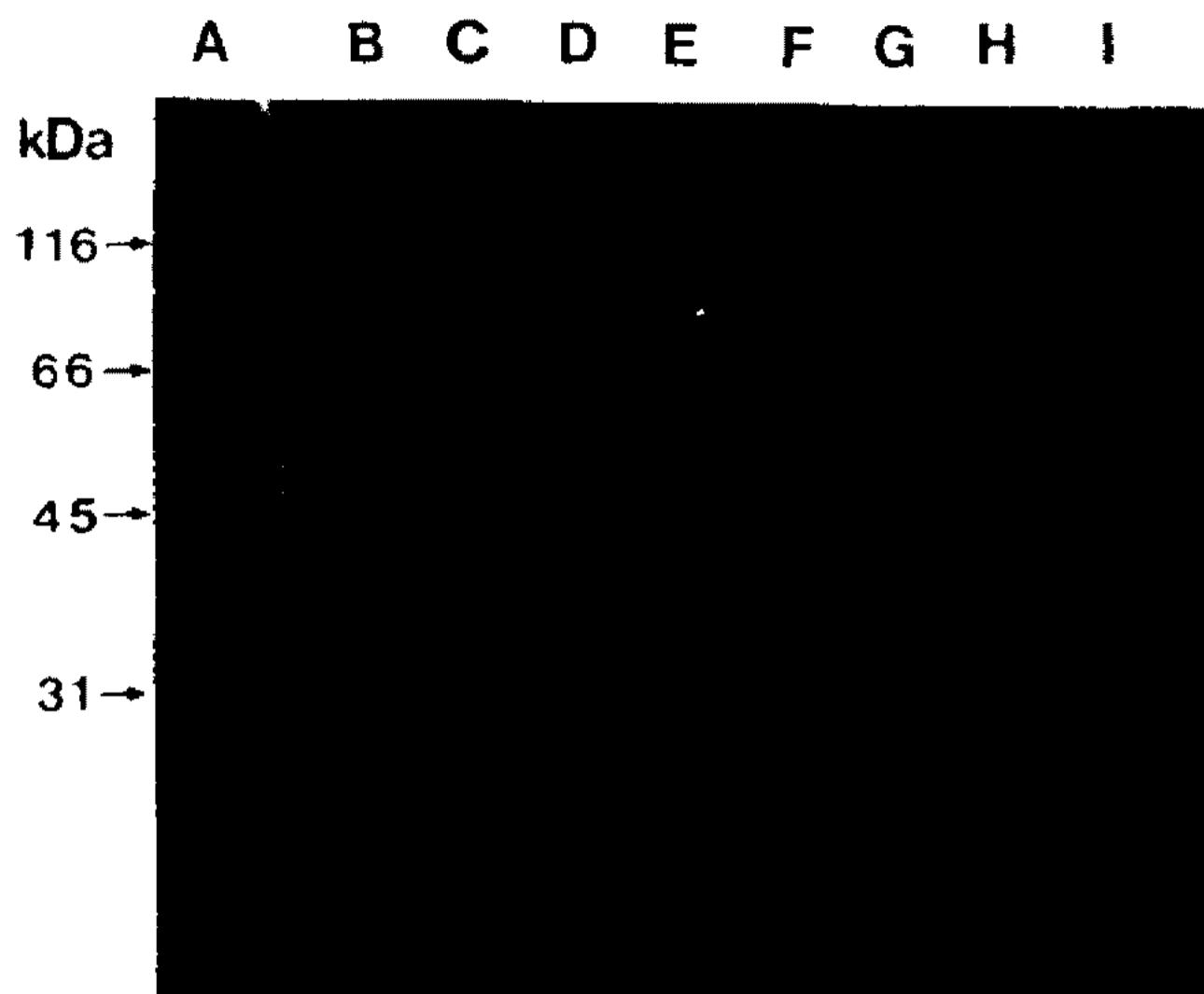


Fig. 5. Western blot analysis of *B. thuringiensis* subsp. *sotto* antigens using antisera against intact spores. Several samples were separated in 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membrane. After blocked in 3% BSA/TBS solution, the nitrocellulose membrane incubated with antisera against intact spores. Antigen-antibody reactions were detected by a horseradish peroxidase development method. Visualization was performed with chloronaphthol as the color substrate.

Lanes: A, standard molecular markers (in kilodaltons); B, intact crystals; C, the solubilized crystals; D, trypsin-digested crystals; E, the vegetative cell homogenate; F, GYS-harvested lysates; G, intact spores; H, the solubilized spores; I, trypsin-digested spores

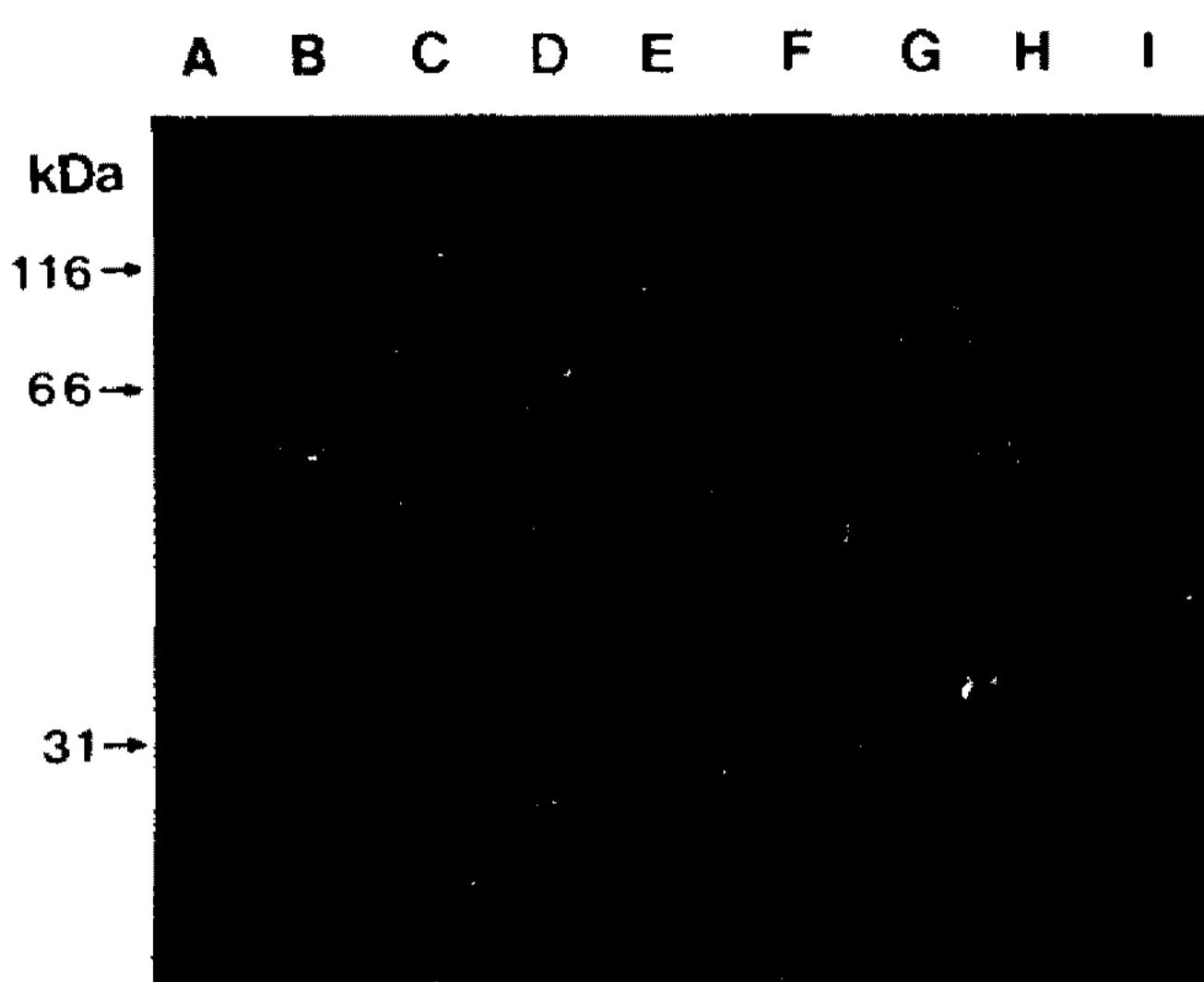


Fig. 6. Reaction of antisera with *B. thuringiensis* subsp. *sotto* antigens separated by 10% gel electrophoresis. After SDS-PAGE, the proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membrane. After blocked in 3% BSA/TBS solution, the nitrocellulose membrane incubated with antisera against the vegetative cell homogenate. Antigen-antibody reactions were detected by a horseradish peroxidase development method. Visualization was performed with chloronaphthol as the color substrate.

Lanes: A, standard molecular markers (in kilodaltons); B, intact crystals; C, solubilized crystals; D, trypsin-digested crystals; E, the vegetative cell homogenate; F, GYS-harvested lysates; G, intact spores; H, solubilized spores; I, trypsin-digested spores.

연구 결과는 본 실험의 결과와 일치한다고 볼 수 있다. 본 실험의 내독소 결정체와 아포간의 교차 항원-항체 반응의 결과에서 보듯이 이들 사이의 공통 항원이 존재하며 약 138 kDa 정도의 단백질로 보여진다. 영양 세포에 대한 항혈청은 내독소 단백질 및 포자 단백질과는 전혀 반응을 하지 않았으며, 영양 세포의 110 kDa과 30 kDa 단백질 랜드만을 인식하였다(Fig. 6, Lane E). 이와같은 결과를 보면 내독소 결정체 및 아포내 항원 결정기의 조성이 영양 세포와는 전혀 다른 양상을 갖고 있는 것을 알 수 있다.

요 약

B. thuringiensis subsp. *sotto*로부터 분리한 내독소 단백질의 용해 과정과 단백질 분해 효소에 의한 활성화 기작을 *in vitro* 상에서 관찰하였다. 내독소 결정체와 아포를 GYS 배지에서 유도 생성한 후, 이들 물질의 분리를 위해 Sucrose 선상 밀도구배를 조성하여 초원심분리하였다. 분리한 내독소 단백질을 시간 별로 10 mM dithiothreitol/50 mM carbonate buffer

(pH 10)에서 녹인 후 전기영동한 결과, 138 kDa의 내독소 단백질이 104 kDa, 60 kDa 및 25 kDa의 단백질로 분해되었다. 내독소 단백질의 활성화를 위해 용해된 내독소 단백질을 다시 trypsin으로 처리한 결과, 104 kDa의 단백질은 완전히 분해되어 사라지고 60 kDa과 25 kDa의 단백질만이 남아 있었다. 이와 같은 단백질 단편은 trypsin 저항성 단백질로서, 곤충의 종장 내에서 실제로 치사 작용을 나타내는 활성화된 결정성 내독소 단백질로 보인다. 또한 *B. thuringiensis* subsp. *sotto*의 내독소 단백질, 아포 및 영양 세포 사이의 항원 단백질 연관성을 알아보기 위해 각 물질에 대한 항혈청을 준비하여 immunoblot 하였다. 각각의 항혈청을 가지고 교차 반응한 결과 내독소에 대한 항혈청은 아포를 강하게 인식하고 영양 세포와는 반응을 하지 않았으며, 아포에 대한 항혈청은 내독소와는 강한 항원-항체 반응을 보였지만 영양 세포 단백질은 인식하지 않았다. 또한 영양 세포에 대한 항혈청은 내독소 및 아포를 전혀 인식하지 않았다. 이와 같은 결과를 보면 내독소 결정체 및 아포내 항원 결정기의 조성이 영양 세포와는 전혀 다른 양상을

보이는 것을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학기술재단의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Luthy, P. 1980. Insecticidal Toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Lett.* **8**: 1-7.
2. Somerville, H.J. 1978. Insect Toxin in Spores and Protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Trends Biochem. Sci.* **3**: 108-110.
3. Dulmage, H.T. 1980. in Microbial control of pests and plant disease 1970-1980 (Burges, H.D., ed) pp. 193-222, Academic Press, London.
4. Ishiwata, S. 1901. On a Kind of Severe Flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* **114**: 1-5.
5. Berliner, E. 1911. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. *Z. Gesamte Getteidewesen (Berlin)* **3**: 63-70.
6. Berliner, E. 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. *Z. Ang. Entomol.* **2**: 29-56.
7. De Barjac, H. and E. Franchon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains. *Entomophaga* **35**: 233.
8. Norris, J.R. 1964. The Classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* **27**: 439-447.
9. Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
10. Dulmage, H.T. 1981. Insecticidal Activity of Isolates of *Bacillus thuringiensis* and Their Potential for Pest Control. Pp. 193-222. In H.D. Burges (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, Inc., (London), Ltd., London.
11. Smith, G.E., M.D. Summers, and M.J. Fraser. 1983. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 2156-2165.
12. 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.
13. Stahly, D.P., D.W. Dingman, L.A. Bulla, Jr. and A.I. Aronson. 1978. Possible Origin and Function of the Parasporal Crystals in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**: 581-588.
14. Gonzalez, J.M. Jr., H.T. Dulmage, and B.C. Carlton. 1981. Correlation Between Specific Plasmids and Delta-endotoxin Production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* **5**: 351-365.
15. Gonzalez, J.M., Brown, B.J. and Carlton, B.C. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* Plasmids Coding for Delta-endotoxin among Strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**: 6951-6955.
16. Kronstad, J.W., Schnepf, H.E. and Whiteley, H.R. 1983. Diversity of Locations for *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Genes. *J. Bacteriol.* **154**: 419-428.
17. Ge, A.E., Rivers, D., Milne, R. and Dean, D.H. 1991. Functional Domains of *B. thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins: Refinement of the *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* Specificity Domains on Cry I Ac. *J. Biol. Chem.* **226**: 17954-17958.
18. Lu, H., F. Rajamohan and D.H. Dean. 1994. Identification of Amino Acid Residues of *Bacillus thuringiensis* δ-Endotoxin Cry I Aa Associated with Membrane Binding and Toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* **176**(17): 5554-5559.
19. Sacchi, V.F., P. Parenti, G.M. Hanozet, B. Giordana, P. Lüthy, and M.G. Wolfersberger. 1986. *Bacillus thuringiensis* Toxin Inhibit K⁺-gradient-Dependent Amino Acid Transport across the Brush Border Membrane of *Pieris brassicae* Midgut Cells. *FEBS Lett.* **204**: 213.
20. 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 of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **29**: 124-128.
21. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
22. Yasunori Nagamatsu, Yuichi Itai, Chitoshi Hatanaka, Gunki Funatsu and Katsuya Hayashi, 1984. A Toxic Fragment from the Entomocidal Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**(3): 611-619.
23. Monro, R.E. 1961a. Serological studies on the formation of protein parasporal inclusions in *Bacillus thuringiensis*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11**: 321-331.
24. Somerville, H.J. 1971. Formation of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*. *Eur. J. Biochem.* **18**: 226-237.
25. Bechtel, D.B. and Bulla, L.A. 1976. Electron microscopes study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bact.* **127**: 1472-1481.
26. Monro, R.E. 1961b. Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **81**: 225-232.

(Received 6 June 1995)