

## Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 내에서 *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 *cryIVD* 유전자의 발현

이대원<sup>1</sup> · 박현우<sup>1</sup> · 진병래<sup>1</sup> · 정영호<sup>2</sup> · 박영목<sup>2</sup> · 강석권<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>서울대학교 농생물학과, <sup>2</sup>한국표준과학연구원 기초과학지원 연구소

**Expression of *cryIVD* Gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803.** Dae-Weon Lee<sup>1</sup>, Hyun-Woo Park<sup>1</sup>, Byung-Rae Jin<sup>1</sup>, Young-Ho Chung<sup>2</sup>, Young-Mok Park<sup>2</sup> and Seok-Kwon Kang<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea. <sup>2</sup>Korea Basic Science Institute, Taejeon 305-333, Korea — *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 is a gram-positive soil bacterium producing mosquitocidal parasporal inclusions composed of several crystal proteins. Among these crystal protein genes, *cryIVD* gene is one of major component which has 72 kDa in size. However, these parasporal inclusions sink quickly from the surface of water where mosquito larval feeding occurred. To develop mosquitocidal cyanobacterium, therefore, we constructed the expression vector, pCYASK 5-1 harboring *cryIVD* gene. The expression vector, pCYASK5-1 was transformed into the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 reported as a natural mosquito larval food source and the transformants were selected with kanamycin. Expression of *cryIVD* gene in transformant was characterized by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblot analysis. The mosquitocidal activity of a transformant was determined with *Culex tritaeniorhynchus*. The results showed that the transformed cyanobacterium is toxic to mosquito larvae and will be expected as a potential agent that is used for mosquito control.

*Bacillus thuringiensis*는 토양세균으로, 나비목, 파리목, 딱정벌레목 곤충에 특이적으로 독성을 보이는 내독소 단백질(Crystal)을 생성한다는 점 때문에, 오래전부터 해충의 미생물적 방제 수단으로 이용되어 왔다(1). 내독소 단백질의 작용기작은 목적해충이 먹이와 함께 *B. thuringiensis* 포자와 내독소 단백질을 섭취하면, 유충 증장 내의 알칼리조건에서 가공된 내독소 단백질이 상피세포에 있는 수용체와 결합하여, 상피세포에 1차 중독을 일으키고, 파괴된 상피세포를 통해 혈강 내로 들어간 포자와 내독소 단백질이 증식함으로써 유충의 섭식을 중지시켜, 곤충을 치사에 이르게 하는 것으로 알려져 있다(2).

한편 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*와 subsp. *morrisoni* PG-14은 파리목에 속하는 모기 또는 검정파리에 높은 독성을 나타내는 내독소 단백질을 생성하는데, 이들 두 균주가 가지고 있는 내독소 단백질은 각각 135, 125, 72, 28 kDa의 분자량을 갖는 CryIVA, CryIVB, CryIVD, CytA로 밝혀졌다(3, 4).

그러나, 이들 *B. thuringiensis*를 모기의 방제에 직접 사용하는 데에는 몇가지 단점이 있다. *B. thuringiensis*의 내독소 단백질과 포자는 유충의 섭식장소인 수면으로부터 급격히 사라질 뿐만 아니라, 이 균주들이 생성하는 내독소 단백질의 하나인 *cytA* 유전자의 산물이

시험관 내에서 척추동물의 혈구를 파괴하는 효과가 있는 것으로 보고되었다(5). 따라서 이러한 문제의 해결을 위하여, 수서환경 안에서 내독소 단백질을 적용하고자 모기 유충의 먹이가 되는 생물체 내에서 내독소 단백질을 직접 발현시키고자 하는 시도가 이루어지고 있는데, cyanobacteria는 *B. thuringiensis* 내독소 단백질 중 모기유충에 독성을 갖는 *cryIV*에 속하는 유전자를 직접 발현하는데 많은 장점을 가지고 있기 때문에, 형질전환된 cyanobacterium를 제작하기 위한 여러가지 시도가 보고되고 있다(6-10).

Angsuthanasombat의 Panyim(6)은 *Agmenellum quadruplicatum* PR6에서 CryIVB 단백질을 발현시켰으나, 이때 CryIVB 단백질의 발현수준과 살충성은 매우 낮았다. 또 Chungjatupornchai(11)는 *Synechocystis* PCC 6803을 숙주로 하여, *cryIVB*와 *cytA* 유전자를 담배의 *psbA* promoter를 이용하여 발현시켰다. 그러나 이 경우도 내독소 단백질의 발현수준은 매우 낮았고, 형질전환된 세포는 모기에 독성을 보이지 않았는데, 그 원인은 *cryIVB*와 *cytA* 유전자 mRNA의 안정화 수준이 다르기 때문이라고 보고하였다. Murphy와 Stevens(12)는 *A. quadruplicatum* PR6에 *cryIVD* 유전자와 phycocyanin promoter를 translational fusion 하고, 형질전환하여 단백질을 발현시켰으나, 형질전환된 cyanobacteria는 모기에 대해 독성이 느리게 나타났다. Soltes-Rak 등(13)은 *Synechococcus* PCC7942에 *cryIVB* 유전자를 형질전환하고 *cryIVB* 발현조절기작을 연구하여, mRNA 분해가 내독소 단백질 생성에 영향을 주며, 비효율적인

\*Corresponding author.

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14, cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803, mosquitocidal *cryIVD* gene

translation과 ribosome 결합부분이 단백질 합성저해와 급격한 mRNA 분해에 영향을 주는 것을 밝혔다.

따라서 본 연구는 수서생태계에서 모기유충의 먹이이며, 광합성 부유세균인 cyanobacterium 내에서 *cryIV* 유전자의 안정적인 발현을 위하여, 최근에 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*에서 보고된 19 kDa 단백질을 발현하는 19K 유전자와 그 앞부분에 *CryIVD* 발현에 중요한 373 bp 길이의 *EcoRV*-*BspHI* 부분(14)을 포함하는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 유전자 절편을 발현벡터인 pOV81에 클로닝하고, *Synechocystis* PCC6803에 형질전환시킴으로써, 내독소 단백질의 발현과 뇌염모기 유충에 대한 살충효과를 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmid

형질전환의 수용체로 사용된 *Synechocystis* PCC6803과 발현벡터 pOV81은 Harvard 대학의 Bogorad 박사로부터 얻었다. 발현벡터 pOV81에 클로닝하기 위한 내독소 단백질은 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 내독소 단백질 유전자인 *cryIVD*와 *cytA* 유전자를 포함하고, *B. thuringiensis*와 *E. coli*의 replication origin을 모두 가진 shuttle 벡터, pCG5(15)로부터 절단하여 사용하였다.

### pCYASK5-1의 제작

내독소 단백질 유전자인 *cryIVD*와 *cytA*를 포함하고 있는 pCG5 벡터를 제한효소 *KpnI*과 *SacI*으로 처리하여, *cryIVD*와 *cytA* 유전자를 포함하는 6.7 kb 절편을 잘라낸 후, 역시 *KpnI*과 *SacI*으로 처리된 발현벡터 pOV81에 ligation시켜 pCYASK5를 제작하였다. Cyanobacterium에 도입하기 위한 발현벡터 pCYASK5-1은 pCYASK5를 *EcoRV*와 *SacI*로 처리하여 *cytA* 유전자를 결손시키고, Klenow fragment를 반응시킨 후 ligation시킴으로써 제작하였다.

### Plasmid DNA의 분리

*E. coli* 균주로부터 플라스미드의 분리는 alkaline lysis 방법(16)을 변형하여 사용하였다. *E. coli*를 LB 배양액에서 12시간동안 배양한 후, 5,000 g에서 5분동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 10 ml G.T.E 용액[50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl(pH 8.0), 10 mM EDTA]을 넣고, 균체를 강하게 풀어준 후 4°C에서 5분동안 정치하였다. 새로 만든 20 ml NaS 용액(0.2N NaOH, 1% SDS)을 넣어 균체를 균질화시킨 후, 상온에서 10분간 정치하였다. 15 ml 3M potassium acetate 용액(5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, 멸균증류수 28.5 ml)을 넣어 천천히 섞어 주고, 4°C에서 5분간 정치한 다음, 15,000 rpm에서 10

분동안 원심분리하여 상청액을 회수하였다. 상청액에 phenol과 chloroform을 1:1로 넣어 15,000 rpm에서 5분동안 원심분리한 후, 상청액을 회수한 다음 100% 에탄올 30 ml을 넣고 15,000 rpm에서, 10분동안 원심분리하였다. 침전물에 500  $\mu$ l TE 용액을 넣어 녹인 후, RNase(10  $\mu$ g/ml)를 넣고 37°C에서 30분동안 반응시켜 RNA를 제거한 뒤, 1% agarose gel에서 전기영동하였다.

### 형질전환

클로닝한 벡터의 *Synechocystis* PCC6803으로의 형질전환은 Grigorieva와 Shestakov(17)의 방법을 부분적으로 변형하여 수행하였다. Cyanobacterium의 증식배지인 BG-11(18)에서 28°C, 4일동안 배양하여 OD<sub>730</sub>이 0.8~1.3 정도가 되게 한 후, 농도가 10<sup>8</sup> cells/ml이 되도록 1.5 ml 튜브에 넣었다. pCYASK5-1을 1  $\mu$ g 농도로 1.5 ml 튜브에 첨가하여, 28°C에서 약 4시간동안 배양하였다. 세포를 1.5% BG-11 한천배지에 top-agar를 이용하여 도말한 후, Glucose 첨가여부, 형질전환 시간(도말후 6시간, 12시간), kanamycin 처리시간(도말후 6시간, 12시간)과 광원과의 거리조건에 차이를 두어 형질전환을 수행한 후, 배지에 kanamycin(10  $\mu$ g/ml)을 넣고, 1~2주 사이에 형성된 콜로니를 선발하였다. 콜로니가 형성된 균주를 다시 kanamycin(5, 10, 15, 20, 25  $\mu$ g/ml)이 첨가된 BG-11 한천배지에 도말한 후, 자란 균주를 선발하였다.

### SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

*Synechocystis* PCC6803과 형질전환체를 250 ml BG-11 배양액에 단일콜로니로 접종하여 28°C에서 OD<sub>730</sub>이 2가 될 때까지 배양하고, 배양액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 집균하였다. Murphy와 Stevens(12)의 방법을 사용하여, 세포 10 ml을 분주하고 -20°C에서 얼린후 실온에서 녹이는 방법을 2회 반복한 뒤, 세포를 5,000 rpm에서 5분동안 원심분리하였다. 침전물은 Lysis 용액[50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl(pH 8.0), 10 mM EDTA]을 첨가하여 풀어주고, lysozyme(5 mg/ml)을 첨가하여, 실온에서 5분동안 방치하였다. 세포를 14,000 g에서 1분동안 원심분리하고, 0.1 ml lysis 용액으로 씻어준 후, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM EDTA, 2% SDS가 들어 있는 용액 0.05 ml을 첨가하여 침전물을 풀어주었다. 다시 세포를 -80°C에서 10분동안 방치한 후 37°C에서 녹이고, NaOH를 최종 농도 0.05N이 되게 첨가한 후, 37°C에서 30분동안 배양하였다. 여기에 Dissociation buffer[60 mM Tris-Cl(pH 6.8), 10 mM dithiothreitol, 2% SDS, 16% glycerol, 0.01% bromophenol blue]를 부피비로 3배 첨가하여 2분동안 끓인 후, Laemmli(19) 방법으로 12.5% SDS-PAGE를 수행하였다.

### Immunoblot analysis

SDS-PAGE gel을 Towbin 등(20)의 방법을 사용하여 immunoblot 완충액[24 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol]에서 nitrocellulose filter로 단백질을 electrophoretic transfer 하였다. 단백질이 전이된 nitrocellulose filter를 3% skim milk로 blocking 하고, 미리 준비한 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 *CryIVD* 항체를 PBST[NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l, NaN<sub>3</sub> 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l, Tween 20 0.5 ml/l] 완충액으로 200배 희석하여 1차 항체로 결합시키고, Goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma)를 2차 항체로 결합시켰다. 발색반응은 기질용액[2M MgCl<sub>2</sub> 5 µl/ml, nitro blue tetrazolium 200 µg/ml, bromochloroindolyl phosphate 100 µg/ml]을 20 ml 넣고 발색시킨 뒤, 증류수로 반응을 정지시켰다.

### 독성검정

독성검정은 서울대학교 위생곤충학 연구실에서 분양 받은 뇌염모기(*Culex tritaeniorhynchus*) 2~3령 유충을 사용하였다. BG-11 배지에서 *Synechocystis* PCC6803과 형질전환체를 OD<sub>730</sub>이 1~1.5 될 때까지 배양한 후, 독성효과를 알아보기 위해 처리구 당 각각  $1.40 \times 10^5 \sim 10^7$  cells/ml 농도로 희석하고 3령의 모기유충을 접종하여 4일동안 치사율을 관찰하였다. 독성검정은 3반복으로 실시하였다.

### 결과 및 고찰

*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 내독소 단백질 유전자 *cryIVD*를 발현하는 형질전환 cyanobacterium을 제작하기 위해, pCG5로부터 *cryIVD*와 *cytA* 유전자를 제한효소 *KpnI*과 *SacI*으로 절단하여 발현벡터 pOV81에 결합시켜 pCYASK5를 제작한 뒤, *cytA* 유전자를 제거함으로써 최종적으로 *cryIVD* 내독소 단백질 유전자를 포함하는 cyanobacterium 발현벡터 pCYASK5-1을 제작하였다(Fig. 1). 형질전환된 cyanobacterium을 제작하기 위한 발현벡터 pCYASK5-1에서 *cytA* 유전자를 제거한 것은 *cytA* 유전자 산물이 시험관 내에서 척추동물을 파괴하는 효과가 있는 것으로 보고되었고(5), 또 많은 결과들에서 *cytA* 유전자가 독성증가에 큰 효과가 없는 것으로 보고되고 있기 때문이다(21, 22).

한편, Dervyn 등(13)은 *cryIVD* 유전자를 발현하는 오페론 구조에서 *cryIVD* 유전자 앞부분에 19K의 새로운 유전자가 존재한다는 사실을 밝혔으며, *cryIVD* 유전자가 발현되기 위해서는 19K 유전자 앞부분에 있는 373 bp 길이의 *EcoRV*-*Bsp*HI 부분이 중요하다고 보고했다.

따라서 본 실험의 pCYASK5-1 발현벡터는 373 bp 길이의 *EcoRV*-*Bsp*HI 부분과 19K 유전자, *cryIVD* 및

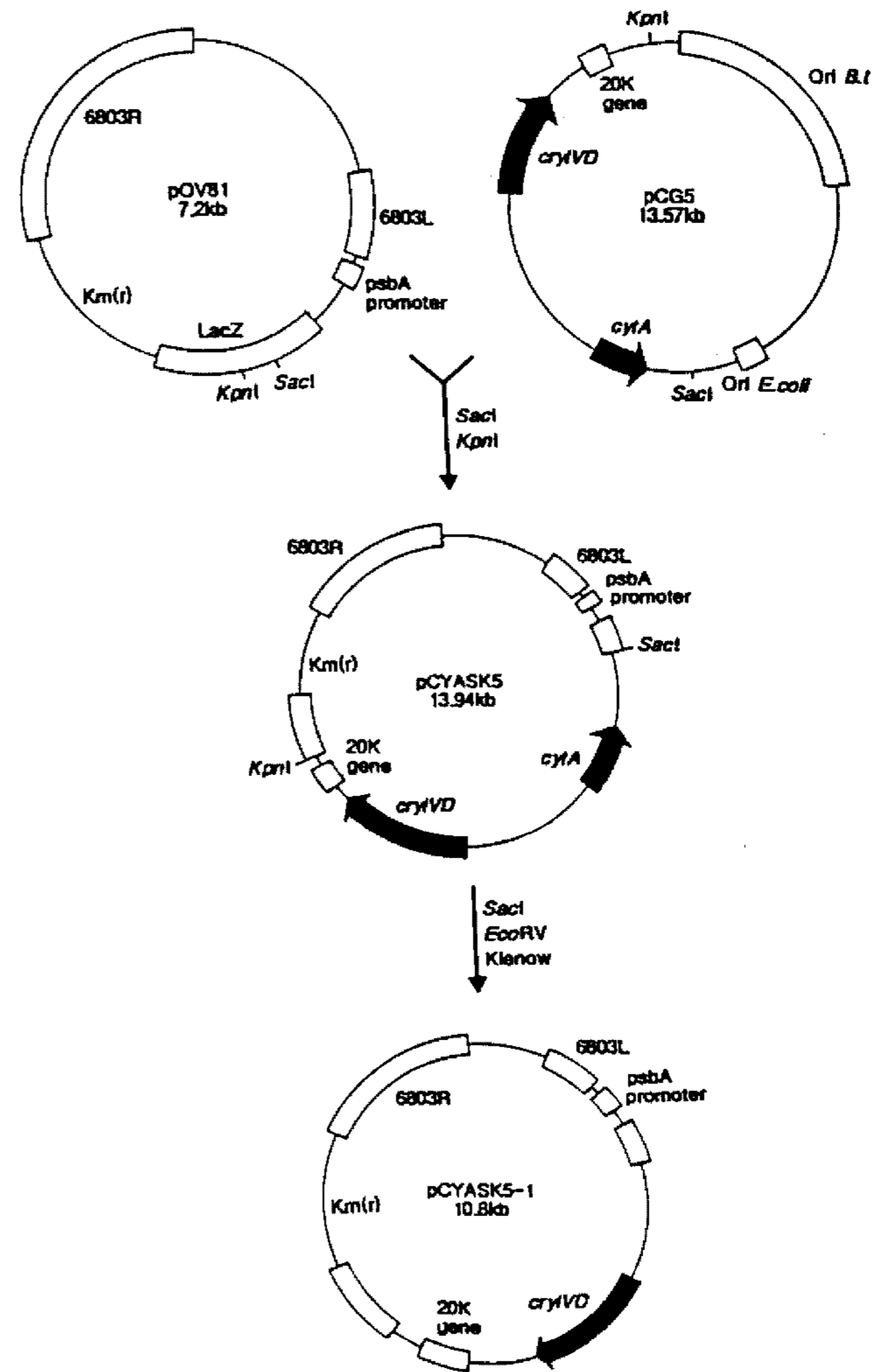


Fig. 1. Construction of expression vector pCYASK5-1.

The *cryIVD* and *cytA* genes eluted from pCG5 were ligated to pOV81 digested with *SacI* and *KpnI* using T4 DNA ligase to generate pCYASK5. The expression vector pCYASK5-1 was constructed by excision of *cytA* gene from pCYASK5.

20K 유전자로 구성된 오페론을 발현벡터에 클로닝함으로써 *cryIVD* 유전자의 안정적인 발현을 유도하고자 했다.

발현벡터 pCYASK5-1을 *Synechocystis* PCC6803 균주에 형질전환시키고, kanamycin 배지에서 형질전환체를 선발한 뒤, *cryIVD* 유전자의 발현을 SDS-PAGE와 immunoblot으로 분석하였다(Fig. 2). 그 결과, 단백질 전기영동상에서는 *cryIVD* 유전자의 발현정도가 야생주인 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14에서 처럼 뚜렷하게 관찰되지는 않았지만, immunoblot 분석 결과 형질전환체 내에서 *CryIVD*가 발현됨을 확인할 수 있었으며, 그 분자량은 야생주의 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14와 마찬가지로 크기인 약 72 kDa이었다.

Cyanobacterium 형질전환체 내에서 발현된 *CryIVD*의 모기유충에 대한 살충효과를 알아보기 위하여, 독성검정은 파리목의 뇌염모기 2~3령 유충을 공시하여

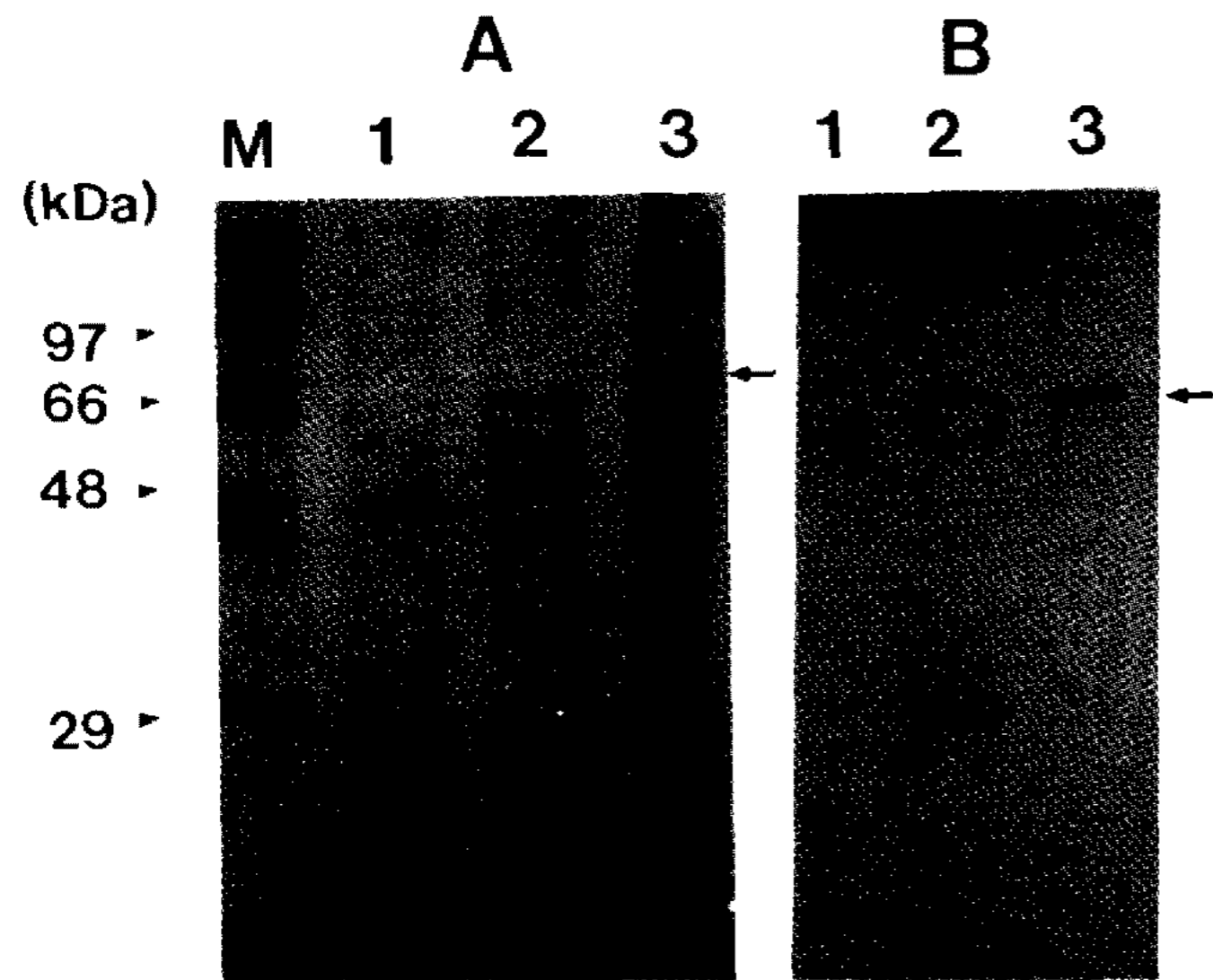


Fig. 2. SDS-PAGE (A) and immunoblot analysis (B) of Cry-IVD expressed in transformant.

M: Molecular weight marker, Lane 1: *Synechocystis* PCC 6803, Lane 2: Transformant, Lane 3: *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14

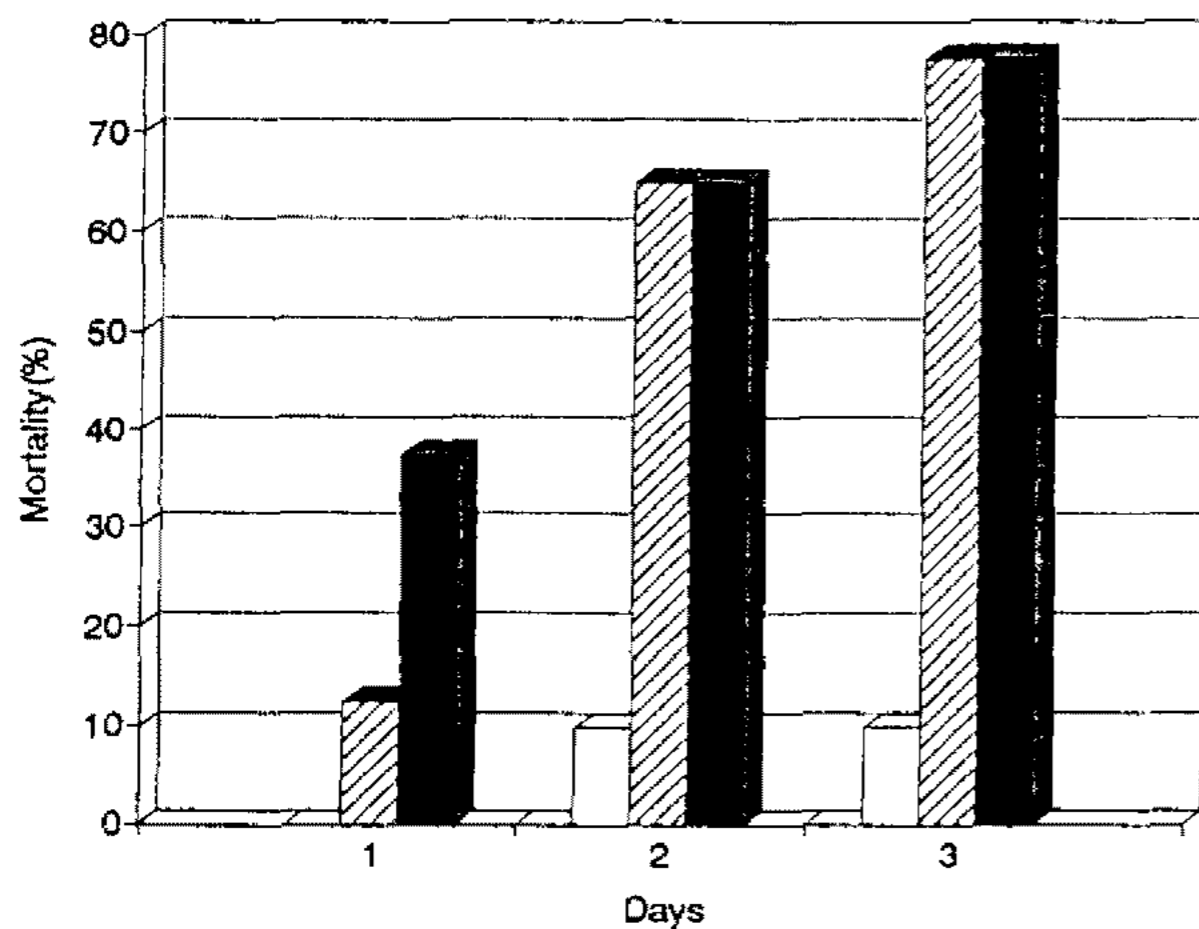


Fig. 3. Toxicity of transformant against *Culex tritaeniorhynchus* larvae.

□: *Synechocystis* PCC6803 (1.40 × 10<sup>6</sup> cells/ml)  
 ▨: transformant (1.40 × 10<sup>6</sup> cells/ml)  
 ■: transformant (1.40 × 10<sup>7</sup> cells/ml)

접종후 4일동안 조사하였다(Fig. 3). 그 결과, 형질전환체에서 발현된 내독소 단백질 *CryIVD*에 의한 독성은 접종후 시간이 경과할수록 증가하여 3일째 최고치를 나타냈으며, 선발 농도별로는 1.40 × 10<sup>7</sup> cells/ml 농도에서 접종후 1일째 약 40%의 높은 살충효과를 나타냈으나 시간이 경과할수록 1.40 × 10<sup>6</sup> cells/ml 농도와 마찬가지로 경향으로 2일째 최대증가율을 보였고, 최고치를 나타낸 접종후 3일째 독성은 약 80%로 높게 나타났다. 이때 대조구로 사용된 야생주 *Synechocystis* PCC6803의 경우는 자연치사등의 여러 요인에 의해 약 10%의 치사율을 보였다. 이 결과는 Soltes-Rak 등이 endogenous *Bacillus* promoter와 *petF1* promoter에 *cr-*

*yIVB* 유전자를 결합시켜 만든 형질전환체에서 보고한 최대 독성 증가 시간이 48시간 이내인 것과 일치하며(7), Murphy와 Stevens가 PCR을 이용하여, phycocyanin promoter에 *cryIVD* 유전자를 fusion하여 만든 형질전환체에서 보고한 모기유충에 대한 50% 이상의 독성은 처리후 4일 이상이 걸린 것(12)과 비교할 때, 본 연구에서 사용된 형질전환체의 *cryIVD* 유전자 발현에 따른 독성은 상당히 효과적이었다. 이러한 결과는 수서생태계에서 모기유충의 먹이이며, 광합성 부유세균인 cyanobacterium에서 내독소 단백질을 발현함으로써 미생물 살충제로 사용되고 있는 *B. thuringiensis*의 내독소 단백질이 수서생태계에서 부유하지 못하고 가라앉으며, 생활환을 이루지 못한다는 문제점을 극복할 수 있으리라 생각되며, 아울러 효과적인 모기방제를 위해 적용이 기대된다.

### 요 약

미생물 살충제로 사용되고 있는 *B. thuringiensis*를 모기유충방제에 적용하기 위한 시도는 *B. thuringiensis*가 수서생태계에서 부유하지 못하고 가라앉으며, 생활환을 이루지 못한다는 문제점으로 인해 적용에 어려움이 있다. 따라서 본 연구는 모기유충에 강한 독성을 갖는 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14의 *cryIVD* 유전자를 모기유충의 먹이인 cyanobacterium에 도입하기 위하여 발현벡터 pCYASK5-1을 제작하고, cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803에 형질전환시켜, 세포 내에서 *cryIVD* 유전자의 발현과 뇌염모기에 대한 독성을 조사하였다. 그 결과 형질전환체 내에서 *cryIVD* 발현은 immunoblot 분석을 통해 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14에서 발현된 단백질과 같은 분자량으로 발현되는 것을 확인하였으며, 모기유충에 대한 형질전환체의 독성은 1.40 × 10<sup>6</sup> cells/ml 농도에서 약 80%의 치사율을 나타내었다.

### 감사의 말

본 연구는 과기처(U.R. Project) 및 서울대학교 농업생물신소재 연구센터의 지원으로 수행되었습.

### 참고문헌

1. Hofte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
2. Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
3. Goldberg, L.J. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Ano-*

- phelus serengetii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* **37**: 355-358.
4. Padua, L.E., M. Ohba and K. Aizawa. 1980. The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **36**: 180-186.
  5. Gill, S.S. and J.M. Hornung. 1987. Cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* proteins to insect and mammalian cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* **50**: 16-25.
  6. Angsuthanasombat, C. and S. Panyim. 1989. Biosynthesis of 130-kilodalton mosquitolarvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2428-2430.
  7. Soltes-Rak, E., D.J. Kushner, D.D. Williams and J.R. Coleman. 1993. Effect of promoter modification on mosquitocidal *cryIVB* gene expression in *Synechococcus* sp. strain PCC 7972. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2404-2410.
  8. De Marsac, T.N., F. de la Torre and J. Szulmajster. 1987. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 159M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 389-398.
  9. Xudong, X., K. Renqui and H. Yuxiang. 1993. High larvicidal activity of intact cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 expressing gene 51 and gene 42 of *Bacillus sphaericus* sp. 2297. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 247-250.
  10. Thiery, I., L. Nicolas, R. Rippka and de Marsac N.T. 1991. Selection of cyanobacteria isolated from mosquito breeding sites as potential food source for mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1354-1359.
  11. Chungjatupornchai, W. 1990. Expression of the mosquitocidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene bar in *Synechocystis* PCC 6803. *Curr. Microbiol.* **21**: 283-288.
  12. Murphy, R.C. and Jr. S.E. Stevens. 1992. Cloning and expression of *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1650-1655.
  13. Soltes-Rak, E., D.J. Kusher, D.D. Williams and J.R. Coleman. 1995. Factors regulating *cryIVB* expression in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 301-308.
  14. Dervyn, E., S. Poncet, A. Klier and G. Rapoport. 1995. Transcriptional regulation of the *cryIVD* operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **177**: 2283-2291.
  15. 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.
  16. Birnboim, J.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
  17. Grigorieva, G. and S. Shestakov. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**: 367-270.
  18. Murray, R.G.E., W.A. Wood, N.R. Krieg and P. Gerhardt. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington.
  19. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
  20. Towbin, H.R., R. Stachelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
  21. 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. Commun.* **214**: 602-607.
  22. Delecluse, A., J.K. Charles, A. Kiler and G. Rapoport. 1991. Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.* **173**: 3374-3381.

(Received 2 December 1995)