

세포성 인지질분해효소 활성 억제에 따른 비티 살충력 증가 효과

엄성현 · 박지영 · 김건우 · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

Effect of Cellular Phospholipase A₂ Inhibition on Enhancement of Bt Insecticidal Activity

Seonghyeon Eom, Jiyeong Park, Kunwoo Kim and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

ABSTRACT: Some bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) inhibit phospholipase A₂ (PLA₂) activity to shutdown eicosanoid biosynthesis in target insects. However, little has been known about the target insect PLA₂ of these bacterial metabolites. Eight bacterial metabolites identified in Xn culture broth exhibited significant insecticidal activities against larvae of both lepidopteran species of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua*. Moreover, these bacterial metabolites significantly enhanced insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* (Bt). To determine target PLA₂, we cloned and over-expressed cellular PLA₂ (SecPLA₂) of *S. exigua*. Purified SecPLA₂ catalyzed phospholipids derived from the fat body and released several polyunsaturated fatty acids. Most Xn metabolites significantly inhibited SecPLA₂ activity, but were different in their inhibitory activities. There was a positive correlation between the inhibition of SecPLA₂ and the enhancement of Bt insecticidal activity. These results indicate that SecPLA₂ is a molecular target inhibited by Xn metabolite.

Key words: cPLA₂, Eicosanoid, *Xenorhabdus nematophila*, *Bacillus thuringiensis*, Immunosuppression

초 록: 곤충병원성세균 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)의 일부 대사물질은 대상 곤충의 phospholipase A₂ (PLA₂)를 억제하여 아이코사노이드 생합성 활성을 저해시킨다. 그러나 이들 세균 대사물질이 억제하는 곤충의 PLA₂에 대해서는 알려져 있지 않다. Xn의 배양액에서 화학구조가 동정된 8 가지 대사물질들은 두 종의 나비목 배추좀나방(*Plutella xylostella*)과 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 유충에 대하여 살충 활성을 보였다. 특별히 이들 물질은 모두 *Bacillus thuringiensis* (비티)의 살충력을 크게 향상시켰다. 파밤나방의 세포성 인지질 분해효소(SecPLA₂)를 클로닝하고 대장균에서 과발현시켰다. 분리된 SecPLA₂를 지방체에서 얻은 인지질과 반응시켰을 때 여러 다가불포화지방산을 해리시켰다. 이 효소활성이 Xn 유래 대사물질들에 의해 뚜렷이 억제되었다. 또한 SecPLA₂에 대한 억제효과와 비티 살충력 상승효과 사이에 정의 상관관계를 보였다. 본 연구는 SecPLA₂가 Xn 대사물질의 억제 대상 분자 종말점 가운데 하나라고 제시하고 있다.

검색어: 인지질분해효소, 아이코사노이드, 곤충병원성세균, 비티, 면역억제

비티(*Bacillus thuringiensis*)는 토양 중에 발견되는 그람양성균으로 살충성 결정체 독소단백질(Crystal toxin protein: Cry)을 생성하는 자연계 주요 해충방제인자이다(Roh et al., 2007). Cry 단백질은 세균이 갖는 플라스미드에 암호되어 있고, 이들의 종류에 따라 비티의 살충 스펙트럼이 결정된다(Bravo et al.,

2012). 약 700 종류의 Cry 단백질 유전자가 밝혀졌고(Crickmore et al., 2014), 이들의 추정 아미노산 서열을 기반으로 40% 유사도 기준점을 설정하고 약 70 종류의 서로 다른 Cry 부류(Cry1, Cry2.... Cry70)로 나뉘고, 다시 70% 유사도 기준으로 세부류(Cry1A, Cry1B 등)로 나뉘고, 다시 70-95%의 유사도 기준에 따라 세세부류(Cry1Aa, Cry1Ab 등)로 분류하였다(Crickmore et al., 1998). Cry 독소단백질은 크게 두 양상으로 약 130 kDa 크기의 대형 Cry 단백질과 65-70 kDa 크기의 소형 Cry 단백질이 존재하며, 이들 모두는 곤충 중장의 단백질 분해효소에 의해

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received May 12 2014; Revised August 7 2014

Accepted August 18 2014

N 말단(소형의 경우) 또는 N과 C 말단(대형의 경우) 부위 모두에서 가수분해 반응으로 약 60 kDa 크기의 생리활성을 지닌 활성 독소단백질로 가공된다(de Máagd et al., 2001).

활성 독소단백질로 가공된 비티 Cry 독소단백질의 살충기작은 중장막의 수용체와 결합으로부터 시작된다. Cry1Ab의 경우 캐드헤린과 같이 높은 결합력(Kd = 1 nM)을 갖는 세포막 단백질에 결합되는데, 이때 이 Cry는 domain I의 첫 번째 α 2차구조 영역이 제거되면서 Cry 올리고 형성을 야기시키게 한다. 이후 이들 올리고 독소단백질 복합체는 결합력(Kd)이 약 0.6 nM 정도의 alkaline phosphatase 또는 aminopeptidase N에 결합하면서 중장막에 구멍을 뚫게 되고 이에 따라 세포 안팎의 삼투압 충격에 의해 중장세포의 치사를 유발시키게 된다(Bravo et al., 2011). 또 다른 살충과정으로 캐드헤린에 결합된 Cry 독소단백질은 이 수용체를 통한 세포내 신호전달과정으로 세포치사를 일으키게 할 수 있다(Zhang et al., 2006). 중장세포치사에 따라 비티 세균이 혈강으로 침입하여 패혈증을 유발하여 궁극적으로 곤충을 치사하게 할 수 있으나 독소단백질만으로도 곤충을 치사시킬 수 있다는 증거는 비티가 패혈증의 원인이라고만 단정할 수 없다(Bravo et al., 2005). 이 보다는 중장에 서식하는 여러 다양한 미생물들이 비티 독소단백질에 의해 와해된 중장 세포벽을 뚫고 혈강으로 침입하여 패혈증을 일으켰을 것으로 해석된다(Broderick et al., 2006). 이때 곤충 혈림프의 면역 작용은 이들 미생물 침입의 방어 기능을 담당할 수 있다(Grizanova et al., 2014). 따라서 이 대상 곤충의 면역 작용 억제제는 비티의 살충력을 증가시킬 수 있는 지렛대 역할을 담당할 수 있다(Rahman et al., 2004; Kwon and Kim, 2007; Broderick et al., 2010).

곤충면역을 억제시키는 미생물 및 화합물이 보고되고 있다. 이 가운데 곤충병원선충에서 유래된 *Xenorhabdus nematophila* (Xn) 세균이 포함된다(Park and Kim, 2000). Xn 세균은 그람 음성균으로 선충의 장내에 서식하고 있으며, 기주 선충이 대상 곤충의 혈강으로 침입할 때, 선충 장속에서 곤충의 혈강으로 빠져 나와 다양한 곤충병원기작을 발휘하게 된다(Akhurst, 1980; Kaya and Gaugler, 1993). 특별히 Xn은 감염 초기에 대상 곤충의 세포성 및 체액성 면역을 모두 억제하게 된다(Park and Kim, 2003; Hwang et al., 2013). 이러한 Xn의 곤충 면역억제 기작은 주로 곤충의 면역 증개물질인 아이코사노이드 생합성을 억제하면서 나타나게 된다(Kim et al., 2005).

아이코사노이드는 탄소수 20 개의 다가불포화지방산의 산화물들이다. 이들 물질은 주로 인지질을 기질로 인지질분해효소의 일종인 phospholipase A₂ (PLA₂)의 촉매작용으로 유리된 아라키도닉산(5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)이 cyclooxygenase 또는 lipoxigenase의 촉매작용으로 형성되는 프로스타글란딘

류 및 류코트리엔류의 형태로 곤충에서 존재한다(Stanley and Kim, 2014). 따라서 PLA₂는 아이코사노이드 생합성 과정의 첫 번째 반응을 촉매하는 효소로서 Xn의 억제 대상이 된다(Shrestha and Kim, 2009). Xn의 세균배양액에 PLA₂ 억제 물질이 포함되었으며, 이 물질은 유기용매로 추출되었다(Park et al., 2004a,b). 일련의 분획구 분리 방법을 이용하여 이 세균 배양액에 존재하는 PLA₂ 억제 물질을 분리하여 총 8개 화합물의 물질 구조를 동정하였다(Seo et al., 2012).

인지질분해효소의 일종인 PLA₂ (EC 3.1.1.4)는 에스테르 가수분해효소로서 인지질의 sn-2 위치에 작용하여 지방산을 유리시키며, 바이러스, 세균, 식물 및 동물에 이르기까지 모든 생명체에 존재한다(Burke and Dennis, 2009). 이러한 다양한 PLA₂는 적어도 15 개의 그룹으로 분류되나 일반적으로 세포성 및 칼슘 의존형 cPLA₂ (cellular PLA₂), 세포성 및 칼슘 독립적 iPLA₂ (calcium-independent PLA₂) 및 분비성 sPLA₂ (secretory PLA₂)로 나눌 수 있다(Schaloske and Dennis, 2006). 이들은 분자 크기 및 이황화결합수에 있어서 차이를 보이며 생리적 기능 차이를 나타내고 있는데, 특별히 cPLA₂가 포유동물의 면역 반응에 일종인 염증반응과 밀접하게 관련을 보이고 있다(Uozumi et al., 1997). 곤충에서는 꿀벌 등의 독샘물질의 성분으로서 sPLA₂를 제외하고 면역작용에 관련된 것으로는 거짓쌀도둑거저리 (*Tribolium castaneum*)에서 4 종의 sPLA₂를 최초로 보고하였다(Shrestha et al., 2010). 그러나 면역 작용에 연관된 cPLA₂에 대한 정보는 곤충에서 알려진 바 없다.

본 연구는 비티 살충제의 살충력 증가시키기 위해 Xn 유래 면역억제물질을 혼합하는 것을 전략으로 세웠다. Xn 물질의 면역 억제를 위해 최근 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에서 클로닝된 cPLA₂ 유전자를 발현시켜 얻은 재조합단백질을 이용하여 Xn 유래 물질들의 cPLA₂ 억제 효과를 분석하였다. 궁극적으로 이 cPLA₂ 억제효과와 비티 살충력 증가의 상관관계를 분석하는 데 목적을 두고 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

곤충 사육

파밤나방 유충을 1994년 과 재배지에서 채집하였고 실내에서 인공사료(Goh et al., 1990)로 누대 사육하였다. 사육 배양기의 조건은 온도 25±1°C, 광주기 16:8 h (L:D)이며 성충은 10% 설탕물을 먹이로 공급하였다. 배추좀나방은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 유충을 채집하여 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 약제 노출 실험에 사용하였다. 유충은

온도 25±1°C, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%의 배양기에서 사육했다. 유충은 배추를 먹이로 사육하였으며 성충은 10% 설탕물을 먹이로 하였다. 본 연구의 생물검정에 사용된 발육시키는 파밤나방과 배추좀나방 모두 3령충을 이용하였다.

비티 균주 배양

비티 균주는 (주)고려바이오(Hwasung, Korea)로부터 지원 받았으며 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* serotype b (BtK) 그리고 *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* NT423 (BtA)을 사용하였다. 두 종류의 비티 균주를 멸균수 1 mL와 혼합하여 현탁액을 만든 후 루프를 이용하여 tryptic soy broth (TSB) 평판 배지에 세균을 도말하고 30°C에서 24 시간 배양하였다. 평판배지에서 배양된 세균에서 단일 콜로니를 얻고 이를 멸균수로 희석하여 TSB 액체배지를 이용하여 28°C에서 48 시간 동안 200 rpm의 교반으로 배양한 후, 다시 48 시간 동안 4°C 저온고에 보관하여 세균의 포자 형성율을 증가시켰다. 포자 형성은 위상차 광학현미경(BX-PHD, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 1,000 배 배율에서 확인하였다.

대사 화합물의 조제

Xn 유래 물질인 benzylideneacetone (BZA, (E)-4-phenylbut-3-en-2-one, Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea), proline-tyrosine (PY, 3-(4-hydroxybenzyl)-hexahydropyrrolo[1,2- α]pyrazine-1,4-dione, Pepton, Daejeon, Korea), acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV, 2-(2-(2-benzyl-3-oxobutanamido)acetamido)-3-methyl butanoic acid, Pepton), *p*-hydroxyphenyl propionic acid (PHPP, Sigma-Aldrich Korea), 4-hydroxyphenylacetic acid (HPA, Sigma-Aldrich Korea) 그리고 cyclic PY (cPY, 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(pyrrolidine-2-carboxamido)propanoic acid)는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Korea)를 이용하여 1,000 ppm의 농도로 조제되었으며 indole (2,3-benzopyrrole, Sigma-Aldrich Korea)과 oxindole (2,3-dihydro-1H-indol-2-one, Sigma-Aldrich Korea)은 증류수를 이용하여 1,000 ppm의 농도로 조제하였다.

PLA₂ 활성과 Xn 대사물질의 관계

PLA₂ 효소활성의 측정은 형광물질 pyrene이 부착된 인지질 [1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycerol-3-phosphatidyl choline] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 기질

로 사용하여 형광분석법으로 측정하였다(Radvanyi et al., 1989). 기질은 99.5% 에탄올을 이용하여 10 mM로 조제하였다. Bovine serum albumin (BSA)은 인산완충용액을 이용하여 10%로 조제하였다. Tris 완충용액(pH 7.0)은 증류수를 이용하여 50 mM로 조제하였다. 염화칼슘은 증류수로 1 M을 조제하였다. Xn 대사물질은 상기의 제조 방법을 따라 1 M의 농도로 조제하였다. 반응용액(150 μ l)은 50 mM의 Tris 완충용액 143.5 μ l, 1 M의 CaCl₂ 1 μ l, 10%의 BSA 1.5 μ l, 1 μ l의 억제자 및 2 μ l의 효소 용액으로 구성되었다. 서로 다른 농도의 억제자를 cPLA₂ 효소 용액에 첨가한 후 5 분간 25°C에서 반응시켰다. 이후 147 μ l 기질 용액을 첨가하고 2 분간 반응시켰다. SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 excitation 345 nm와 emission 398 nm 조건에서 효소 반응을 측정하였다.

대사물질의 단독물질 생물검정

생물검정은 잎침지법으로 실시하였다. 8가지 대사물질을 0에서부터 100 ppm 까지 농도 별로 제조한 후에 1 분간 침지시킨 배추 잎(3 × 3 cm)을 여과지가 깔린 용기에 놓아 10 분간 건조시켰다. 이때 1 시간 동안 절식시킨 배추좀나방 3령충과 파밤나방 3령충을 처리 구당 10 마리씩 3 반복으로 처리하였다. 생존수 확인은 24 시간 주기로 7 일 동안 매일 하루 중 같은 시간에 조사하였다. 살충력은 7일차 생존율을 기반으로 산출하였다.

비티와 대사물질의 협력효과 생물검정

비티는 28°C에서 48 시간 동안 배양된 것을 사용하였으며, 비티의 내세포자 숫자는 BtK는 3.6 × 10⁸/mL, BtA는 2.3 × 10⁸/mL를 기록하였다. 비티에 8 가지 대사물질을 각각 혼합하였을 때 각 대사물질의 최종 농도가 0~100 ppm이 되도록 희석한 후 배추좀나방 3령충과 파밤나방 3령충에 처리하였다. 각 처리는 3 반복하였으며, 각 반복은 10 마리의 공시충으로 구성되었다. 생존수 확인은 24 시간 주기로 7 일 동안 매일 하루 중 같은 시간에 조사하였다. 살충력은 7 일차 생존율을 기반으로 산출하였다.

SecPLA₂ 클로닝 및 분리과정

해당 유전자의 발현을 위해서 파밤나방 혈구시료의 cDNA를 Hwang et al. (2013)의 방법으로 준비하였다. 이 혈구 cDNA를 대상으로 파밤나방 cPLA (SecPLA₂: GenBank accession number: KJ99582)의 open reading frame (ORF) 영역을 정방향(5'-

ATGATGCAACATCAGTACTG-3') 및 역방향(5-GGCTGC ATGGCTTTGGTTGG-3') 프라이머들을 이용하여 94°C에서 45 초, 52°C에서 45 초, 72°C에서 90 초 조건에서 40 회 증폭하였다. 이 증폭물을 6x 히스티딘과 V5 tag가 있는 pBAD-TOPO 발현벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 재조합하였고, 이를 *E. coli* Top 10 균주에 발현시켰다. 형질전환된 대장균을 37°C에서 배양하여 세균 밀도를 600 nm 흡수도 기반으로 0.8-0.9 사이가 될 때 까지 증식시킨 후 L-arabinose (Sigma-Aldrich Korea)를 0.02%가 되도록 추가하였다. 이후 30°C에서 4 시간 동안 과발현시켰다. 수거된 세균은 double detergent buffer (50 mM Tris, pH 7.0, 30 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.02% Na₃N, 0.01% Igepal, 0.005% PMSF, 0.05% protein inhibitor cocktail)로 현탁액을 만든 후 초음파분쇄기(Bandelin Sonopuls, Berlin, Germany)에서 95%의 강도, 30 초 단위로 15 번을 시행하였으며 이후 10,000 rpm의 속도로 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 Ni-NTA 컬럼(Qiagen Korea, Seoul, Korea)을 이용하여 SecPLA₂ 농축 분획구를 얻었고, 이를 다시 Sephadex® G-100 (Sigma-Aldrich Korea)을 이용한 크로마토그래피 분리를 통해 SecPLA₂를 정제하였다. SecPLA₂ 단백질의 전기영동은 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였으며 V5 항체(Life Technologies Korea, Seoul, Korea)를 사용하여 Western blotting을 통해 확인하였다.

지방체 유래 인지질 분리

파밤나방 5령 유충의 지방체 시료량 대비 20 배의 *n*-hexane을 가하여 20 분간 초음파 처리(Branson, USA)하면서 2 회 추출하였다. Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 잔사에 대해 Folch et al. (1957)의 방법에 준하여 동량의 클로로포름 : 메탄올 (2:1, v/v)로 2 회 추출하였다. 중성지질, 당지질 및 인지질의 분리를 위해 클로로포름 : 메탄올 추출물에 대한 실리카겔 컬럼 (5.5×40 mm) 크로마토그래피를 실시하였으며(Christie, 2003), 활성화시킨 실리카겔(70~230 mesh, Merck)을 충전한 후 용매 극성에 따라 클로로포름, 아세톤, 메탄올을 순차적으로 용출하여 각각 중성지질, 당지질 및 인지질을 차례로 분획하였다. 추출액 및 각각의 분획물은 40°C 이하에서 감압농축하였고 질소로 건조시킨 후 지방산 분석 및 효소처리까지 -20°C에 보관하였다.

인지질 추출물에 대한 SecPLA₂ 촉매 반응 분석

인지질 분획구를 100% 에탄올로 용해시켰다. 이후 100 µl의

인지질, 100 µl의 10% BSA, 60 µl의 1 M CaCl₂, 100 µl의 PLA₂, 9,640 µl의 Tris-HCl buffer (pH 7.0)를 섞고 28°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 이후 유리 지방산을 아래의 방법으로 분석하였다.

유리 지방산 분석

헥산 추출 및 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 획득된 지질을 Metcalfe and Schmitz (1961)의 방법에 준하여 지방산을 methylation 시켰다. 이 시료(0.5 - 1.8 mg)를 capped test tube에 취하여 0.5 N NaOH 메탄올 1.5 mL를 넣고 N₂로 충전한 후 100°C에서 5 분간 중탕하여 비누화반응을 실시하였다. 이후 분리된 지방산에 메틸기를 첨가하기 위해 14% BF₃-메탄올 용액 2 mL를 넣고 질소를 충전하여 100°C에서 30 분간 메틸화시킨 다음, isooctane 1 mL와 포화 NaCl 용액 5 mL를 가하고 2 회 추출하였다. Isooctane 층을 취하여 무수 Na₂SO₄으로 탈수하고 여과(PTFE 0.2 µm Hydrophilic, Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan) 후에 GC/MS (HP 6890 GC system/ HP 5973 Mass selective detector, Hewlett Packard, San Diego, USA) 분석시료로 이용하였다. 효소처리 시료의 경우, *n*-hexane 추출하여 비누화반응 없이 상기와 동일한 방법으로 메틸화하였다. GC/MS 분석을 위한 컬럼은 SP-2560 (100 m × 0.25 mm i.d., 0.2 µm film thickness, Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA)을 장착하였으며, 컬럼 오븐 온도는 100°C에서 4 분 동안 유지한 후 240°C까지 분당 3°C씩 증가하여 15 분 동안 유지하였다. 이동상 가스는 헬륨으로 0.8 mL/min, injector 225°C, ion source 200°C, separator 240°C로 설정하였다. 각각의 시료는 1 µL를 주입하여 분석하였고, split ratio는 20:1의 비율이었다. 분리된 피크는 Supelco사 표준지방산 methyl ester의 머무름 시간과 비교하여 확인하였으며, 피크 면적비로서 지방산 조성 백분율을 구하였다. 또한 GC에 의해 분리된 피크의 mass spectrum을 GC/MS data system인 MS Chemstation (Hewlett Packard)에 설치된 NIST 및 Wiley library와의 검색 및 비교를 통해 지방산을 동정하였다.

통계처리

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다.

결과

Xn 유래 세균대사물질의 살충력

Xn 세균이 분비하는 8 종류의 대사물질의 살충력을 분석했다(Fig. 1). 이들 물질들의 용해도와 세포독성을 고려하여 100 ppm 이하의 농도에서 잎침지법으로 배추좀나방과 파밤나방 유충에 대해 독성을 조사하였다. 이때 모든 8 가지 물질은 두 곤충에 대해서 살충력을 나타냈다(배추좀나방: $F = 5.51$; $df = 7, 80$; $P < 0.0001$, 파밤나방: $F = 9.57$; $df = 7, 80$; $P < 0.0001$). 분석된 8 가지 물질 가운데 BZA와 oxindole이 두 곤충에 대해 40% 이상의 살충율을 나타냈다.

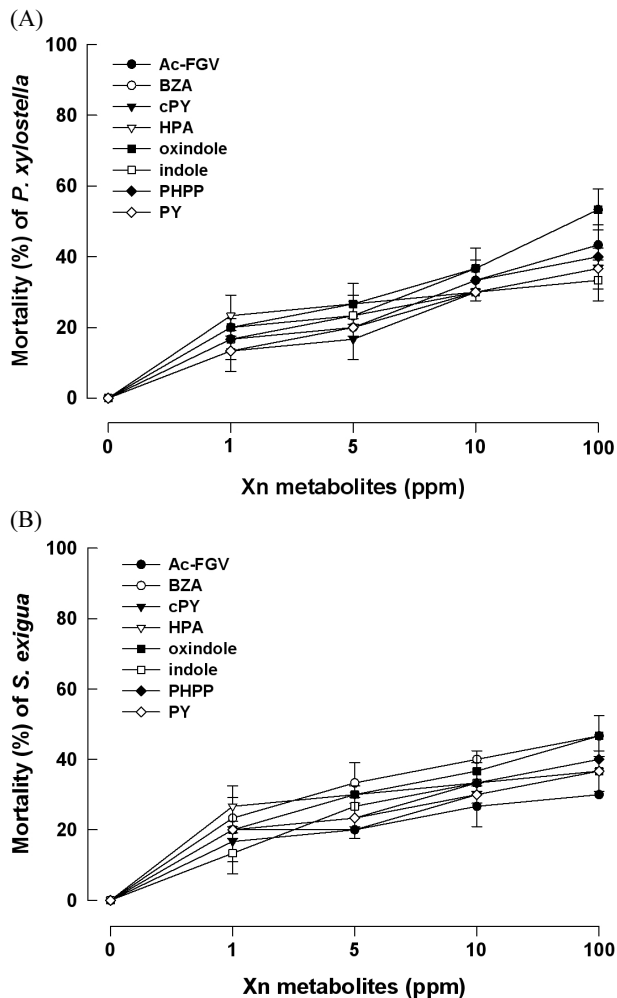


Fig. 1. Toxicities of eight different bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) against third instar larvae of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua*. Lead-dipping method was used to assess the toxicities. Each replication used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 7 days after treatment. Error bars indicate standard deviation.

Xn 유래 세균대사물질의 비티 살충력 상승효과

배추좀나방과 파밤나방에 대한 비티의 살충력은 60% 이상을 나타내지 않았다(Eom et al., 2014). 본 연구 결과도 비티 단독 처리는 약 50%의 살충효과를 나타냈다. 이렇게 낮은 비티 살충력을 높이기 위해 Xn 대사물질을 첨가하여 비티의 살충력 상승효과를 분석했다(Fig. 2). 첨가된 세균 대사물질의 농도가 증가함에 따라 비티 살충력을 높였다(배추좀나방: $F = 40.56$; $df = 3, 64$; $P < 0.0001$, 파밤나방: $F = 110.44$; $df = 3, 64$; $P < 0.0001$).

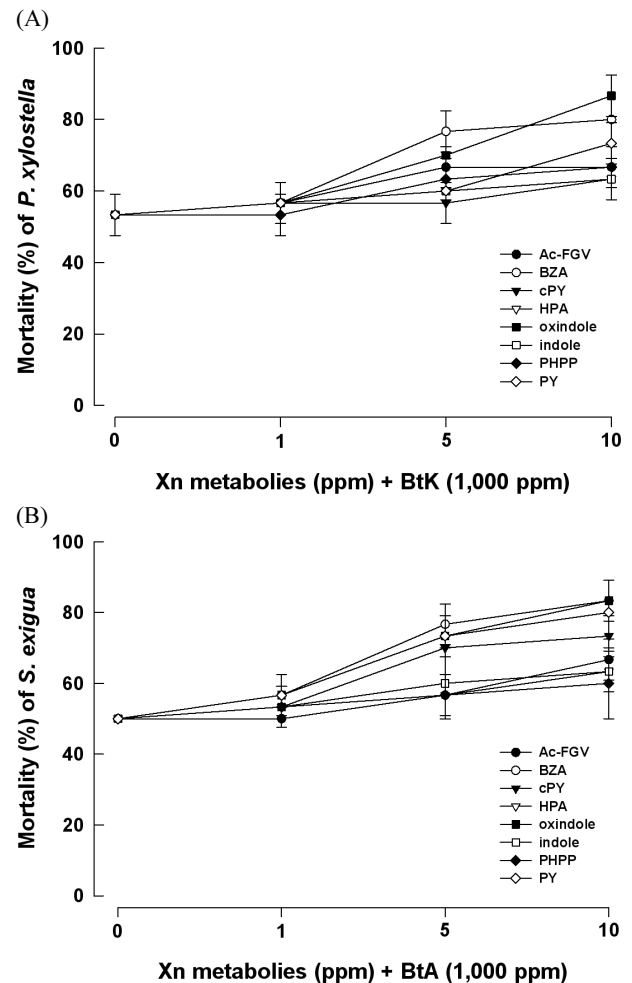


Fig. 2. Synergistic effect of eight different bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on 1,000 ppm treatment of *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BtK) or *aizawai* (BtA) against third instar larvae of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua*. Lead-dipping method was used to assess the toxicities. Each replication used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 7 days after treatment. Error bars indicate standard deviation.

재조합 SecPLA₂의 인지질 가수분해 활성

Xn 대사물질은 PLA₂ 활성억제 기능을 갖는다(Seo et al., 2012). 곤충면역작용에 영향을 주는 PLA₂ 가운데 세포내에 존

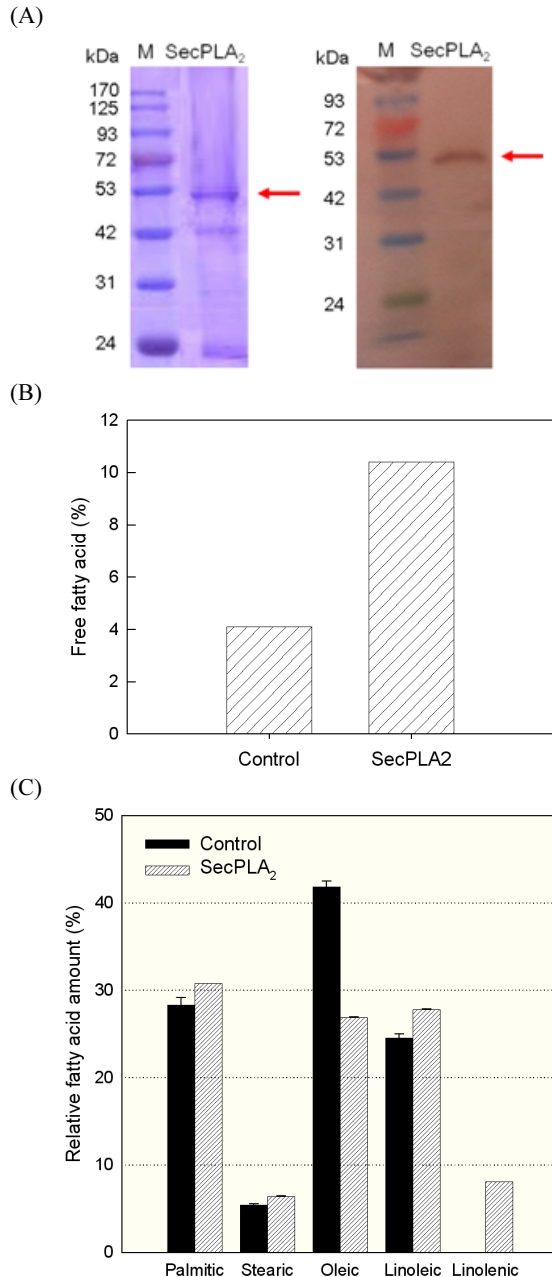


Fig. 3. Purification of SecPLA₂ expressed in hemocytes of *Spodoptera exigua*. (A) 10% SDS-PAGE (left panel) and Western analysis using anti-V5 (right panel). Arrows indicate SecPLA₂. (B) Total amount of free fatty acids released after SecPLA₂ treatment against phospholipid extracted from the fat body of *S. exigua* larvae. Control used a heat-treated SecPLA₂ for 40 min at 70°C. (C) Composition of free fatty acids released after SecPLA₂ treatment. Error bars indicate standard deviation of three measurements.

재하는 cPLA₂가 척추동물에서 보듯 면역 관련 아이코사노이드 생성에 중요한 역할을 담당할 것으로 추정된다(Stanley and Kim, 2014). 파밤나방에 존재하는 SecPLA₂ 유전자가 클로닝되었고, 이를 대장균에서 과발현시켜 재조합단백질을 얻었다(Fig. 3A). 예상 크기는 단백질 순수 크기(47,096.79 Da), 6x 히스티딘 tag 크기(1,421.64 Da) 그리고 V5 tag 크기(822.85 Da)를 포함하여 49,341.28 Da으로 그림에서 보듯 유사한 크기의 단백질이 분리되었다. 이 단백질을 지방제 인지질 추출물과 반응시킨 결과 무처리와 비해 약 2.5 배 많은 지방산을 유리시켰다(Fig. 3B). 이들 유리지방산의 조성을 살펴본 결과 대조구에 비해 다가불포화지방산(리놀레익산과 리놀레닉산) 조성이 높았다(Fig. 3C). 그러나 기대한 아라키도닉산은 검출되지 않았다. 추출된 동일한 인지질 시료를 NaOH에서 비누화반응을 시킨 결과 얻어진 유리지방산을 분석하였지만, 본 연구에서 진행한 GC/MS 시스템으로 아라키도닉산은 검출되지 않았다.

Xn 유래 세균대사물질의 SecPLA₂ 활성 억제 효과

SecPLA₂ 활성에 대한 8 가지 Xn 대사물질의 억제효과가 비교되었다(Fig. 4). 이들 물질을 모두 6.67 ppm으로 처리하였을 때 cPY와 HPA를 제외하고 나머지 6 가지 물질은 모두 SecPLA₂를 억제하였다(Fig. 4A). 이 가운데 BZA와 PY가 가장 높은 억제효과를 보였다. 이 두 물질과 oxindole을 포함한 세 물질에 대하여 농도별 SecPLA₂ 억제효과를 분석하였다(Fig. 4B). 처리 농도가 증가함에 따라 SecPLA₂ 활성 억제가 증가하였다(BZA: $F = 24.40$; $df = 5, 12$; $P < 0.0001$, PY: $F = 25.12$; $df = 5, 12$; $P < 0.0001$, oxindole: $F = 6.45$; $df = 5, 12$; $P = 0.0039$). 이들 세균대사물질들 사이에도 SecPLA₂ 억제 효과에서 차이를 나타냈다($F = 5.57$; $df = 2, 36$; $P = 0.0078$).

고찰

비티의 살충기작은 궁극적으로 대상 곤충의 패혈증을 일으켜 치사하는 전형적 세균병 증상을 갖는다. 본 연구는 이러한 패혈증을 억제하려는 대상곤충의 면역 반응을 억제함으로써 비티의 살충 효과를 증가시키려는 전략을 세웠고, 8종의 Xn 유래 면역억제물질은 비티의 살충효과를 증가시켰다. 비티에 대한 곤충의 방어기작은 중장 내강에 존재하는 단백질 분해효소의 변형(Oppert et al., 1994), 중장의 재생세포 활동 증가(Martinez-Ramrez et al., 1999), 중장세포막의 비티 수용체 변형(Gahan et al., 2001; Darboux et al., 2002; Park and Kim, 2013) 또한 중장내강에 존재하는 다른 미생물과의 경쟁

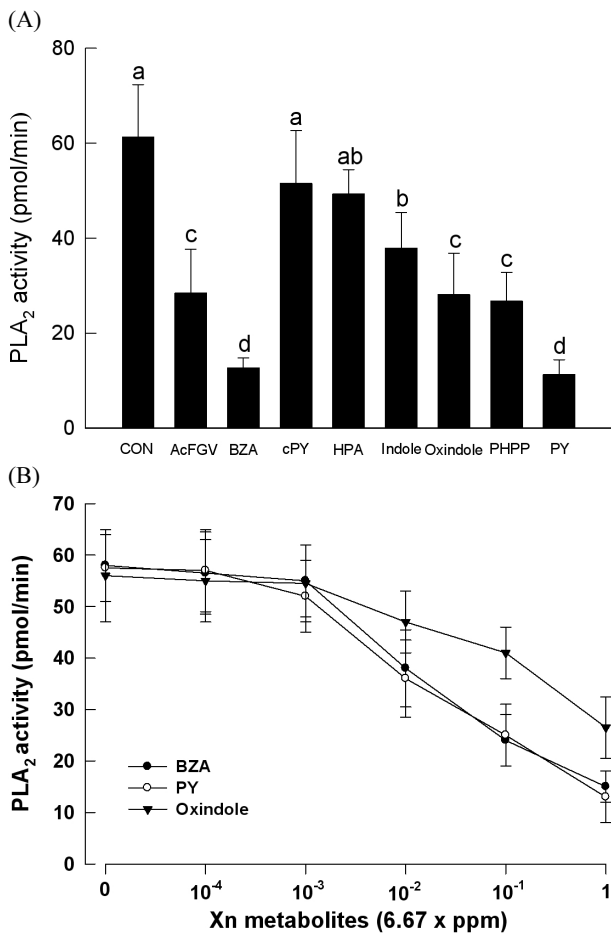


Fig. 4. Inhibitory effects of eight different bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) against purified SecPLA₂. (A) Comparative analysis of the eight metabolites in the inhibition at the same dose of 6.67 ppm. Each treatment was replication three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). 'CON' represents a solvent DMSO control used for dissolving the metabolites. (B) Dose-response of three selected metabolites in inhibition of SecPLA₂ catalytic activity. Error bars indicate standard deviation of three measurements.

(Garbutt et al., 2011)을 포함한다. 여기에 대상 곤충의 면역 활동이 포함되어 혈림프 멜라닌 반응 활성을 통해 위식막 또는 중장세포막에 멜라닌 반응증가(Rahman et al., 2004), 혈림프로부터 응고 관련 핵사머린 단백질의 중장내강 분비로 Cry 독소 단백질 불활성화(Ma et al., 2005), 세포성 면역반응 증가(Kwon and Kim, 2007; Dubovskiy et al., 2008; Richards and Dani, 2010; Shrestha et al., 2010) 등이 알려졌다. 최근 Grizanova et al. (2014)은 저농도로 비티에 감염되면, 페놀옥시테이즈 및 라이소자임 활성이 높아지는 체액성 면역 반응 증가를 보고하였다. 즉, 비티 감염은 세포성 및 체액성 면역 반응 모두 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 Xn 유래 물질이 아이코사노이드 생

합성 억제를 통해 세포성 및 체액성 면역 작용을 모두 억제함으로써 비티의 활성을 증가시켰다는 것을 의미한다. 즉, 비티의 살충작용에 있어서 대상 곤충이 적극적으로 자신의 면역반응을 통해 방어 작용을 발휘한다는 것을 본 연구는 제시하고 있다.

면역작용을 억제하여 비티의 살충효과를 증가시키려는 전략이 일련의 연구에서 진행되어 왔다. Jung and Kim (2006)은 Xn과 비티를 혼합 처리하여 파밤나방의 살충효과를 크게 높이고 살충효과도 빠르게 진행시키는 결과를 보였다. 여기서 살충효과는 비티에 의한 중장세포벽 붕괴와 관련이 있어 중장세포벽이 와해되는 처리 후 48 시간부터 혈강에서 유리되는 Xn 세균의 존재로부터 추정되었다. Xn은 아이코사노이드 생합성 억제 이외에 살충단백질을 발현하기에(French-Constant et al., 2005) 이 연구가 면역억제를 통해 비티의 활성 증가로 결론 내리기에 무리가 있었다. 이후 Xn 배양액에 PLA₂ 억제 효과가 있다는 결과를 토대로(Park et al., 2004a,b), 이 배양액을 멸균 처리한 시료뿐만 아니라 세균 제거용 여과지를 이용하여 순수 배양액만을 비티와 혼합 처리하였을 때 또한 비티의 살충력을 상승시키는 결과를 나타냈다(Seo and Kim, 2010). 즉, 이 배양액에 PLA₂ 억제 물질이 포함되었다는 것을 의미했고, 이들 물질을 동정한 결과 본 연구에서 분석된 8 가지 물질의 동정하였다. 이들 물질이 *T. castaneum* 유래 면역관련 sPLA₂에 대한 억제효과가 있다는 것을 밝혔다(Shrestha and Kim, 2009). 그러나 파밤나방 유래 면역 관련 PLA₂에 대한 이들 물질의 영향 분석을 이뤄지지 않았다.

본 연구는 파밤나방 유래 cPLA₂를 대장균을 이용하여 과발현시킨 후 순수 분리하여 이 단백질이 농축된 분획구를 얻었다. 이 단백질은 PLA₂ 활성을 지니고 있었으며 본 연구의 분석 조건에서 인지질의 sn-2 위치에 붙은 pyrene 형광물질을 60 pmol/min의 속도로 촉매하는 활성을 지녔다. 또한 이 재조합단백질을 인지질 추출물과 반응시킨 결과 지방산을 유리시켰으며, 특별히 리놀레익산 또는 리놀레닉산의 다가불포화지방산에 선택성을 보였다. 그러나 기대한 아라키도닉산은 유리되지 않았다. 이러한 결과는 인지질에 붙은 모든 지방산을 유리시키는 방법으로서 NaOH를 이용한 비누화기수분해를 통해서 유리된 지방산에서도 아라키도닉산을 검출하지 못했다. 이러한 이유는 본 연구에서 분석된 GC/MS 검출 한계 이하의 농도로 아라키도닉산이 두 방법에서 유리되었다는 것을 의미한다. 이러한 낮은 수거율은 아마도 초기 추출 단계에서 핵산 대신에 극성이 비교적 높은 용매를 이용하면 해결될 수 있을 것으로 사료된다. 이에 대한 연구가 현재 후속적으로 진행되고 있다. 한편, 일반적으로 곤충은 포유동물에 비해 낮은 함량의 아라키도닉산을 함유하고 있는 것으로 알려지고 있다(Stanley and Kim,

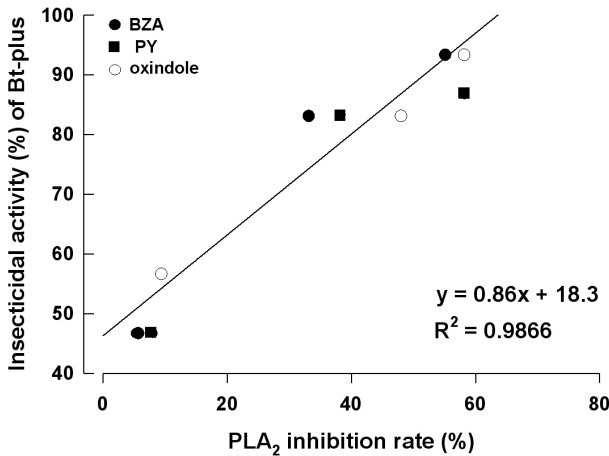


Fig. 5. Correlation between SecPLA₂ inhibition and insecticidal activity of Bt-plus, in which Bt-plus represents a mixture form of Bt and bacterial metabolites (BZA, PY or oxindole). The regression analysis used the data illustrated in Fig. 4B.

2014). 곤충에서 최초의 아라키도닉산 검출은 모기 유충에서 비롯되었다. Stanley-Samuelson and Dadd (1981)은 아라키도닉산이 포함된 먹이로 모기 유충을 사육했으며, 성장된 모기 성충의 조직 지질 추출물 가운데 인지질에서 아라키도닉산이 검출되었으며, 이러한 아라키도닉산의 존재가 30 종 이상의 다른 곤충에서도 확인되었다(Stanley-Samuelson and Dadd, 1983). 다음은 곤충류에서 아라키도닉산의 생합성 가능성에 대한 질문이 있었다. 비록 대부분의 동물은 이러한 다가불포화지방산을 생리적으로 요구하지만 생합성이 어려워 먹이 중에서 의존하게 된다. 흥미롭게도 여러 곤충류에서 리놀레익산이 올레익산에서 Δ^{12} desaturase의 도움으로 생합성된다(Cripps et al., 1990; Blomquist et al., 1991). 이 리놀레익산은 지방산 사슬 연장 및 desaturase의 도움으로 아라키도닉산으로 생합성되는 데, 직접적으로 이질바퀴(*Periplaneta americana*)와 귀뚜라미류(*Teleogryllus commodus*)와 같은 일부 곤충은 아라키도닉산을 *de novo* 생합성을 진행하는 것으로 밝혀졌다(Jurenka et al., 1987, 1988). 파밤나방의 경우 전체 지방산 추출물에서 약 0.02%가 아라키도닉산이 차지했고, methylarachidonyl fluorophosphate (cPLA₂ 특이적 억제제)에 민감한 PLA₂ 추출물에 의해 유리되는 것으로 나타났다(Park and Kim, 2005). 이 추출물에 본 연구에서 클로닝하여 분리한 cPLA₂가 포함되었을 것으로 추정된다.

Xn 대사물질들이 본 연구에서 분리 정제된 cPLA₂의 활성을 억제하는 효율 사이에 차등을 나타냈다. 이러한 억제 효율 차이는 이들 물질이 비터 살충력을 증가시키는 데 상승효과와 차등과 정의 상관관계를 나타냈다(Fig. 5). 이러한 결과는 Xn이 생합성하여 분비하는 대사물질은 cPLA₂를 억제하여 대상 곤충의 면역을 저하시키며, 이렇게 저하된 면역 조건에서 비터의 살

충력이 증가되었다는 것을 의미하고 있다. 특별히 cPLA₂ 억제와 비터 살충력 증가의 양의 상관관계는 향후 비터 살충력을 제고시키는 하나의 고효능 제품 개발 방향을 제시하고 있다.

사사

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업에 의해 이루어졌습니다.

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.
- Blomquist, G.J., Borgeson, C.E., Vundla, M., 1991. Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in insects. Insect Biochem. 21, 99-106.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use, in: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S., (Eds.), Comprehensive molecular insect science. Elsevier, New York, pp. 175-206.
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., Garcia-Gómez, B.I., Rodriguez-Almazan, C., Pardo, L., Soberón, M., 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microbial Biotechnol. 6, 17-26.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 423-431.
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 15196-15199.
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2010. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. BMC Microbiol. 10, 129.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. J. Lipid Res. 50, 5237-5242.
- Christie, W.W., 2003. Lipid analysis, in: Christie, W.W. (Ed.), Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. The Oily Press, Bridgewater, UK, pp. 373-387.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 807-813.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M., Zeigler, D.R., 2014. '*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature'. <http://www.btnomenclature.info>.
- Cripps, C., Borgeson, C., Blomquist, G.J., de Renobales, M., 1990. The Δ^{12} desaturase from the house cricket *Acheta domestica*

- (Orthoptera: Gryllidae): Characterization and form of substrate. Arch. Biochem. Biophys. 278, 46-51.
- Darbox, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bio-insecticide resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5830-5835.
- Dubovskiy, I.M., Krukova, N.A., Glupov, V.V., 2008. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 98, 360-362.
- Eom, S., Park, Y., Kim, Y., 2014. Sequential immunosuppressive activities of bacterial secondary metabolites from the entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. J. Microbiol. 52, 161-168.
- French-Constant, R.H., Waterfield, N., Daborn, P., 2005. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. in: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S., (Eds.), Comprehensive molecular insect science. Elsevier, New York, pp. 239-253.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. Science 293, 857-860.
- Garbutt, J., Bonsall, M.B., Wright, D.J., Raymond, B., 2011. Antagonistic competition moderates virulence in *Bacillus thuringiensis*. Ecol. Lett. 14, 765-772.
- Goh, H.G., Lee, S.G., Lee, B.P., Choi, G.M., Kim, J.H., 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Kor. J. Appl. Entomol. 29, 180-183.
- Grizanov, E.V., Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M.A., Glupov, V.V., 2014. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 119, 40-46.
- Hwang, J., Park, Y., Kim, Y., 2013. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, suppresses expression of antimicrobial peptides controlled by Toll and IMD pathways by blocking eicosanoid biosynthesis. Arch. Insect Biochem. Physiol. 83, 151-169.
- Jung, S., Kim, Y., 2006. Synergistic effect of entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus* sp. and *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 35, 1584-1589.
- Jurenka, R.A., de Renobales, M., Blomquist, G.J., 1987. *De novo* biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the cockroach, *Periplaneta americana*. Arch. Biochem. Biophys. 255, 184-193.
- Jurenka, R.A., Stanley-Samuelson, D.W., Loher, W., Blomquist, G.J., 1988. *De novo* biosynthesis of arachidonic acid and 5,11,14-eicosatrienoic acid in the cricket *Teleogryllus commodus*. Biochim. Biophys. Acta 963, 21-27.
- Kaya, H.K., Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomol. 38, 181-206.
- Kim, Y., D. Ji, S. Cho and Y. Park. 2005. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A₂ to induce host immunodepression. J. Invertebr. Physiol. 89, 258-264.
- Kwon, S., Kim, Y., 2007. Immunosuppressive action of pyriproxifen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Biol. Control 42, 72-76.
- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R., Schmidt, O., 2005. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant, *Helicoverpa armigera* larvae? Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 729-739.
- de Máagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet. 17, 193-199.
- Martinez-Ramirez, A.C., Gould, F., Ferre, J., 1999. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. Biocontrol Sci. Technol. 9, 239-246.
- Metcalf, L.D., Schmitz, A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 33, 363-364.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.E., Macintosh, S.C., Mcgaughey, W.H., 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 940-947.
- Park, Y., Kim, Y., 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J. Insect Physiol. 46, 1469-1476.
- Park, Y. and Kim, Y. 2003. *Xenorhabdus nematophilus* inhibits *p*-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA₂ of *Spodoptera exigua*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 54, 143-142.
- Park, Y., Kim, Y., 2005. Inhibitory effect of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, on the release of arachidonic acid from the membrane preparation of *Spodoptera exigua*. J. Asia Pac. Entomol. 8, 61-67.
- Park, Y., Kim, Y., 2013. RNA interference of cadherin gene expression in *Spodoptera exigua* reveals its significance as a specific Bt target. J. Invertebr. Pathol. 114, 285-291.
- Park, Y., Kim, Y., Stanley, D., 2004a. The bacterium *Xenorhabdus nematophila* inhibits phospholipase A₂ from insect, prokaryote, and vertebrate sources. Naturwissenschaften 91, 371-373.
- Park, Y., Kim, Y., Tunaz, H., Stanley, D.W., 2004b. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits he-

- mocytic phospholipase A₂ (PLA₂) in tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Invertebr. Pathol. 86, 65-71.
- Radvanyi, F., Jordan, L., Russo-Marie, F., Bon, C., 1989. A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A₂ using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. Anal. Biochem. 177, 103-109.
- Rahman, M.M., Roberts, H.L.S., Sarjan, M., Asgari, S., Schmidt, O., 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2696-2699.
- Richards, E.H., Dani, M.P., 2010. A recombinant immunosuppressive protein from *Pimpla hypochondriaca* (rVPr1) increases the susceptibility of *Lacanobia oleracea* and *Mamestra brassicae* larvae to *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 104, 51-57.
- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microbiol. Biotechnol. 17, 547-559.
- Schaloske, R.H., Dennis, E.A., 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. Biochim. Biophys. Acta 61, 1246-1259.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Seo, S., Kim, Y., 2010. Study on development of novel biopesticides using entomopathogenic bacterial culture broth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Kor. J. Appl. Entomol. 49, 241-249.
- Seo, S., Lee, S., Hong, Y., Kim, Y., 2012. Phospholipase A₂ inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. Appl. Environ. Entomol. 78, 3816-3823.
- Shrestha, S., Hong, Y., Kim, Y., 2010. Two chemical derivatives of metabolites suppress cellular immune responses and enhance pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Asia Pac. Entomol. 13, 55-60.
- Shrestha, S., Kim, Y., 2009. Biochemical characteristics of immune-associated phospholipase A₂ and its inhibition by an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. J. Microbiol. 47, 774-782.
- Stanley, D., Kim, Y., 2014. Eicosanoid signaling in insects; from discovery to plant protection. Crit. Rev. Plant Sci. 33, 20-63.
- Stanley-Samuels, D.W., Dadd, R.H., 1981. Arachidonic acid and other tissue fatty acids of *Culex pipiens* reared with various concentrations of dietary arachidonic acid. J. Insect Physiol. 27, 571-578.
- Stanley-Samuels, D.W., Dadd, R.H., 1983. Long-chain polyunsaturated fatty acids: patterns of occurrence in insects. Insect Biochem. 13, 549-588.
- Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., Shimizu, T., 1997. Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. Nature 390, 618-622.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla, L.A., Jr., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 9897-9902.