

병원력 차이를 보이는 두 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophilus*와 *Staphylococcus gallinarum*)의 면역저하 능력 비교 분석

박영진 · 김길호¹ · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 농생물학과, ¹상주대학교 잠사곤충학과

Comparative Analysis of Host Insect Immunodepression Induced by Two Entomopathogenic Bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* and *Staphylococcus gallinarum*, with Differential Pathogenicities

Youngjin Park, Gilho Kim¹ and Yonggyun Kim*

School of Bioresource Sciences, College of Natural Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

¹Department of Sericulture and Entomological Resources, Sangju National University, Sangju 742-711, Republic of Korea

ABSTRACT : Immunodepression can be required for entomopathogenic bacteria to induce their potent pathogenicities to the target insects. Here, we raise a hypothesis that the capacity of a pathogenic bacterium to induce the target insect immunodepression has positive relationship with the degree of pathogenicity. *X. nematophilus* had 1,200 times as potent as another entomopathogenic bacterium, *Staphylococcus gallinarum* against the fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori*, when they were injected into the hemocoel. Although both bacteria had significant cytotoxic effect on the hemocytes of *B. mori*, *X. nematophilus* gave faster and greater cytotoxicity than did *S. gallinarum*. In cellular immune reactions, *B. mori* could form ≈ 20 hemocyte nodules against the bacterial injection with 5×10^5 cells. The number of the hemocyte nodules was significantly depressed when live *X. nematophilus* was injected, but not in *S. gallinarum*. Activation of prophenoloxidase (proPO) was depressed in the bacterial injection. The depression of PO activation was significantly greater in *X. nematophilus* infection than in *S. gallinarum* injection. Lysozyme activity was induced by the injection of *S. gallinarum* at 4 h after the treatment, but not induced in *X. nematophilus* at all the time. These results showed that *X. nematophilus* induced greater immunodepression against *B. mori* and resulted in higher pathogenicity than did *S. gallinarum*. Therefore, this study suggests that the immunodepression induced by entomopathogenic bacteria has positive relationship with their pathogenicity.

KEY WORDS : *Xenorhabdus nematophilus*, *Staphylococcus gallinarum*, *Bombyx mori*, Immunodepression, Pathogenicity, Phenoloxidase, Lysozyme, Nodule formation

초 록 : 곤충병원세균이 효과적으로 병원력을 발휘하는 데 대상 곤충의 면역저하가 요구될 수 있다. 본 연구는 대상곤충의 면역저하가 병원세균의 살충능력에 직접 연관된다는 가설을 세웠다. 곤충병원세균을 5령 누에(*Bombyx mori*)의 혈강에 접종하였을 때, *X. nematophilus*는 다른 곤충병원세균인 *Staphylococcus gallinarum* 보다 1,200배 높은 병원력을 보였다. 비록, 두 곤충병원세균은 누에의 혈구세포에 대해서 독성효과를 가지고 있지만, *X. nematophilus*는 *S. gallinarum*과 비교해 보다 빠르고 높은 세포독성 영향을 보였다. 세포성 면역반응에서 5×10^5 농도로 세균이 접종되었

*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

을 때, 누에는 약 20개 정도의 소낭을 형성하였다. 특히, 살아있는 *X. nematophilus*가 접종된 누에에서 소낭 형성은 크게 감소하였지만, *S. gallinarum*은 소낭 형성 감소에 영향을 주지 않았다. 두 세균 모두는 prophenoloxidase (proPO)의 활성화를 억제시켰다. 그러나 *X. nematophilus*가 *S. gallinarum*보다 높게 PO 활성화를 억제시켰다. 라이소자임의 활성유도는 *S. gallinarum* 접종 후 4시간에서 관찰되었으나, *X. nematophilus*를 접종하였을 때는 라이소자임의 활성이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 누에에서 *X. nematophilus*가 *S. gallinarum*보다 더 큰 면역저하를 유발하여 병원성을 높였다는 것을 보여준다. 따라서 본 연구는 곤충병원세균에 의해서 유발된 면역저하는 곤충병원세균의 병원성과 연관되어 있다는 것을 제시한다.

검색어 : *Xenorhabdus nematophilus*, *Staphylococcus gallinarum*, 누에, 면역저하, 병원성, phenoloxidase, 라이소자임, 소낭 형성

곤충은 척추동물에서 볼 수 있는 특이적 면역 항체 단백질과 같이 고도로 발달된 면역기작을 가지고 있지 않지만, 병원성 미생물이나 내부기생충들과 같은 외래물질의 침입에 대하여 선천성 방어기작을 나타내고 있다(Brehelin *et al.*, 1989). 이러한 곤충의 방어기작은 외래 인자를 인식하는 단계에서 인식 정보를 면역작용자에게 전달하는 중개반응 그리고 외래물질을 공격하는 면역반응 단계 등으로 구별될 수 있다(Gillespie *et al.*, 1997). 이러한 곤충 면역반응은 세포성 및 체액성 면역반응으로 구별되며, 세포성 면역는 혈구의 직접적 반응으로서 식균작용, 소낭형성 및 피막형성 등으로 구분된다(Stanley, 2000). 체액성 면역는 지방체와 일부 혈구세포에서 합성되어지는 항생물질에 의한 살균 또는 흡소닌 반응이 알려져 있다(Cociancich *et al.*, 1994; Meister *et al.*, 1997; Koizumi *et al.*, 1999).

세균 침입에 대해서 나타나는 세포성 면역반응으로서 소낭형성 반응은 세균 이외에 진균의 포자, 바이러스, 그리고 원생동물 등 작은 크기의 외래물질이 높은 밀도로 혈강에 존재할 때 주로 나타나며(Kim and Park, 1998), phenoloxidase (PO)의 활성이 경화반응에 영향을 주어 혈구성 소낭형성 반응을 유도한다(Dunphy and Webster, 1988). 세균 침입에 대한 체액성 면역반응은 라이소자임, cecropin, dipterin, defensin 등과 같은 항세균단백질의 발현이 보고되었다(Boman and Hultmark, 1987). 이 중에서 라이소자임은 특히 그람 양성 세균 침입에 대해서 주로 발현되며, 혈강으로 분비되어 대상 세균벽의 당단백질인 peptidoglycan의 N-acetylglucosamine과 N-acetylmuramic acid의 β -1,4 결합 분해를 통해 항세균작용을 발휘한다(Pathak, 1993; Bae and Kim, 2003).

*Xenorhabdus nematophilus*는 장내세균과에 속하는

그람음성의 곤충병원세균으로 선충의(*Steinernema carpocapsae*)의 장속에서 공생한다(Akhurst, 1980; Akhurst and Boemare, 1990). *X. nematophilus*는 공생 선충이 대상 곤충의 자연 개구부(입, 항문, 기문 등)를 통하여 혈강으로 침입했을 때, 선충의 장속에서 분리되어 나와 대상 곤충의 면역저하를 유도하고, 살충효과를 발휘한다(Park and Kim, 2000; Park *et al.*, 2003). 또한 *X. nematophilus*는 대상 곤충 내에서 항생물질을 분비하여 다른 미생물의 오염을 방지하거나 선충의 증식에 필요한 영양분을 제공한다(Gaugler, 2001). 또 다른 곤충병원세균인 *Staphylococcus gallinarum*은 누에(*Bombyx mori*)의 혈강에서 무름병을 야기하여 기주를 치사시키는 그람양성 세균이다(Kim *et al.*, 2002). *S. gallinarum*에 감염된 누에의 전반적인 병징은 몸의 색깔이 검은색 빛이나 갈색 빛으로 변하고(Kim *et al.*, 2002), 흙갈색의 작은 반점들이 나타나며 죽게 되면 몸이 물러지는 특징을 보인다(Kim *et al.*, 1986).

본 연구는 *X. nematophilus*의 병원성이 대상 곤충의 면역저하를 유도하면서 나타난다는 결과(Park and Kim, 2000)에 기초하여 대상 곤충 면역저하와 병원력 관계를 분석하는 데 목적을 두었다. 이를 위해 병원력에서 뚜렷이 구별되는 두 곤충병원세균을 대상으로 이들이 대상 기주곤충에 발휘하는 면역억제기작을 비교하면서 면역저하와 병원력 사이의 관계를 분석하였다.

재료 및 방법

시험곤충과 곤충병원세균

경상북도 농업기술원 잠사곤충사업장에서 인공사료

로 사육된 장려품종 칠보잠(잠107×잠108, *B. mori*)의 2면잠을 분양받아 사용하였다. 시험에 사용한 누에는 3령부터 23-25°C 온도, 70-80% 상대습도 조건에서 뽕잎으로 사육하였고, 5령 유충의 누에를 실험에 이용하였다.

곤충병원세균인 *X. nematophilus*와 *S. gallinarum*는 안동대학교 농생물학과 곤충생리실험실에서 동결보관 중인 것을 이용하였고, 각각 TSA (tryptic soy agar, Difco, USA)와 NA (nutrient agar, Difco, USA) 배지에서 48시간 동안 28°C에서 배양하였다.

곤충병원세균의 병원성 조사

실험에 이용된 두 종의 곤충병원세균들은 0.7% NaCl 용액을 이용해 10^8 cfu (colony forming unit)/ml 농도의 현탁액으로 만들어 병원성 검정용 접종원으로 사용하였다. 병원성 검정은 5령 1일된 누에를 이용하였으며, 누에의 몸을 70% 에탄올이 흡수된 키파이프를 이용해서 몸을 소독하였다. 각 곤충병원세균의 접종은 Park and Kim (1999)의 방법에 따라서 농도별 (10^1 , 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 cfu/ml)로 준비된 세균 현탁액 5 μ l를 미량주사기(Hamilton, USA)를 이용해서 복부 마지막 복지를 통해 혈강으로 주사하였다. 세균이 접종된 누에는 28°C 배양기에서 사육되었으며, 치사율은 6시간 단위로 조사되었다. 조사는 핀셋으로 머리, 가슴 그리고 배 부분을 눌러서 누에의 자의적 움직임이 있는지를 관찰하여 사망 유무를 판별하였다.

Phenoloxidase (PO) 활성조사

실험에 이용된 곤충병원세균이 누에의 혈강 내의 PO 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 Park and Kim (2000)의 방법을 이용하였다. 세균을 5 μ l (5×10^5 cfu) 농도로 주사한 후 일정시간(0, 1, 2, 4, 8, 12, 16시간) 간격으로 누에 혈액을 추출하여 5분간 원심분리(4,000 rpm, 4°C) 후 혈구세포를 제외한 혈장만을 수거하였다. 이 혈장 10 μ l에 기질인 DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine, Sigma, USA) 1 mg과 990 μ l의 0.01 M 인산완충용액(pH 7.0)을 혼합한 후 PO 활성을 495 nm의 분광광도계(Kontron, USA)를 이용하여 5분 간격으로 측정하였다. 또한 곤충병원세균을 농도별 (10^1 , 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 cfu)로 접종한 후 위와 동일한 방법으로 혈액을 추출하여 PO 활성을 분석하였다. PO 활성은 5분당 흡수도의 변화로 표현하였다.

세포성 면역반응 및 혈구 수 조사

곤충병원세균에 대한 시험곤충의 세포성 면역 조사를 위해 0.7% NaCl 용액을 이용해 10^8 cfu/ml 농도로 준비된 세균현탁액 5 μ l를 미량주사기를 이용하여 복부 마지막 복지를 통해 혈강으로 주사하였다. 그리고 세균을 접종한 후 일정 시간대별(0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 시간)로 누에를 해부하여 해부현미경(Zeiss, Germany)에서 직접 소낭형성 수를 조사하였다. 실험은 3반복으로 반복 당 3마리의 누에를 이용하였다. 그리고 99°C에서 30분간 열처리된 각 곤충병원세균을 위와 동일한 방법으로 혈강에 주사한 후 16시간 뒤에 살아있는 세균과 열처리하여 죽은 세균에 대한 소낭형성 비율을 조사하였다.

또한 실험에 이용된 두 종의 곤충병원세균이 누에의 혈강 내의 혈구세포에 미치는 영향을 조사하기 위해서 Park and Kim (2000)의 방법과 같이 세균을 접종한 후 일정시간(0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 시간) 간격으로 누에의 혈액 10 μ l를 0.04% trypan blue 시약 10 μ l와 같이 혼합한 후 광학현미경(Olympus, Japan)에서 시간별로 염색되지 않은 살아있는 혈구세포를 관찰하였다.

라이소자임 활성조사

실험에 이용된 곤충병원세균이 누에의 혈강 내의 라이소자임 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 Hultmark et al. (1980)의 방법을 이용하였다. 세균을 5 μ l (5×10^5 cfu) 농도로 주사한 후 일정시간(0, 1, 2, 4, 8, 12, 16시간) 간격으로 누에 혈액을 추출하고 5분간 원심분리(4,000 rpm, 4°C)하여 혈구세포를 제외한 혈장만을 수거하였다. 이 혈장 10 μ l는 각각 *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698, Sigma, USA)가 녹아있는 0.01 M 인산완충용액(pH 7.0) 1 ml와 혼합되어 37°C에서 30분간 처리된 후 570 nm의 분광광도계를 이용하여 5분 간격으로 측정하였다. 또한 곤충병원세균을 농도별(10^1 , 10^2 , 10^4 , 10^6 , 그리고 10^8 cfu)로 접종한 후 위와 동일한 방법으로 혈액을 추출하여 라이소자임 활성을 분석하였다. PO 활성은 5분당 흡수도의 변화로 표현하였다.

통계처리

반수치사농도는 Probit 분석법을 이용하여 LD₅₀ 값

Table 1. Pathogenicity of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* and *Staphylococcus gallinarum*, to the fifth instar larvae of *Bombyx mori* by intra-hemocoelic injection

| Entomopathogenic bacteria | N | LD ₅₀ (95% CI) | Slope ± SE | x ² | df | P |
|---------------------------|----|--|------------|----------------|----|-----|
| <i>X. nematophilus</i> | 50 | 25 (2-300) | 0.5 ± 0.1 | 1.7 | 3 | 0.2 |
| <i>S. gallinarum</i> | 50 | 30,000 (5,000-4.5 × 10 ⁶) | 0.3 ± 0.1 | 1.0 | 3 | 0.4 |

을 산출하여 나타내었다(Raymond, 1985). 또한 분광형광광도측정에 의한 PO 및 라이소자임 활성은 SAS 프로그램의 PROC GLM을 이용하여 one way ANOVA를 실시하였고 이를 토대로 최소유의차검정법의 평균간 비교 분석을 하였다(SAS Institute, 1989).

결 과

곤충병원세균의 병원력 차이

두 곤충병원세균의 살충 병원력이 5령 1일된 누에를 대상으로 비교하였다. 혈강내 주입된 *X. nematophilus*와 *S. gallinarum*은 접종 농도에 따라 높은 치사율을 나타내었다(Table 1). *X. nematophilus*와 *S. gallinarum*에 의한 누에의 반수치사농도는 *X. nematophilus*는 *S. gallinarum*보다 1,200배 높은 살충 병원력을 나타냈다.

곤충병원세균에 따른 세포성 면역저하 차이

동일한 농도의 두 곤충병원세균을 각각 누에 5령충 혈강내로 주입한 후 시간별로 생존하는 총혈구수를 조사하였다. *X. nematophilus*가 접종된 누에는 8시간부터 약 10%의 혈구세포가 파괴되어 0.7% NaCl로 처리된 대조구에 비교하여 뚜렷한 차이가 나타났으며, 세균 처리후 16시간 경과후에는 60% 이상의 혈구세포 치사하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). *S. gallinarum*이 접종된 누에는 12시간부터 약 20%의 혈구세포가 파괴되어 대조구와 뚜렷한 차이를 보이기 시작하였으나, 이후 16시간 경과후에도 더 이상의 세포치사를 보이지 않았다. 따라서 곤충의 면역기능을 담당하는 주요 기관인 혈구세포에 대한 치사 효율에 있어서 *X. nematophilus*는 *S. gallinarum*에 비해 3배 이상 높았다.

혈구 세포의 소낭형성 능력이 각각의 곤충병원세균

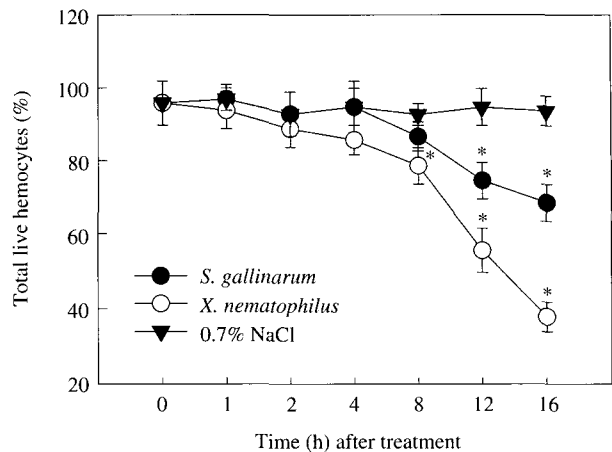


Fig. 1. Effect of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* (5×10^5 cfu) and *Staphylococcus gallinarum* (5×10^5 cfu), on the hemocytes of the fifth instar larva of *Bombyx mori*. The error bars indicate the standard deviation of the three measurements. The asterisk above error bars indicates significant mean difference at Type I error=0.05 (LSD test) compared to the value of the control at the initial time (0 h).

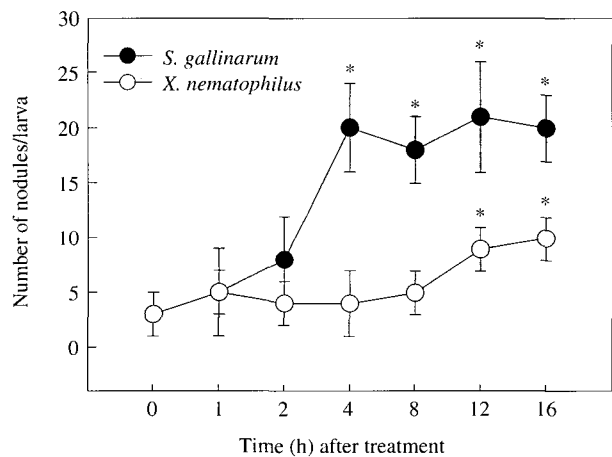


Fig. 2. Effect of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* (5×10^5 cfu) and *Staphylococcus gallinarum* (5×10^5 cfu), on the nodule formation of the fifth instar larva of *Bombyx mori*. The error bars indicate the standard deviation of the three measurements. The asterisk above error bars indicates significant mean difference at Type I error=0.05 (LSD test) compared to the value of the control at the initial time (0 h).

으로 접종된 누에에서 비교되었다. 동일한 세균 농도 (10^5 cfu)로 주입되었을 때, 두 세균 사이에는 뚜렷한 소낭형성 능력의 차이를 보였다(Fig. 2). 접종된 *S. gallinarum*에 대해서 누에 5령충은 2시간 이후 소낭형성 능력이 증가되어 약 20개의 소낭을 처리 개체당 보유하고 있었다. 그러나 *X. nematophilus*로 처리된 누에는 소낭형성 능력이 뚜렷하게 감소하여, 처리후 12시간

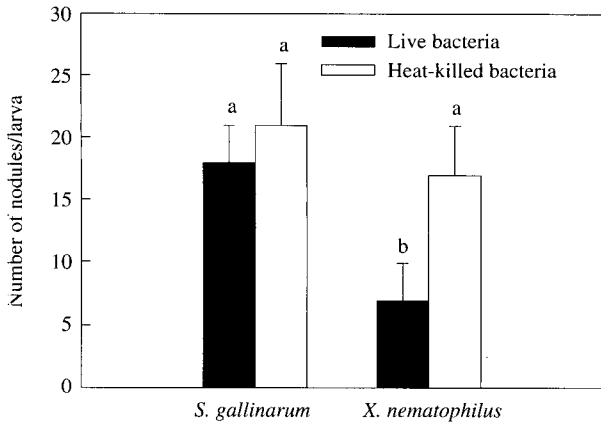


Fig. 3. Effect of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* (5×10^5 cfu) and *Staphylococcus gallinarum* (5×10^5 cfu), on the nodule formation of the fifth instar larva of *Bombyx mori*. Heat-treatment to kill the bacteria was performed by incubating the bacteria at 99°C for 30 min. The error bars indicate the standard deviation of the three measurements. Different letters above the error bars indicate significant difference between means at $\alpha=0.05$ (LSD test).

이 경과한 후에 비로서 증가를 보였으나, 그 숫자도 10개 미만을 나타냈다.

열처리하여 치사시킨 세균을 혈강에 주입하였을 때, *X. nematophilus*는 살아있는 세균 처리에 비해서 뚜렷하게 증가된 소낭형성을 보였다(Fig. 3). 그러나 *S. gallinarum* 처리된 누에 5령은 열처리로 치사된 세균이나 살아있는 세균 사이에 소낭 형성 능력에서 차이를 보이지 않았다.

곤충병원세균에 따른 phenoloxidase (PO) 활성화 차이

곤충의 세포성 면역 뿐만 아니라 체액성 면역에 관여하는 PO 활성이 각각의 세균으로 접종된 누에에서 비교되었다. 각 곤충병원세균을 동일한 농도(10^5 cfu)로 누에에 접종되었을 때, *X. nematophilus*는 접종 후 8시간에서부터 PO 활성이 억제되기 시작하였고, *S. gallinarum*은 접종 후 2시간부터 4시간 사이에 PO 활성이 최대로 증가하였다가 12시간부터 PO 활성이 억제되었다(Fig. 4).

*X. nematophilus*를 누에의 혈강에 농도별로 접종하였을 때 PO 활성은 접종 후 12시간에서 10^2 cfu 농도부터 억제되기 시작하여 접종 최고 농도인 10^8 cfu 농도에서 가장 낮은 PO 활성을 나타내었다(Fig. 5). 반면에 *S. gallinarum*을 누에에 접종하였을 때 접종 후 12시간에서 10^4 cfu 농도까지 PO 활성이 억제되지 않았

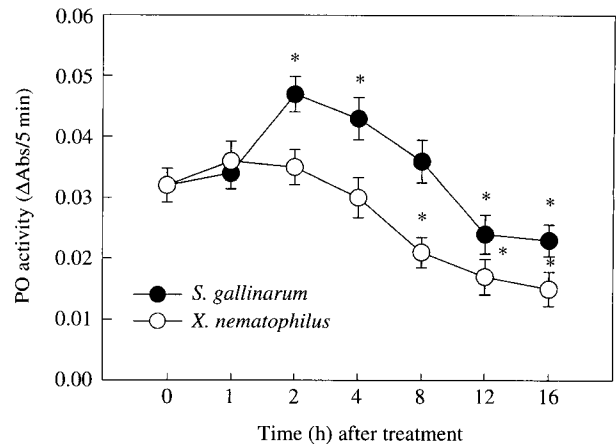


Fig. 4. Effect of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* (5×10^5 cfu) and *Staphylococcus gallinarum* (5×10^5 cfu), on the phenoloxidase (PO) activity of the fifth instar larva of *Bombyx mori*. The error bars indicate the standard deviation of the three measurements. The asterisk above error bars indicates significant mean difference at Type I error = 0.05 (LSD test) compared to the value of the control at the initial time (0 h).

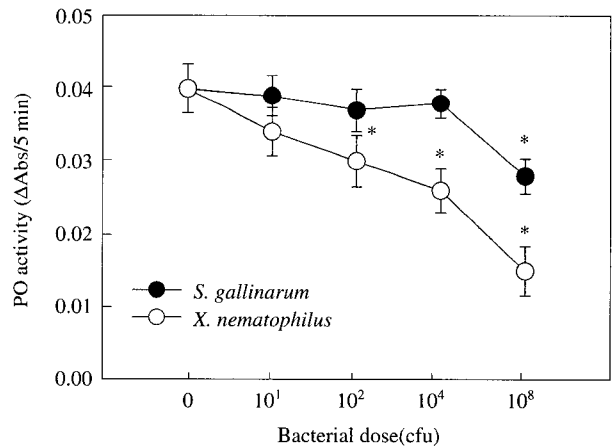


Fig. 5. Dose response of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* and *Staphylococcus gallinarum*, on the phenoloxidase (PO) activity of the fifth instar larva of *Bombyx mori*. The treated larvae at 12 h after the injection were used for the measurement of PO activities. The asterisk above error bars indicates significant mean difference at Type I error = 0.05 (LSD test) compared to the value of the control at the initial time (0 h).

으나 10^8 cfu 농도에서는 PO 활성이 억제되었다. 그러나 *X. nematophilus*에 비해서 같은 농도의 *S. gallinarum*은 PO 활성 억제 정도가 낮았다.

곤충병원세균에 따른 라이소자임 활성화 비교

두 곤충병원세균들을 동일한 농도(5×10^5 cfu)로 접종한 후 시간별로 누에 혈액의 라이소자임 활성을 조

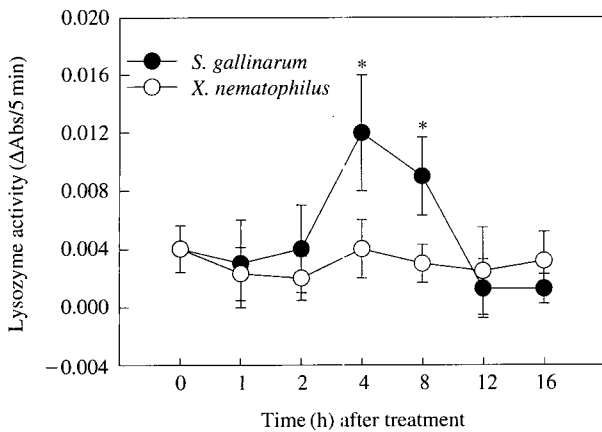


Fig. 6. Effect of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophilus* (5×10^5 cfu) and *Staphylococcus gallinarum* (5×10^5 cfu), on the lysozyme activity of the fifth instar larva of *Bombyx mori*. The error bars indicate the standard deviation of the three measurements. The asterisk above error bars indicates significant mean difference at Type I error = 0.05 (LSD test) compared to the value of the control at the initial time (0 h).

사하였다. *X. nematophilus*를 접종한 누에에서 추출한 시간별 혈액은 라이소자임의 활성화를 보이지 않았다 (Fig. 6). 그러나 *S. gallinarum*을 접종하였을 때는 접종 후 4시간부터 8시간 사이에 높은 라이소자임 활성을 보인 후, 12시간부터는 다시 감소하여 라이소자임 활성이 낮아지는 것을 보였다.

고 찰

병원력에 있어서 현격한 차이를 보이는 두 곤충병원세균에 대해서 동일한 대상 곤충을 놓고 면역치사 능력을 비교함에 따라 병원력 차이를 설명하고 이에 따라 면역저해능력이 곤충병원세균의 병원력에 중요한 척도가 된다는 것을 보이려 본 연구가 실시되었다. 누에(*B. mori*) 5령 유충에 대해서 *X. nematophilus*는 *S. gallinarum*에 대해서 반수치사 세균수를 비교할 때 1,200배 높은 병원력을 보였다. *S. gallinarum*은 실내 조건에서 누에를 대량 사육하는 경우 발생하는 무름병의 원인체로서(Kim *et al.*, 2002), 기주 누에를 치사시키는데 감염 후 10일 정도 소요된다. 그러나 *X. nematophilus*는 누에의 자연적 병원체로 간주할 수 없지만, 이 세균이 보유하는 병원력은 타 곤충을 대상으로 실시한 연구에서 매우 높은 것으로 판명되었다(Park and Kim, 2000). 특히 *X. nematophilus*는 감염 후 치사속도가 빨라서 실제적 병원력 발휘가 대상 기주

체내에서 빠르게 진전된다는 것을 제시하였다.

두 병원세균 모두 혈강에 접종하였을 때 곤충 면역의 본체인 혈구세포에 대해서 세포치사 효과를 보였다. 이러한 세포치사 효과는 결국에 대상 곤충 혈림프의 패혈증을 유발시키게 된다(Park and Kim, 2000; Kim *et al.*, 2002). 그러나 두 병원세균은 세포치사 속도와 정도 면에서 차이가 있으며, *X. nematophilus*가 보다 높은 세균치사 효과를 보였다. 특히 *X. nematophilus*가 발휘하는 세포치사 효과는 이 세균에 기인된 아포토시스(세포자멸사) 작용에 기인된 것으로 밝혀졌다(Park, 2003).

누에(*B. mori*)는 접종된 세균에 대해서 소낭형성으로 세포성 면역반응을 보였다. 이러한 소낭 형성 능력에 대해서 *S. gallinarum*은 억제능력을 보이지 못한 반면, *X. nematophilus*는 빠르고 높은 억제능력을 보였다. 열처리한 *X. nematophilus*는 이러한 면역저해 능력을 잃게 되어 살아있는 세균에 의해 기인된 물질이 소낭 형성을 억제된다는 것을 제시하였다. Park and Kim (2000)은 이러한 *X. nematophilus*의 소낭 형성 억제능력이 곤충의 eicosanoid 신호체계를 교란시킴에 따라 기인되었다고 제시하였다. 이후 *X. nematophilus*의 배양액 성분이 이러한 효과를 가지며, 주요한 작용점이 eicosanoid 신호체계의 시발점이 되는 phospholipase A₂ (PLA₂)가 된다고 증명하였다(Park *et al.*, 2003; Park and Kim, 2003).

*X. nematophilus*와 *S. gallinarum*을 5령 누에의 혈강에 접종하였을 때 PO 활성이 이들 세균에 의해서 억제되었다. 특히 본 실험에서는 동일한 농도로 각 곤충병원세균을 접종하였을 때 *X. nematophilus*는 *S. gallinarum*보다 4시간 더 빨리 PO 활성을 억제시킨 반면, 그람양성의 *S. gallinarum*는 접종 초기에 누에의 PO 활성을 증가시켰다. 또한 *X. nematophilus*는 *S. gallinarum*보다 낮은 접종 농도(10^2 cfu)에서 PO 활성이 억제되어 두 세균이 나타내는 PO 활성의 억제에는 차이가 있는 것으로 조사되었다. 곤충 혈림프에 세균이 존재할 때 serine protease에 의해서 pPO는 활성화 상태의 PO로 전환된다(Cary *et al.*, 1986). 이렇게 활성화된 PO는 혈구세포들이 혈림프에 존재하는 세균들과 결합해서 경화반응을 일으킬 수 있도록 하며, 이러한 과정을 통해 곤충의 세포성 면역반응은 활발하게 일어나며 세균들은 모두 불활성화된다(Mandato *et al.*, 1997). Forst *et al.* (1997)은 *X. nematophilus*의 세포벽에 존재하는 지질다당체에 의해 PO 활성을 억제시켜

서 곤충의 면역반응을 극복한다는 보고와 본 실험의 결과는 일치하였으며, Yokoo et al. (1992)은 기주곤충으로 *Agrotis segetum*을 이용한 실험에서 *X. nematophilus*와 이 세균의 공생관계에 있는 곤충병원성 *S. carpocapsae*가 복합적으로 PO 활성의 초기단계에 영향을 미쳐서 PO 활성을 억제한다고 보고하였다. 그러나 그람양성의 *S. gallinarum*을 누에 혈강에 접종한 후 보여지는 2시간부터 4시간 사이의 높은 PO 활성은 기주곤충이 외래물질인 이 세균에 대한 순간적인 면역반응으로, 세포성 면역반응에 영향을 준 것으로 사료된다. 결국 *S. gallinarum*을 접종하였을 때 *X. nematophilus*를 접종한 것과 비교하여 약 50% 이상의 높은 PO 활성을 보였다.

채색성 면역으로 작용하는 라이소자임 활성은 그람 양성 세균에 대해서 특이적으로 활성을 보이는 것으로 알려져 있으며(Pathak, 1993), 본 실험에서도 그람 음성균인 *X. nematophilus*의 경우 접종 후 처음부터 라이소자임의 활성이 나타나지 않았으나, 그람 양성균인 *S. gallinarum*을 접종하였을 때 접종 후 4시간부터 8시간 사이에 활성을 보여주어 그람 양성균에 대해서 선택적으로 활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 그러나 *S. gallinarum*을 접종하였을 때 접종 후 8시간 이후부터는 라이소자임의 활성이 다시 감소하는 것으로 미루어 *S. gallinarum*이 *X. nematophilus*에 비교해서 느리게 면역억제를 유도한다는 것을 뒷받침하고 있다. 위에서 서술하였듯이 *X. nematophilus*는 PLA₂의 활성을 억제시켜 eicosanoid 신호체계를 무력화시킬 수 있다. 누에에 있어서 eicosanoid류는 항생 펩타이드인 라이소자임과 cecropin 유전자 활성을 유도할 수 있다(Morishima et al., 1997). 즉, *X. nematophilus*의 PLA₂ 억제 효과는 eicosanoid류를 형성시키지 못하고 결국 라이소자임의 활성 유도가 억제되었다고 해석된다.

이상의 결과는 병원력에서 현격한 차등을 보이는 두 병원세균이 대상 곤충에 대해서 면역 억제를 시킨다는 점에서 공통적이지만, 면역 억제의 정도가 병원력에 따라 구별된다는 것을 보여주었다. 이는 *X. nematophilus*에서 확인된 곤충면역 저하(Park, 2003) 다른 병원세균들의 병원력 표현에 중요한 기작으로 작용하게 된다는 것을 제시한다. 이러한 면역저하능력과 병원력과의 관계성은 기타 곤충병원 세균의 병원력 차이를 기작적인 면에서 설명하는데 이용될 수 있다.

사 사

연구를 수행하는데 필요한 누에 사육과 정신적으로 많은 도움을 준 남지영에게 감사를 표한다. 본 연구는 농림기술관리센터의 연구비로 수행되었다.

Literature Cited

- Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121: 303-309.
- Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. pp. 79-90. In Entomopathogenic nematodes in biological control, eds. by R. Gaugler and H.K. Kaya. 365pp. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Bae, S. and Y. Kim. Lysozyme of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: activity induction and cDNA structure. Comp. Biochem. Physiol. B. 135: 511-519.
- Boman H.G. and D. Hultmark. 1987. Cell-free immunity in insect. Annu. Rev. Microbiol. 41: 103-126.
- Brehelin, M., L. Drif, K. Buad and N. Boemare. 1989. Insect hemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. Insect Biochem. 19: 301-307.
- Cary, N.C., K. Soderhall and V.J. Smith. 1986. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition and defence system in arthropods. pp. 251-286. In Hemocytic and humoral immunity in arthropods, ed. by A. P. Gupta. John Wiley and Sons, New York.
- Cociancich, S., P. Bulet, C. Hetru and J.A. Hoffmann. 1994. The inducible antibacterial peptides of insects. Parasitol. Today 13: 132-139.
- Dunphy, D.B and J.M. Webster. 1988. Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 30: 883-889.
- Forst, S., B. Dowds, N. Boemare and E. Stackerbrandt. 1997. *Xenorhabdus* and *Heterorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 51: 47-72.
- Gaugler, R. 2002. Entomopathogenic nematode. 388pp. CABI Publishing, UK.
- Gillespie, J., M.R. Kanost and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.
- Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson and H.G. Boman. 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible antibacterial proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur. J. Biochem. 106: 7-16.
- Kim, K.Y., S.K. Kang and J.C. Lee. 1986. Studies on the flacherie and denonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. Korean J. Seric. Sci. 28: 48-51.
- Kim, Y. and Y. Park. 1998. Insecticidal mechanism of entomopathogenic nematodes. Bull. Inst. Andong Natl. Univ. Agric. Sci. Tech. 5: 1-22.
- Kim, G., Y. Park and Y. Kim. 2002. Identification of a pathogenic bacterium, *Staphylococcus gallinarum*, to *Bombyx mori*. Korean J. Appl. Entomol. 41: 279-284.
- Koizumi, N., Y. Imai, A. Morozumi, M. Imamura, T. Kadotani, K. Yaoi, H. Iwahana and R. Sato. 1999. Lipopolysaccharide-binding protein of *Bombyx mori* participates in a hemocyte-mediated defense reaction against gram-negative bacteria. J. Insect Physiol. 45: 853-859.

- Mandato, G.A., L. Diehl-Jones, S.J. Moore and R.J. Downer. 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 43: 1~8.
- Meister, M., B. Lemaitre and J.A. Hoffmann. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioassays* 19: 1019~1026.
- Morishima, I., Y. Yamano, K. Inoue, N. Matsuo. 1997. Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* 419: 83~86.
- Pathak, J.P.N. 1993. *Insect immunity*. 192 pp. Kluwer academic publishers, India.
- Park, Y. and Y. Kim. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. *J. Asia-Pacific Entomol.* 2: 105~111.
- Park, Y. and Y. Kim. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.* 46: 1469~1476.
- Park, Y. 2003. *Insect immunodepression induced by an entomopathogenic Xenorhabdus nematophilus*. 255pp. Ph.D. Dissertation. Andong National University, Andong, Korea.
- Park, Y. and Y. Kim. 2003. *Xenorhabdus nematophilus* inhibits p-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA₂ of *Spodoptera exigua*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54: 134~142.
- Park, Y., Y. Kim, S.M. Putnam and D.W. Stanley. 2003. The bacterium *Xenorhabdus nematophilus* depresses nodulation reactions to infection by inhibiting eicosanoid biosynthesis in tobacco hornworms, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 52: 71~80.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORS-TOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 22: 117~121.
- SAS Institute Inc., 1989. *SAS/STAT users guide*. SAS Institute Inc.,
- Stanley, D.W. 2000. *Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems*. Princeton University Press. 277pp. New Jersey.
- Yokoo, S, S. Tojo and N. Ishibashi. 1992. Suppression of the prophenoloxidase cascade in the larval haemolymph of the turnip moth, *Agrotis segetum* by an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* and its symbiotic bacterium. *J. Insect Physiol.* 38: 915~924.

(Received for publication 24 October 2003;
accepted 27 November 2003)