

형질전환체, *Bacillus thuringiensis* PT0529내에서 세가지 내독소 단백질 유전자들의 발현 특성

박현우 · 제연호 · 진병래 · 서숙재* · 강석권

서울대학교 농업생명과학대학

*경상대학교 자연과학대학

Expression and Characterization of Three Types of δ -Endotoxin Genes in Transformant, *Bacillus thuringiensis* PT0529

Hyun Woo Park, Yeon Ho Je, Byung Rae Jin,

Sook Jae Seo* and Seok Kwon Kang

College of Agricultural and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

*College of Natural Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

Abstract

To characterize expression and formation of three type crystal proteins in transformant, *Bacillus thuringiensis* PT0529 was analysed by transmission electron microscope and SDS-PAGE according to growth. The results showed that the introduced crystal protein genes, *cryIVD* and *cytA*, were well expressed at earlier stage than resident crystal protein gene of *B. thuringiensis* NT0423, and the formation of three-type crystal proteins were also expressed with their own morphology. However, resident crystal protein of *B. thuringiensis* PT0529 was smaller than that of wild type *B. thuringiensis* NT0423, suggesting that resident crystal protein production was interfered with introduced two type crystal protein genes.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, transformant, *CryIVD*, *CytA*

서 론

*Bacillus thuringiensis*는 그람 양성 토양세균으로서 성장조건이 악화되면 포자를 형성하는데, 이때 함께 생성되는 내독소 단백질 결정체는 인축에는 해가 없으면서 균주에 따라 각각 나비목, 파리목 및 딱정벌레목의 곤충에 대해서 강한 독성을 지니고 있기 때문에 미생물 살충제로서 크게 주목받고 있다(Hofte와 Whiteley 1989). 이들 내독소 단백질 유전자는 독성과 핵산 염기서열에 따라서 크게 5가지 type으로 분류되며, 대다수의 *B. thuringiensis*는 다이아몬드형의 내독소 단백질 결정체를 생성한다. 다이아몬드형의 내독소 단백질 결정체는 일반적으로 약 130 kDa 내외의 분자량을 가지며, 하나의 결정체내에 여러개의

서로 밀접하게 관련된 내독소 단백질들이 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 이외에도 사각형, 원형, 마름모형 등 다른 형태의 결정체를 형성하는 *B. thuringiensis* 균주들도 있으며, 그 형태가 명확하지 않은 것도 있다(Yamamoto와 Powell 1993).

근래에 와서 분자생물학의 급속한 발전과 함께 *B. thuringiensis*의 내독소 단백질 유전자를 *B. thuringiensis*내로 간편하고 효율적으로 도입할 수 있는 conjugational transfer, electroporation 등의 system들이 보고된 뒤, 유전공학적인 기법을 이용하여 기주범위가 넓고 독성이 강화된 살충활성을 갖는 새로운 *B. thuringiensis* 균주의 제작이 활발해졌다(Bone과 Ellar 1989, Mahilon 등 1989, Lereclus 등 1989). 이에 따라서 내독소 단백질 유전자를 포함하는 plasmid가

curing된 균주내에서 conjugational transfer를 이용하여 한개의 *cryIIIa*와 두개의 *cryIA(c)* 유전자가 동시에 발현된 예가 보고되었다(Carlton과 Gawron-Burke 1993). 또한 최근에는 나비목과 파리목 곤충에 동시 독성을 보이는 내독소 단백질을 형성하는 균주에 파리목의 모기 유충에 강력한 독성을 가지는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 균주의 *cryIVD*와 *cytA* 유전자를 형질전환하여 활성이 강화된 새로운 균주의 제작이 보고되었다(Park 등 1995). 그러나, 이러한 여러가지 형질전환 균주들의 내독소 단백질 발현에 있어서 도입된 유전자에 의해 발현된 내독소 단백질과 수용체가 가지고 있는 내독소 단백질간의 발현 과정에 대한 연구 결과는 아직 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 형질전환 균주내에서 수용체의 내독소 단백질과 도입된 두가지 내독소 단백질간의 발현 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

실험에 사용된 균주인 *B. thuringiensis* PT0529 (Park 등 1995)는 *B. thuringiensis* NT0423 (김 등 1993)을 수용체로 하여, 모기 유충에 강한 독성을 보이는 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 *cryIVD*와 *cytA* 유전자가 클로닝되어 있으며 selectable marker로서 erythromycin과 ampicillin을 가지고 있는 *B. thuringiensis*-*E. coli* shuttle 발현벡터 pCG5(Chang 등 1993)를 도입시킨 형질전환 균주이다.

2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

실험에 사용된 형질전환 균주 *B. thuringiensis* PT0529를 12.5 µg/ml의 erythromycin이 첨가된 200 ml의 G.Y.S.(Glucose-Yeast extract-Salt) 배양액에 단일 콜로니를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 진탕배양 하면서, 접종후 12시간 간격으로 108시간까지 20 ml씩의 샘플을 채취하였다. 채취된 샘플은 즉시 4,500 g에서 10분간 원심분리하여 집균하고 -70°C에 보관하면서 사용하였다. Laemmli의 방법에 의하여, 준비된 샘플에 각각 150 µl의 5X sample buffer에 섞은 다음 100°C 물에서 5분간 가열한 후, 원심분리하여 상등액을 회수하고 3% stacking gel과 10% separating gel을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다(Laemmli 1970).

3. 전자현미경 관찰

투과 전자현미경 관찰을 위한 시료는 각 시간대별의 *B. thuringiensis* PT0529 시료를 수거하여 원심분리를 통해 얻어진 침전물을 250 µl의 agar에 넣어 잘 풀어준뒤 3% glutaraldehyde로 고정하고 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 세척한 후, 동 완충액으로 만든 1% osmium tetroxide로 2차 고정하였다. 그리고 50, 70, 90, 100%의 에탄올 및 100% 아세톤으로 탈수하여 Epon수지(Epon812)에 포매하고 LKB-Ultratome(MT-5000)으로 초박절편을 만들어 7% uranyl acetate와 0.1% lead citrate로 염색하여 관찰하였다(Hitachi HU-II).

결과 및 고찰

하나의 *B. thuringiensis* 세포에서 동시에 세가지 내독소 단백질의 발현 특성을 관찰하기 위하여, 나비목과 파리목 곤충에 독성을 보이는 *B. thuringiensis* NT0423을 수용체로 하여 형질전환된 *B. thuringiensis* PT0529에서 원래 수용체가 생성하는 다이아몬드형 CryI-type의 내독소 단백질과 도입된 CryIVD 및 CytA 단백질의 세가지 형태의 내독소 단백질 형성을 성장 과정에 따라 투과 전자 현미경으로 관찰하였다(Fig. 1). 그 결과, 초기에는 세포의 분열과 함께 뚜렷한 내독소 단백질의 모양은 관찰되지 않았으나, 그 크기가 커지면서 원형이 되었다(Fig. 1의 A). 36시간째에 *B. thuringiensis* PT0529는 포자 형성과 함께 도입 유전자인 *cryIVD*와 *cytA*의 내독소 단백질 생산을 개시하였으며, CytA는 매우 큰 형태의 inclusion을 형성하였다(Fig. 1의 B). 48시간 후에는 숙주가 생산하는 원래의 내독소 단백질도 관찰되었으며, 이들 내독소 단백질들은 그 자신의 형태를 띠기 시작하였다(Fig. 1의 C). 60시간이 경과하면서 포자의 성숙과 함께 하나의 *B. thuringiensis* 내에서 세가지의 내독소 단백질이 그들 자신의 정상적인 형태로 잘 발현되어, 포자를 중심으로 크기에 따라 이분되어 있는 특이한 구조를 관찰하였다(Fig. 1의 D). 접종후 84시간이 경과하면서 *B. thuringiensis* PT0529는 autolysis가 완전히 일어났으며, 이때 G.Y.S. 배지에서 숙주인 *B. thuringiensis* NT0423의 내독소 단백질인 bipyramid 형과 발현벡터를 이용하여 도입된 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 *cryIVD*와 *cytA* 유전자에 의한 것으로 추정되는 원형의 내독소 단백질들이 세포 파편과 함께 혼재되어 있음을 관찰하였다(Fig. 1의 E와 F).

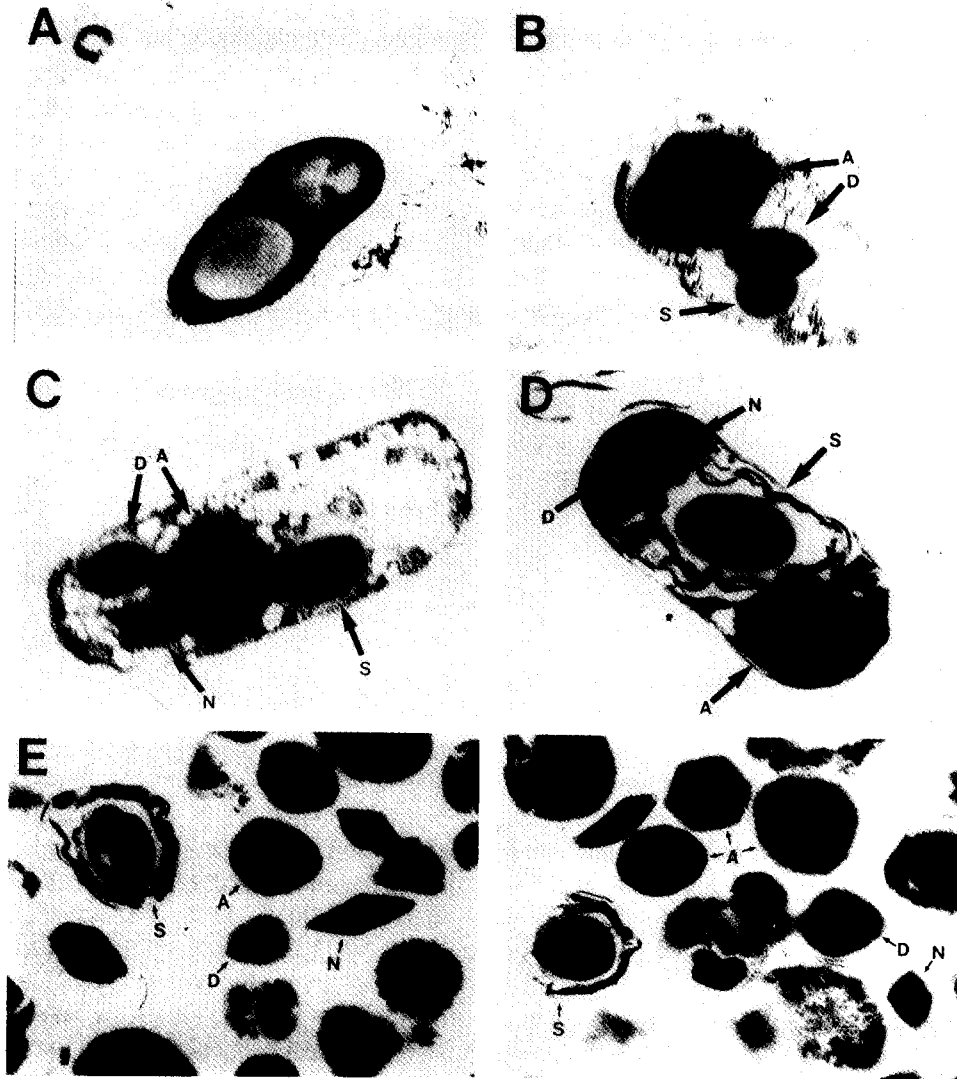


Fig. 1. Formation of crystals in *B. thuringiensis* PT0529. After the cells were plated on nutrient agar containing 25 $\mu\text{g/ml}$ erythromycin, each samples was collected at every 12 hr. The production of CryIVD (D), CytA (A) and NT0423 crystal protein (N) in *B. thuringiensis* PT0529 was observed by TEM. A, 24 hr (X64,000); B, 36 hr (X64,000); C, 48 hr (X64,000); D, 60 hr (X64,000); E, 84 hr (X55,000); F, 96 hr (X55,000). Spores are indicated as S.

한편, 형질전환체 *B. thuringiensis* PT0529내에서 성장에 따른 내독소 단백질의 발현과 그 양을 알아보기 위하여, 형질전환체를 접종후 12시간 간격으로 수거하여 SDS-PAGE 분석을 행하였다(Fig. 2). 그 결과는 Fig. 1의 투과 전자 현미경 관찰 결과와 마찬가지로 도입된 *cryIVD*와 *cytA* 유전자들에 의한 내독소 단백질들이 숙주가 생산하는 내독소 단백질보다 먼저 합성되었으며, 그 발현량에 있어서도 도

입된 유전자들에 의해 합성된 내독소 단백질이 숙주가 생산하는 내독소 단백질의 발현량보다 많게 나타났다. 또 초기 단계부터 내독소 단백질 밴드가 나타남으로써 비록 inclusion은 형성되지 않았지만 용해 형태의 내독소 단백질들이 합성되어 세포내 존재함을 알 수 있었다.

이상의 결과들로 볼때 형질전환체 *B. thuringiensis* PT0529에서 내독소 단백질의 발현은 숙주세포 원래

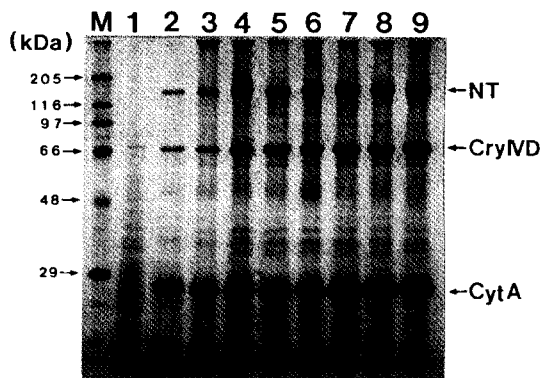


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of three type crystal proteins in *B. thuringiensis* PT0529. *B. thuringiensis* PT0529 was cultured in G.Y.S. medium and harvested at 12 hr (lane 1), 24 hr (lane 2), 36 hr (lane 3), 48 hr (lane 4), 60 hr (lane 5), 72 hr (lane 6), 84 hr (lane 7), 96 hr (lane 8) and 108 hr (lane 9) after seeding. The cell lysates were analysed by 10% SDS-PAGE. The positions of crystal proteins of *B. thuringiensis* NT0423 (NT), CryIVD and CytA are indicated by arrows.

의 내독소 단백질보다 도입된 *cryIVD*와 *cytA*가 먼저 합성되었으며, 그 발현량에 있어서도 높게 나타났는데, 이는 투과 전자 현미경 관찰 결과와 전기영동 분석 결과가 일치하였다. 전기영동 분석 결과 초기 단계부터 높은 발현량을 보인 CytA는 전자밀도가 낮은 매우 큰 inclusion을 형성하였으며, 그 크기는 평균 약 1.3 μm 의 크기로 Federici 등(1992)이 이미 보고한 결과와 일치하였는데, 이것은 pCG5 내에 포함되어 있는 포자 형성기 동안 CytA의 형성을 증대시키는 것으로 알려진 20 kDa 단백질 때문인 것으로 생각된다(Adams 등 1989, Wu와 Federici 1993). 한편 형질전환체 *B. thuringiensis* PT0529에서 세가지의 내독소 단백질은 그들 자신의 고유 형태로 잘 발현되었으나, 수용체인 *B. thuringiensis* NT0423이 생성하는 bipyramid형의 내독소 단백질은 전반적으로 그 크기가 김 등(1993)이 보고한 형질전환되지 않은 야생주 *B. thuringiensis* NT0423이 생성하는 내독소 단백질보다 작게 나타났다. 이는 앞서의 보고에서 형질전환체인 *B. thuringiensis* PT0529의 독성을 수용체로 사용된 *B. thuringiensis* NT0423과 비교하였을 때, 파리목인 빨간집모기(*Culex pipiens*)에 대한 독성은 상당히 상승되었으나, 나비목인 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대한 독성은 다소 떨어진 결과(Park 등 1995)와 관련이 있는 것으로 보인다.

따라서, 이러한 결과들은 형질전환체 내에서 벡터에 의하여 도입된 내독소 단백질 유전자의 발현은 수용

체의 내독소 단백질 유전자 발현에 영향을 받지 않으며, 반면 외부유전자의 도입으로 인하여 수용체가 생성하는 내독소 단백질은 그 발현이 간섭받는 것으로 보여진다.

적 요

나비목과 파리목 곤충에 독성을 보이는 *B. thuringiensis* NT0423을 수용체로 하여 형질전환된 *B. thuringiensis* PT0529에서 원래 수용체가 생성하는 내독소 단백질과 도입된 CryIVD 및 CytA 단백질들 간의 발현 특성을 분석하기 위하여, *B. thuringiensis* PT0529에서 내독소 단백질들간의 발현을 성장 과정에 따라 투과 전자 현미경 관찰 및 단백질 전기영동으로 분석하였다. 그 결과, *B. thuringiensis* PT0529에서 내독소 단백질의 발현은 원래의 수용체 내독소 단백질보다 도입된 CryIVD와 CytA가 먼저 합성되었으며, 그 발현량에 있어서도 높게 나타났다. 또한, *B. thuringiensis* PT0529에서 세가지 내독소 단백질은 그들 자신의 고유 형태로 잘 발현되었으나, 수용체인 *B. thuringiensis* NT0423의 내독소 단백질은 그 크기에 있어서 다소 작게 관찰되었다. 따라서 형질전환체 내에서 도입된 내독소 단백질 유전자의 발현은 수용체의 내독소 단백질 유전자 발현에 영향을 받지 않는 반면 외부 유전자의 도입으로 인하여 수용체가 생성하는 내독소 단백질은 그 발현에 있어서 간섭을 받는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 서울대학교 농업생물신소재연구센터와 과기처(U.R.과제)의 연구비 지원에 의해 수행되었습

인 용 문 헌

- Adams, L. F., J. E. Visick and H. R. Whiteley. (1989) A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 521-530.
- Bone, E. J. and D. J. Ellar. (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 171-178.
- Carlton, B. C. and C. Gawron-Burke. (1993) Genetic improvement of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide development, pp. 43-61. In L. Kim (ed.), *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York.

- Chang, C., Y. M. Yu, S. M. Dai, S. K. Law and S. S. Gill.** (1993) High level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 815-821.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley.** (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
- Kim, H. S., H. W. Park, S. H. Kim, Y. M. Yu, S. J. Seo and S. K. Kang.** (1993) Dual specificity of δ -endotoxin produced by newly isolated *Bacillus thuringiensis* NT0423. *Korean J. Appl. Entomol.* **32**: 426-432.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux and M. M. Lecadet.** (1989) Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 211-218.
- Mahilon, J., W. Chungjatupornchai, J. Decock, S. Dierckx, F. Michiels, M. Peferoen and H. Joos.** (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 205-210.
- Park, H. W., H. S. Kim, D. W. Lee, Y. M. Yu, B. R. Jin and S. K. Kang** (1995) Expression and synergistic effect of three types of crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **214**: 602-607.
- Wu, D. and B. A. Federici.** (1993) A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **175**: 5276-5280.
- Yamamoto, T. and G. K. Powell.** (1993) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: Recent advances in understanding its insecticidal activity, pp. 3-42. *In* L. Kim (ed.), *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York.