

cry11Aa 유전자로 형질전환된 *Synechocystis* PCC6803의 작은빨간집모기와 중국얼룩날개모기 유충에 대한 살충효과

이대원

서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부

Mosquito Larvicidal Activity of *Synechocystis* PCC6803 Transformed with the *cry11Aa* gene to *Culex tritaeniorhynchus* and *Anopheles sinensis*

Dae-Weon Lee

School of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University,
Seoul 151-742, Republic of Korea

ABSTRACT : *Bacillus thuringiensis* produces crystal proteins toxic to medically and agriculturally important pests during sporulation. To improve the activity of insecticidal crystal protein in applying to mosquito larval control, an expression vector, pSyn4D harboring the mosquitocidal *cry11Aa* gene under control of *psbA* promoter of *Amaranthus hybridus* was constructed. This expression vector was transformed into *Synechocystis* PCC6803 and a transformant, Tr2C was selected with kanamycin. The mosquitocidal *cry11Aa* gene was stably integrated into genomic DNA of Tr2C in PCR detection using *cry11Aa*-specific primers. The transformant expressed 72-kDa Cry11Aa protein and median lethal time (LT₅₀) was approximately 2.1 days for *Culex tritaeniorhynchus* larvae and 0.7 day for *Anopheles sinensis* larvae, respectively. These results suggest this transformant can be used for mosquito larval control as a biological control agent.

KEY WORDS : Mosquito larva, *Bacillus thuringiensis*, *cry11Aa* gene, *Synechocystis* PCC6803

초 록 : *Bacillus thuringiensis*는 포자형성기 동안에 위생해충이나 농업해충에 독성을 보이는 내독소 단백질을 생성한다. 내독소 단백질의 모기 유충 방제효과를 높이기 위해, 광합성에 관여하는 *psbA* promoter로 모기 살충성 *cry11Aa* 유전자를 발현하는 pSyn4D 벡터를 제작하고, 모기 유충이 먹이로 이용하는 *Synechocystis* PCC6803에 형질전환시켰다. 형질전환체들은 kanamycin이 포함된 배지에서 선발되었으며, 정성적인 생물검정을 통해 형질전환체 Tr2C를 선발하였다. *cry11Aa* 유전자는 형질전환체의 genomic DNA에 안정적으로 결합되어 있는 것을 PCR을 이용하여 확인하였다. 형질전환체 Tr2C는 약 72-kDa 크기의 Cry11Aa 단백질을 발현하였으며, 작은빨간집모기(*Culex tritaeniorhynchus*) 3령 유충과 중국얼룩날개모기(*Anopheles sinensis*) 3령 유충에 75%가 넘는 살충력을 보였다. 모기 유충에 대한 형질전환체의 반수치사시간(LT₅₀)은 작은빨간집모기 유충과 중국얼룩날개모기 유충에 대해 각각 2.1일과 0.7일이었다. 이상의 결과들은 형질전환체 Tr2C가 모기 유충 방제에 유용하게 이용될 수 있음을 보여준다.

검색어 : 모기 유충, *Bacillus thuringiensis*, *cry11Aa* 유전자, *Synechocystis* PCC6803

*Corresponding author. E-mail: 71dwlee@hanmail.net

위생해충에 속하는 모기는 뇌염, 뎅그열(dengue fever), 황열병(yellow fever) 등의 질병을 옮기는 벡터로 알려져 있으며, 모기방제를 위해 유기합성 살충제와 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 균주가 만드는 내독소 단백질이 사용되고 있다. Bt의 살충효과는 포자형성기 동안 발현되는 내독소 단백질에 의해 나타나며, 살충 범위는 위생해충과 농업해충을 포함한다(Aronson *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 1992). 보고된 Bt 균주들 중에서 Bt subsp. *israelensis*와 *morrisoni* PG-14는 파리목 해충에 독성을 보이는 내독소 단백질들을 만들며, 내독소 단백질들(Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba) 사이에는 협력적 살충상승효과가 있는 것으로 보고되었다(Höfte and Whiteley, 1989; Crickmore *et al.*, 1995; Poncet *et al.*, 1995; Wirth *et al.*, 1997; Khasdan *et al.*, 2001). 내독소 단백질의 1차적인 작용부위는 중장의 상피세포로, 단백질 분해효소들이 내독소 단백질을 살충성을 띠게 하는 활성화된 단백질로 가공한다. 활성화된 단백질은 세포막의 투과성을 교란시켜, 세포를 파괴하고, 결과적으로 치사에 이르게 한다.

Bt subsp. *israelensis*는 20년이 넘게 모기 유충 방제에 사용되어 왔으며, 야외 모기 개체군에서 저항성은 보고되지 않았다(Margalith and Ben-Dov, 2000). 그러나 야외조건에서 모기 유충방제를 위한 Bt subsp. *israelensis*의 적용에서 제기되는 문제점에는 자외선에 의한 짧은 살충잔류효과, 반복처리에 의한 경제적 비용증가, 무거운 비중에 의한 포자의 침강, 용혈성(Hemolytic activity)을 가진 *cyt* 유전자의 안전성 등이 있다(Thomas and Ellar, 1983; Waalwijk *et al.*, 1985; Pfannestiel *et al.*, 1986; Delecluse *et al.*, 1991; Margalith and Ben-Dov, 2000). 그러므로 Cry 단백질만을 유충방제에 이용함으로써 안전성을 유지하고, 효율적 살충효과를 위해 우선적으로 해결되어야 할 문제점은 야외 조건에서 태양광에 의한 불활성화이다. 지구표면에 도달하는 UV-A/B는 광분해나 내독소 단백질의 소멸에 관여하는 것으로 생각되고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 자외선 차단제 첨가 등의 추가적인 처리공정을 수행하지만(Cohen *et al.*, 1991), 토양이나 수질 오염 등의 부수적인 문제점이 제기되고 있다. 이러한 제약들을 극복하기 위해, 수서생태계에서 내독소 단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있는 방법과 생물 탐색이 모색되어 왔다(Raymond *et al.*, 1990). 특히 cyanobacteria의 다양한 종류의 색소는 UV-B를 보호하는

기능을 하며(Ehling-Schulz *et al.*, 1997), 모기 유충이 먹이로 사용하는 cyanobacteria를 모기살충성 유전자 발현을 위한 숙주로 연구하여 왔다(Tandeau de Marsac *et al.*, 1987; Angsuthanasombat and Panyim, 1989; Murphy and Stevens, 1992; Soltes-Rak *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1997; Lluisma *et al.*, 2001).

본 연구에서는 모기유충 방제에서 Bt 내독소 단백질의 야외적용에서 제기되고 있는 단점들을 개선하기 위하여, *Amaranthus hybridus*의 광합성에 관여하는 *psbA* promoter를 이용하여, PCR로 증폭된 *cry11Aa* 유전자를 발현하는 형질전환된 *Synechocystis* PCC6803을 제작하고, 모기 유충에 대한 살충효과를 정량적으로 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

Synechocystis PCC6803와 *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *morrisoni* PG-14 균주는 각각 Bogorad 박사(Harvard Univ., USA)와 Gill 박사(Univ. of California, Riverside, USA)로부터 분양받았다. *S. PCC6803*은 30°C에서 장일과 단일조건을 16 : 8 비율로 BG-11과 Medium C (Cote and Gherna, 1994)를 이용하여 배양하였다. Bt subsp. *morrisoni* PG-14와 *Escherichia coli* 균주는 각각 28°C와 37°C에서 Luria-Bertani 배지를 이용하여 배양하였다.

벡터의 제작

발현벡터 pSyn4D를 제작하기 위해, *cry11Aa* 유전자에 특이적인 primer(cry-F와 cry-R)를 제작하고, 주형으로 *cry11Aa* 유전자를 포함하고 있는 pCG5 벡터를 이용하였다(Fig. 1A). *cry11Aa* 유전자를 증폭시키기 위해, 0.2 μM PCR primer, 0.1 μg pCG5 벡터, 200 μM dNTP, 1 μl *Taq* polymerase(5 units, Promega Co., USA), 10X 반응완충액을 넣고, 멸균증류수를 이용하여 전체부피를 50 μl로 맞춘 후, polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분 30초간 반응시키는 주기로 40회 반복하였다. PCR로 증폭된 *cry11Aa* 유전자를 *Hind*III와 *Sal*I으로 처리한 후, cyanobacteria-*E. coli* 전이벡터인 pOV81에 클로닝하여 pSyn4D를 제작

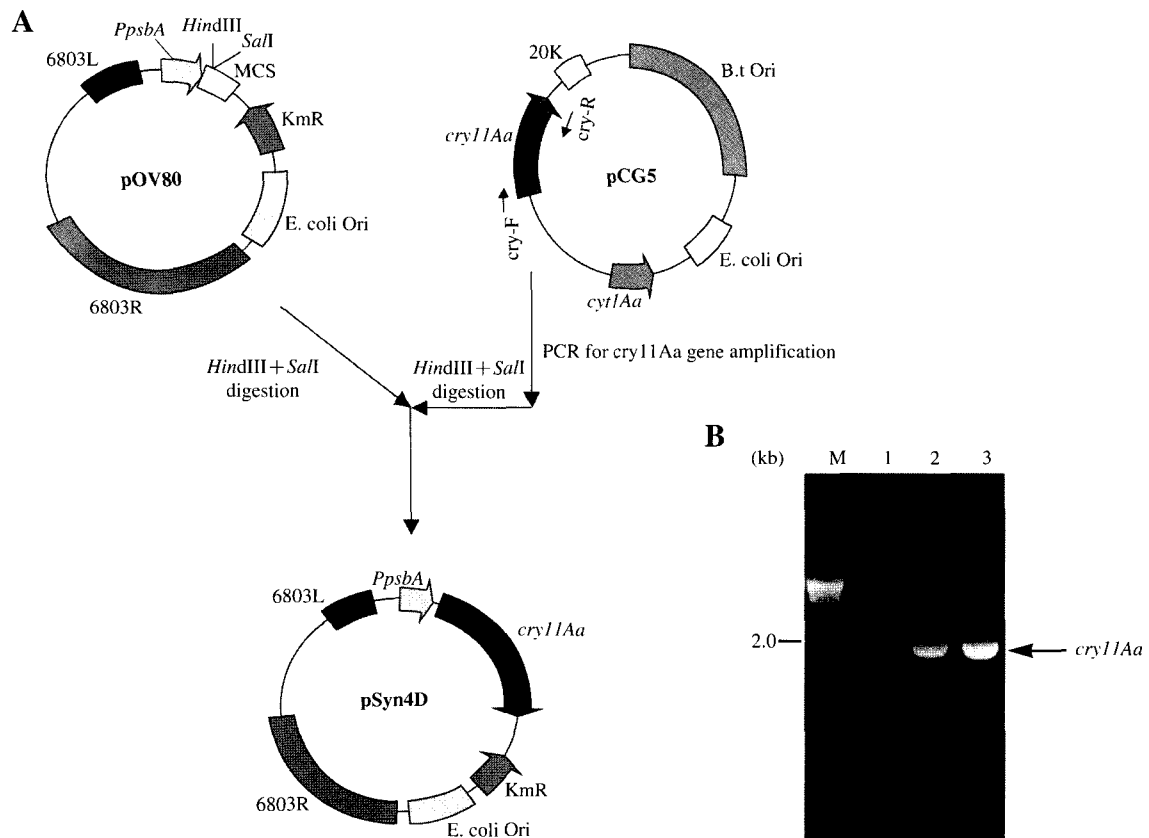


Fig. 1. The construction of a pSyn4D (A) and detection of the *cry11Aa* gene in the transformant, Tr2C (B). (A) The PCR-amplified *cry11Aa* gene was transferred from pCG5 to pOV81 by *Hind*III-*Sal*I double digestion. The resulting recombinant plasmid was designated as a pSyn4D. (B) M, λ DNA digested with *Hind*III; 1: *Synechocystis* PCC6803; 2: transformant Tr2C; 3: pCG5. The primers (*cry*-F and *cry*-R) were used to detect the *cry11Aa* gene.

하였다(Fig. 1A). PCR primer 서열은 *cry*-F (sense primer): 5'-*ccaagcttaggaggttatatggaagatagttctttag* (이탈릭체는 *Hind*III 인식부위, 밑줄 친 부분은 개시코돈)과 *cry*-R (anti-sense primer): 5'-*acgcgtcgacattacaagaggagc-cacaatac* (이탈릭체는 *Sal*I 인식부위, 밑줄 친 부분은 정지코돈)이다. 두 PCR primer는 형질전환체의 genomic DNA에서 *cry11Aa* 유전자의 탐지에도 사용하였다.

Synechocystis PCC6803의 genomic DNA 분리

S. PCC6803 genomic DNA는 Porter의 방법(1988)을 변형하여 분리하였다. 형질전환체는 20 μ g/ml kanamycin이 처리된 Medium C에서 OD₇₃₀ 측정값이 2가 될 때까지 배양한 다음, 4,500 rpm에서 4°C, 5분 동안 원심분리하였다. 침전물을 50 μ g/ml lysozyme이 들어있는 5 ml TEN 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA)으로 풀어준 다음, 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 시료에 lysis 용액(20% SDS 2.5

ml, 20 μ g/ml proteinase K 150 μ l)을 첨가하고, 50°C에서 8시간 반응시켰다. 시료를 페놀과 클로로포름이 동량으로 처리된 용액으로 2회 추출하고, 에탄올을 넣어 DNA를 침전시킨 다음, -70°C에서 30분간 방치하였다. 시료를 15,000 g, 10분 동안 4°C에서 원심분리하고, 10 μ g/ml RNase가 들어있는 10 ml TE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)으로 녹였다

Cyanobacteria의 형질전환

*S. PCC6803*의 형질전환은 Dzelzkans와 Bogorad의 방법(1986)을 변형하여 수행하였다. *S. PCC6803*을 BG-11 배지에서 OD₇₃₀ 측정값이 0.8-1.2가 될 때까지 배양하고, 2,500 rpm에서 25°C, 5분 동안 원심분리하였다. 침전물을 BG-11 배지로 현탁한 후, 세포의 농도가 10⁸/ml이 되도록 조정하였다. 5 μ g pSyn4D 벡터를 *S. PCC6803*과 섞은 다음, 28°C에서 12시간 동안 배양하였다. 시료를 1.5% BG-11 top agar와 섞고, 1%

BG-11 평판배지에 도달하여, 12시간 후에 kanamycin (20 µg/ml)로 선발하였다. 2주일 후에 평판배지에 나타난 11개 콜로니들을 선발하고, kanamycin이 첨가된 BG-11 평판배지에 도달하여 성장하는 3개 콜로니들을 재선발하였다. 생물검정을 통해 작은빨간집모기 3령 유충에 가장 높은 독성을 보인 형질전환체 Tr2C를 본 연구에 이용하였다.

단백질 분리와 Western blot analysis

Bt subsp. *morrisoni* PG-14의 내독소 단백질의 분리는 Kim *et al.* (1998)의 방법을 이용하였다. 선발된 형질전환체 Tr2C는 20 µg/ml kanamycin이 첨가된 BG-11 배지에서 OD₇₃₀에서 측정값이 1.2가 될 때까지 배양하였다. 배양액을 -70°C에서 동결하고, 녹이는 과정을 2회 반복하고, 3,000 g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하였다. 침전물을 완충액 A (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)로 강하게 흔들어 준 다음, 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 시료를 7,000 g에서 5분 동안 원심분리하고, 침전물을 완충액 A로 씻어주었다. 시료를 완충액 B (1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride, 10 mM EDTA, 2% SDS)로 풀어주고, -70°C에서 10분간 방치한 다음, 37°C에서 10분간 반응시켰다. NaOH의 최종농도가 0.1 N이 되도록 첨가하고, 37°C에서 30분간 방치하였다. 단백질시료 완충액(0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 10% Sucrose, 0.004% Bromophenol blue)을 첨가하고, 3분간 중탕하고, 3,000 g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 상청액을 시료로 사용하였다.

Western blot은 Laemmli의 방법(1970)으로 SDS-PAGE한 후, Towbin의 방법(1979)에 따라 수행되었다. 단백질을 Nitrocellulose (NC) membrane (Advantec, USA)으로 옮긴 후, 50 ml PBST 완충액에 넣고, 10% blocking (5 g skim milk/50 ml PBST 완충액) 용액에 상온에서 2시간 동안 처리하였다. Cry11Aa 단백질의 탐지는 쥐에서 얻은 polyclonal 항체를 이용하였다. Cry11Aa 항체를 1,000배 희석하여 3시간 동안 반응시키고, PBST 완충액으로 5분간 3회 씻어주었다. Goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate를 10,000배 희석하여, NC membrane과 1시간 동안 반응시키고, PBST 완충액으로 5분간 5회 씻어 주었다. 단백질 탐지는 ECL detection kit (Amersham Co., USA)를 이용하여 X-ray 필름을 현상하였다.

생물검정

선발된 형질전환체 Tr2C를 BG-11배지에 접종하고, OD₇₃₀ 측정값이 1.5-2.0이 될 때까지 배양한 다음, 2,500 g에서 3분 동안 원심분리하였다. 세포의 농도를 10⁶ cells/ml 조정하고, 3반복으로 처리하였다. 실험군 층으로 작은빨간집모기(*Culex tritaeniorhynchus*)와 중국얼룩날개모기(*Anopheles sinensis*) 3령 유충을 사용하였다. 대조구로 자연형 *S. PCC6803*을 이용하였다. 치사율은 24시간마다 조사하였으며, probit 분석을 통해서 중간치사시간(LT₅₀)을 계산하였다.

결과 및 고찰

*Synechocystis PCC6803*에서 모기 살충성 *cry11Aa* 유전자를 발현시키기 위해, pCG5 벡터를 주형으로 하여 *cry11Aa* 유전자를 PCR을 이용해 증폭하였다. 증폭된 *cry11Aa* 유전자를 *HindIII*와 *Sall*으로 처리하고, *Amaranthus hybridus*의 광합성에 관여하는 *psbA* promoter가 조절하는 위치에 클로닝하여 pSyn4D 벡터를 제작하였다(Fig. 1A). pSyn4D 벡터를 *SacI*과 *PvuII*로 처리하였을 때, 각각 9.2 kb와 6.4 kb, 2.8 kb를 나타내어 *cry11Aa* 유전자가 클로닝된 것을 확인하였다(미제시 자료). 발현벡터 pSyn4D를 *S. PCC6803*에 형질전환하여 형성되는 콜로니를 2회에 걸쳐 kanamycin 저항성을 띠는 콜로니들을 선발하고, 이들 중 작은빨간집모기(*Culex tritaeniorhynchus*) 유충에 가장 높은 독성을 보인 형질전환체 Tr2C를 최종 선발하였다. 형질전환체 Tr2C에서 *cry11Aa* 유전자를 확인하기 위하여, 자연형 *S. PCC6803*과 Tr2C에서 genomic DNA를 분리하고, *cry11Aa* 유전자에 특이적인 primer (*cry-F*, *-R*)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, Tr2C와 양성대조구로 쓰인 pCG5 벡터에서만 *cry11Aa* 유전자에 특이적인 PCR 산물을 얻었으며, 그 크기는 약 2.0 kb였다(Fig. 1B). Wu *et al.* (1997)은 *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *israelensis*가 만드는 내독소 단백질 유전자를 *Anabaena PCC7120*에 형질전환하여, 각 내독소 단백질 간의 살충 상승작용에 대해 보고하였으며, Lluisma *et al.* (2001)은 Wu *et al.* (1997)이 보고한 형질전환체가 4년간 선택압이 없는 조건에서도 모기 유충에 대한 독성이 유지되며, 형질전환체의 살충효과 유지는 내독소 단백질 유전자가 형질전환체의

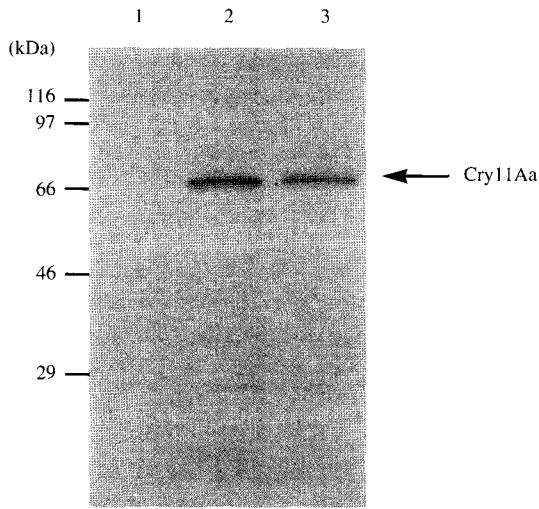


Fig. 2. Western blot of the transformant Tr2C expressing Cry11Aa protein using anti-Cry11Aa antiserum. Lane 1: *Synechocystis* PCC6803 as a negative control; lane 2: transformant Tr2C; lane 3: crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14. The arrow indicates the Cry11Aa protein.

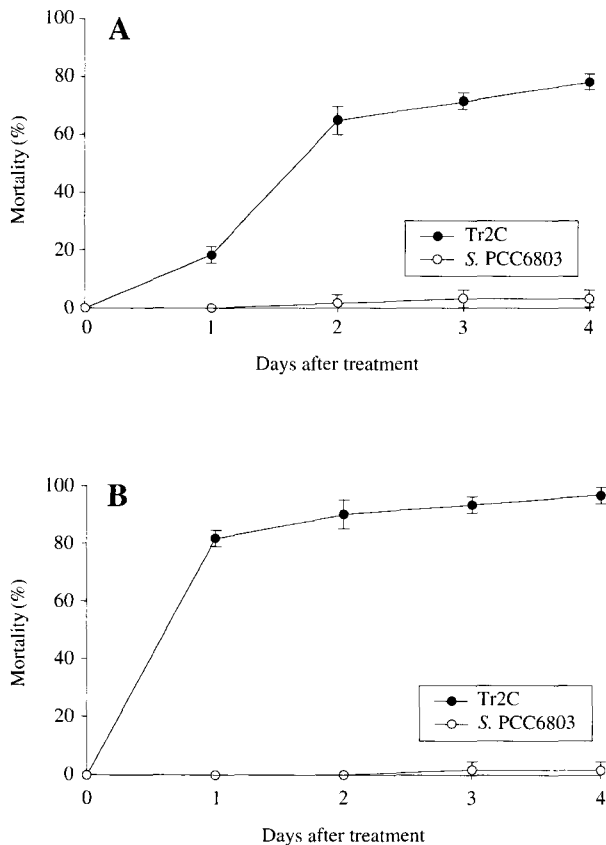


Fig. 3. The larvicidal activity of *Synechocystis* PCC6803 and the transformant Tr2C to *Culex tritaeniorhynchus* (A) and *Anopheles sinensis* (B). Data are the mean \pm SD of triplicate assays from two independent experiments. Each measurement was done with 20 larvae.

genomic DNA에 존재함으로써 가능하다고 보고하였다. 이 결과는 모기 유충에 독성을 보이는 *cry11Aa* 유전자가 형질전환체의 genomic DNA에 존재함으로써, 제작된 형질전환체가 안정적인 내독소 단백질을 발현할 수 있음을 보여준다(Fig. 1B).

형질전환체 Tr2C에서 *cry11Aa* 유전자가 발현되는 것을 조사하기 위하여, 쥐에서 생산한 Cry11Aa 단백질의 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다. 양성대조구로 *Bt* subsp. *morrisoni* PG14의 내독소 단백질을, 음성대조구로 자연형 *S. PCC6803*의 단백질을 사용하였다. 약 72-kDa 크기의 Cry11Aa 단백질이 *Bt* subsp. *morrisoni* PG-14와 형질전환체 Tr2C에서 탐지되었으나, 자연형 *S. PCC6803*에서는 어떤 단백질도 탐지되지 않았다(Fig. 2).

형질전환체 Tr2C의 모기유충에 대한 살충효과를 검증하기 위해, 작은빨간집모기와 중국얼룩날개모기 유충을 이용하였다. 음성대조구로 자연형 *S. PCC6803*을 사용하였다. 작은빨간집모기 3령 유충에 대한 살충성은 형질전환체 처리 후 1-2일 사이에 가장 높게 증가하였으나, 자연형 *S. PCC6803*은 조사기간 동안 살충성을 보이지 않았다(Fig. 3A). 중국얼룩날개모기 3령 유충의 경우에서도 형질전환체는 접종 후 1일 이내에 높은 살충력을 보였으나, 자연형은 조사기간 동안 유의성 있는 살충력을 보이지 않았다(Fig. 3B). Tr2C의 모기유충에 대한 살충효과 발현시간을 알아보기 위하여, 시간 경과에 따른 살충력을 반수치사시간(LT₅₀)으로 분석하였다(Table 1). 형질전환체 Tr2C는 작은빨간집모기 유충에 비해서 중국얼룩날개모기 유충에 더 빠른 살충효과를 보였으며, 자연형 *S. PCC6803*의 경우, 살충력을 보이지 않아 값을 추정할 수 없었다. 모기 유충 간의 살충효과 차이는 모기 유충의 이동, 호흡, 형질전환체의 깊이 에 따른 분포에 의한 차이인 것으로 생각된다. 형질전환된 cyanobacteria를 이용한 시도는 *B. sphaericus* 1593M 균주의 살충성 유전자를 *Anacystis nidulans* R2에서 처음 시도되었으며,

Table 1. Median lethal time(day) of third instar larvae of *Culex tritaeniorhynchus* and *Anopheles sinensis*

Strain	Median lethal time (LT ₅₀) ¹	
	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	<i>An. sinensis</i>
Transformant	2.07 \pm 0.30	0.73 \pm 0.24
<i>Synechocystis</i> PCC6803	ND ²	ND ²

¹Data are the mean \pm SD of triplicate assays.

²ND = Not determined.

형질전환체의 독성은 *Escherichia coli*에서 발현시켰을 때와 비슷한 살충효과를 보고하였다(Tandeau de Marsac *et al.*, 1987). Angsuthanasombat and Panyim (1989)은 cyanobacteria의 phycocyanin (P_{cpcB}) promoter를 이용하여, *cry4Ba* 유전자를 *Agmenellum quadruplicatum* PR-6에서 발현시켰으며, *Aedes aegypti* 유충에 대한 형질전환체의 살충력은 45%로 낮았다. Murphy and Stevens (1992)는 Angsuthanasombat and Panyim (1989)의 연구에서 이용된 P_{cpcB} promoter로 phycocyanin β -subunit의 N-말단 부분과 결합된 *cry11Aa* 유전자를 발현하는 형질전환체를 제작하였다. 이 형질전환체는 *Culex pipiens* 유충에 대해 접종 후 60시간동안 살충력을 보이지 않았으나, 접종 후 72 시간부터 살충력을 보였으며, 가장 높은 살충효과는 접종 후 5일에 83%였다. 형질전환체의 반수치사시간은 약 96시간으로, 살충효과는 Tr2C와 비교했을 때보다 매우 느리게 나타났다. Soltes-Lak *et al.* (1993)은 ferredoxin (*petF1*) promoter, tandem promoter (*lacZ*-endogenous *Bacillus* promoter), endogenous *Bacillus* promoter를 이용하여 *Cry4Ba* 단백질을 발현하는 형질전환체를 각각 제작하였다. 이들 형질전환체들 중에서 *Cx. restuans* 유충에 대해 *petF1* promoter를 이용한 형질전환체가 가장 높은 살충력을 보였으며, 살충력의 증가는 Tr2C와 비슷하게 1-2일 사이에 가장 높게 나타났다. Wu *et al.* (1997)은 tandem promoter (cyanobacteria의 P_{psbA} 와 *E. coli*의 T7)를 이용하여 *cry4Aa*와 *cry11Aa* 유전자를 동시에 *A. PCC7120*에서 발현시켰다. tandem promoter를 이용하여 발현된 *Cry11Aa*와 *Cry4Aa* 단백질은 Bt에서 보고된 것처럼 *Ae. aegypti* 유충에 대해 살충상승효과를 보였으며, 반수치사농도 (LD_{50})는 약 10^5 cells/ml이었으며, 가장 높은 치사율을 보인 농도는 5×10^5 cells/ml이었다. Soltes-Lak *et al.* (1993)의 결과와는 다르게 P_{psbA} promoter를 이용해 *Cry11Aa* 단백질만을 발현하는 형질전환체는 tandem promoter (P_{psbA} -T7)를 이용한 형질전환체보다 반수치사농도(약 5×10^6 cells/ml) 높았다. 형질전환체 Tr2C의 반수치사농도는 작은빨간집모기 유충에 대해 7×10^5 cells/ml로, 두 내독소 단백질을 동시에 발현시켜 살충상승효과를 보여준 형질전환체(Wu *et al.*, 1997)에 비해 상대적으로 높았다. 그러나 단일 promoter를 이용한 형질전환체들의 모기 유충에 대한 살충력을 비교하면, Tandeau de Marsac *et al.* (1987)과 Murphy and Stevens (1992)가 보고한 형질전환체의 살충력보다 높

았으며, Tr2C의 살충력 발현시간은 접종 후 3일부터 빨간집모기 유충에 독성효과가 나타났다는 결과(Murphy and Stevens, 1992)에 비해 살충효과가 매우 빠르게 나타났다. 이상의 결과들은 Tr2C에서 *A. hybridus*의 *psbA* promoter가 cyanobacteria에서 *cry11Aa* 유전자를 안정적으로 발현시키며, 발현된 *Cry11Aa* 단백질은 모기 유충에 높은 살충력을 가진다는 것을 보여 준다.

형질전환체 Tr2C는 소규모의 야외 포장실험에서 살충효과 조사기간동안(6주) 모기유충의 개체 증가를 억제하는 것으로 조사되어, 야외 환경에서도 살충효과가 안정적임을 확인하였다(미제시 자료). 이것은 형질전환체 Tr2C는 야외조건에서 자외선에 대해서 영향을 받지 않고, 환경에 적응하고 증식하여, 모기 유충이 형질전환체를 먹이로 이용함으로써, 발현된 *Cry11Aa* 단백질이 모기 유충의 수적 증가를 지속적으로 억제하는 것으로 생각된다. Manasherob *et al.* (2002)은 자외선 조사(照射)에 의한 형질전환된 *A. PCC7120*과 Bt subsp. *israelensis*의 살충력 변화실험에서, Bt subsp. *israelensis*는 자외선의 강도에 따라서 살충력이 떨어지는 반면, 형질전환체는 살충력에 변화가 없음을 보고하였다. 한편 Lluisma *et al.* (2001)은 *A. PCC7120*에서 형질전환된 내독소 단백질 유전자들의 안정성을 보고하고, 모기 유충방제를 위한 대량증식의 방법을 제시함으로써, 모기유충방제에서 cyanobacteria의 증가된 활용가능성을 시사하였다.

이상의 결과들을 종합하면, *cry11Aa* 유전자를 발현하는 형질전환체 Tr2C가 작은빨간집모기와 중국얼룩날개모기 유충에 대하여 높은 독성, 야외살충력 검정에서 높은 살충효력과 지속적인 살충효과를 보임으로써, Bt 내독소 단백질의 모기 유충방제에서 제기된 단점들을 극복하고, 생물학적인 방제수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Literature Cited

- Angsuthanasombat, C. and S. Panyim. 1989. Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2428-2430.
- Aronson, A.J., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50: 1-24.
- Cohen, E., H. Rozen, T. Joseph, S. Braun and L. Margulies. 1991. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* from ultraviolet irradiation. J. Invertebr. Pathol. 57: 343-351.
- Cote, R.J. and R.L. Gherna. 1994. Nutrition and media. pp.155~

178. In *Methods for general and molecular bacteriology*, eds. by P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg. 791pp. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Crickmore, N., S. Poncet, A. Klier and D.J. Ellar. 1995. Contribution of the individual components of δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131: 249-254.
- Delecluse, A., J.F. Charles, A. Klier and G. Rapoport. 1991. Deletion by *in vivo* recombination shows that 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.* 173: 3374-3381.
- Dzelzkans, V.A. and L. Bogorad. 1986. Stable transformation of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 induced by UV irradiation. *J. Bacteriol.* 165: 964-971.
- Ehling-Schulz, M., W. Bilger and S. Scherer. 1997. UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* 179: 1940-1945.
- 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.
- Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Khasdan, V., E. Ben-Dov, R. Manasherob, S. Boussiba and A. Zaritsky. 2001. Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Environ. Microbiol.* 3: 798-806.
- Kim, H.S., D.W. Lee, S.D. Woo, Y.M. Yu and S.K. Kang. 1998. Distribution, serological identification and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. *Curr. Microbiol.* 37: 195-200.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lluisma, A.O., N. Karmacharya, A. Zarka, E. Ben-Dov, A. Zaritsky and S. Boussiba. 2001. Suitability of *Anabaena* PCC7120 expressing mosquitocidal toxin genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 161-166.
- Magalith, Y. and E. Ben-Dov. 2000. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. pp. 243-301. In *Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection*, eds. by J.E. Rechcigl and N.A. Rechcigl. 408pp. Lweis Publisher, Boca Raton, FL.
- Manasherob, R., E. Ben-Dov, X. Wu, S. Boussiba and A. Zaritsky. 2002. Protection from UV-B damage of mosquito larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* expressed in *Anabaena* PCC7120. *Curr. Microbiol.* 45: 217-220.
- Murphy, R.C. and 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.
- Pfannenstiel, M.A., G.A. Gouche, E.J. Ross and K.W. Nickerson. 1986. Immunological relationship among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystalline toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 644-649.
- Poncet, S., A. Delecluse, A. Klier and G. Rapoport. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the *CryIVA*, *CryIVB* and *CryIVD* toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 140-143.
- Porter, R.D. 1988. DNA transformation. *Methods Enzymol.* 167: 703-712.
- Raymond, K.C., H. Waboko, R.M. Faust and L.A. Bulla, Jr. 1990. Transfer of the *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin gene into mosquito larval food sources. pp. 94-109. In *Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus*, eds. by H. de Barjac and D. Sutherland. 336pp. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ.
- 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 PCC7942. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2404-2410.
- Tandeau de Marsac, N., F. de la Torre and J. Szulmaster. 1987. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 159M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 209: 396-398.
- Thomas, W.E. and D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* 60: 181-197.
- Towbin, H.R., R. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Waalwijk, C., A.M. Dullemans, M.E.S. Van Workman and B. Visser. 1985. Molecular cloning and the nucleotide sequence of the M 28000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucleic Acids Res.* 13: 8207-8217.
- Wirth, M.C., G.P. Georgioui and B.A. Federici. 1997. *Cyt1A* enables *CryIV* endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of *CryIV* resistance in mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10536-10540.
- Wu, X.Q., S.J. Vennison, L. Huirong, E. Ben-Dov, A. Zaritsky and S. Boussiba. 1997. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4971-4974.

(Received for publication 5 January 2004;
accepted 13 February 2004)