

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충에서 병원균과 공생균 분비물질들에 의한 세포성면역반응

황두선 · 조세열*

강원대학교 생물자원과학부 응용생물전공

Cellular Immune Response of *Protaetia brevitarsis seulensis* Larvae to Metabolites Produced by Pathogenic and Symbiotic Bacteria

Dooseon Hwang and Saeyoull Cho*

Department of Applied Biology, Division of Bioresource Sciences, College of Agriculture and Life Science, Environment Friendly Agriculture Center,
Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

ABSTRACT: Studies of immune responses in insects have focused on mechanisms that interact directly with invading microorganisms. However, few studies have examined the immune response to various metabolites produced by microorganisms after they enter the host. Here, we examined immune responses in *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae induced by metabolites produced by symbiotic and pathogenic bacteria. The two types of bacteria were cultured under the same conditions. The bacteria were then removed and the remaining culture supernatant was injected into the larvae. The larvae injected with culture medium (Ch-medium) from symbiotic bacteria remained relatively healthy and did not develop an immune response, whereas more than 60% of the larvae injected with pathogen culture medium (Ec-medium) died after 150 hours and dark brown patches of melanin were observed at the injection site. This immune response was confirmed by the finding of activated lysosomes in insect granulocytes. More than 50% of lysosomes in larvae injected with pathogen culture medium were strongly stained after 12 h, but less than 5% of those injected with symbiotic culture media were stained. Therefore, it is assumed that symbiotic bacteria produce few (if any) substances that induce host immune responses.

Key words: *Protaetia brevitarsis seulensis*, Immune, Metabolite, Granulocytes

초록: 곤충의 면역반응에 대한 연구는 곤충 체내 침입한 미생물들과 직접 반응하는 기작들을 중심으로 연구되었다. 그러나 미생물들이 곤충 체내에 침입 한 후 발생하는 다양한 미생물 분비물질에 의한 곤충 면역반응의 시작여부 등에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 이를 위하여 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 장내에 존재하는 공생균과 체외 병원균을 동일한 조건에서 배양하고 다양한 분비물질들이 존재할 거라 예상되는 배양액을 분리, 유충에 주사하여 면역반응 여부를 조사하였다. 공생균 배양액을 주입한 유충들은 비교적 건강하고 면역반응도 발생하지 않았으나 병원균 배양액을 주입한 유충의 경우 150시간 후 60% 이상 사망하였고 주사된 자리도 짙은 갈색의 멜라닌화가 관찰 되었다. 이러한 면역반응은 과립혈구세포의 리소좀(Lysosomes) 활성화 여부로 재확인 하였다. 병원균 배양액이 주입된 유충들의 경우 12시간 후 리소좀이 ~50% 이상 활성화 되었으나 공생균 배양액이 주입된 유충들의 경우 ~5% 미만으로 활성화 되는 것으로 나타났다. 따라서 공생균 배양액내에는 기주면역반응을 유도하는 물질들이 없거나 양이 매우 적게 존재하는 것을 추측 할 수 있었다.

검색어: 흰점박이꽃무지, 면역, 분비물질, 과립혈구세포

곤충 병원성 미생물들은 곤충의 면역반응을 교묘하게 회피하고 체내에서 번식하여 곤충을 병들고 치사케 한다. 그러나 곤

충은 체내에 침입한 병원성 미생물들을 빠른 시간 내 인지하고 미생물들에 대항하는 면역반응을 시작한다. 곤충의 면역반응은 혈구세포들에 의한 세포성면역(Cellular immune)과 다양한 항생/항균단백질(Antimicrobial peptides)들을 이용하여 미생물들을 제거하는 체액성면역(Humoral immune)으로 구분되어

*Corresponding author: saeyoullcho@kangwon.ac.kr

Received September 19 2017; Revised December 19 2017

Accepted January 30 2018

외부물질들에 대항한다(Lavine and Strand, 2002; Lemaitre and Hoffman, 2007; Strand, 2008; Vlisidou and Wood, 2015). 이러한 곤충 면역반응의 시작과 유도는 병원성 미생물들로부터 기원되는 물질(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)들에 의하여 야기되며 이러한 물질들은 병원성 미생물들의 종류에 따라 구분되고 있다.

그 예로 베타글루칸(β -glucan)은 세균과 곰팡이의 세포벽에서 자연스럽게 발생하는 다당류(β -D-glucose polysaccharides)이며 특히, 곰팡이의 세포벽에서 발생하는 베타글루칸(β -1,3-glucan)은 곤충 체내에 존재하는 그램음성결합수용체(Gram Negative Binding Proteins, GNBPs)와 결합되어 세린단백질 가수분해효소(serine protease cascade) 신호체계를 활성화시키고 최종적으로 체액성, 세포성면역반응을 수행한다(Lemaitre and Hoffman, 2007; Bang et al., 2015). 이러한 연구는 초파리(*Drosophila melanogaster*)를 대상으로 자세히 연구되었고 특히, 초파리(*D. melanogaster*)는 3종류의 그램음성결합수용체(GNBP 1, 2, 3)가 존재하는 것으로 알려져 있다. 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)의 경우도 최소 2종류의 그램음성결합수용체가 존재하며 면역반응을 유도하는 것으로 보고되었다(Bang et al., 2015). 라이신형펩티드글리칸(Lys-type Peptidoglycan), 리포테이코산(lipoteichoic acid, LTA), 디아미노피멜산형펩티드글리칸(Diaminopimelic acid-type PGN)의 경우는 그램음성세균(Gram negative bacteria)의 주요 구성성분이며 특히 디아미노피멜산형펩티드글리칸의 경우 세포벽 주요성분으로서 곤충면역결핍(Insect immune deficiency, IMD) 신호전달 체계를 활성화시키는 물질로 알려져 있다. 이러한 물질은 곤충의 다양한 단백질들과 반응을 시작으로 최종적으로 항생/항균단백질들을 발현시켜 미생물을 인지/제거하는 것으로 알려져 있다(Ferrandon et al., 2007; Buchon, 2014).

곤충 면역시스템을 활성화시키는 미생물 기원물질들을 분자패턴인식단백질(Molecular Pattern Recognition Proteins; microbial peptidoglycan, lipopolysaccharides, β -glucans, lipoproteins, CpG dinucleotides, or flagellin)이라 하며 이러한 물질들은 위에서 서술된 곤충의 그램음성결합수용체와 같은 패턴인지수용체(Pattern recognition receptors, PRRs)와 결합하여 면역반응의 유도 및 면역반응을 시작한다(Shelby and Popham, 2012). 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 경우는 현재까지 8종류의 패턴인지수용체(PGRP-1, 2, 3, LB, LC, LE, SC2, SC3)들이 존재하는 보고되었고 이들 수용체들은 병원성 미생물 감염 후 과 발현되어 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(Bang et al., 2015). 위와 같이 곤충 면역반응을 유도하는 미생물 유래 물질들은 주로 미생물들의 세포벽

주요구성성분들이고 이러한 물질들만을 대상으로 곤충 면역과 연관되어 대한 많은 연구가 진행되었다.

그러나 다양한 병원성 미생물들은 성장하면서 수많은 물질(대사체, Metabolites)들을 배양액에 분출하며 성장한다. 이러한 미생물 분비물질들은 기주의 질병발생, 면역유도, 면역억제, 미생물과 공생, 진화 등 다양한 반응을 유도 하는데 이러한 연구는 포유동물을 대상으로 매우 활발히 진행되고 있다. 예를 들어 장(Gut)내에 공생하는 미생물과 공생균에 의하여 배출되는 분비물질들이 면역을 유도하거나 억제 시키는 기작과 암 발생, 천식, 염증, 소화기능 장애, 당뇨에 이르기까지 많은 분야가 병원성 미생물자체 뿐 아니라 분비물질과도 깊은 연관이 있음을 보고 하였다(Brestoff and Artis, 2013; Rooks and Garrett, 2016). 하지만 초파리(*D. melanogaster*)를 포함 곤충을 대상으로 미생물들의 분비물질과 기주의 질병, 면역 등에 대한 상호 관계 있는지 또한 분비물질 자체가 곤충 면역을 유도하는지에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 미생물 분비물질 자체가 곤충 면역반응을 유도하는지에 대한 조사로서 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)에 대한 병원성 세균과 공생균을 이용하였다. 본 연구자들은 최근 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.)이 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 장(Gut)에 존재하고 기주의 면역반응을 회피 할 수 있는 공생균이고 대장균(*E. coli* K-12)은 매우 강한 병원성을 야기하는 미생물로 보고하였다(Lee et al., 2016). 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.)과 대장균(*E. coli* K-12)을 동일한 조건에서 배양하고 배양된 세균들은 제거한 후 다양한 분비물질들이 존재 할 거라 예상되는 배양액만을 유충에 주사하여 면역반응 여부를 조사하였다. 추후에 대장균(*E. coli* K-12)에 의하여 분출되는 분비물질들과 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 분비물질들 차이를 비교하여 면역과 관련된 분비물질들을 모두 동정한다면 미생물 분비물질들 하나하나에 대한 곤충 면역 신호전달체계를 연구할 수 있는 기초를 제공 할 것이다. 동시에, 미생물 대사물질만 이용 면역 활성화, 억제, 질병예방, 치료 등 다양한 병리학 분야에도 적용 가능할 것으로 판단한다.

재료 및 방법

공시 곤충

본 연구에 이용한 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충은 Kwon (2009)에 의한 방법으로 사육하였다. 사육 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주조건은 16:8 (L:D) h, 상대습도는 $60 \pm 10\%$ 로서

살균된 오크나무 톱밥을 먹이로 제공하면서 사육하였다.

흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충 장(Gut) 내 미생물 분리 및 배양

유충 장내 미생물의 분리 및 동정은 기존 방법에 의거 하여 진행하였다(Lee et al., 2016). 간단히 설명하면, 장이 적출될 4령 유충은 95% 알코올에서 10분간 큐티클(Cuticle) 표면을 소독하였다. 해부현미경(Leica DM IL LED)하에서 중장(Midgut)과 종장(Hindgut)을 적출하고 초음파분쇄기에서 분쇄 한 후 PBS 버퍼(NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 and NaCl (pH = 7.2))에서 3반복 하여 세척하였다. 약 ~500 μl 상층액은 4°C에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리 하여 상층액과 조직을 분리하였다. 상층액은 마이크로 필터(0.22 μm)를 사용하여 필터 한 후 미생물 배양 고체배지 (SOC starch agar plates; 2% tryptone, 0.5% Yeast extract, 8.56 mM NaCl, 2.5 mM KCl, $\text{d}_5\text{H}_2\text{O}$ to 1000 mL, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 30 mM glucose)에서 37°C에서 48시간 배양하여 미생물을 분리하였다. Lee (2016) 등에 의하여 보고 된 바와 같이 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.; KX371567)을 분리하여 공생균주로 사용 하였다. 대장균(*E. coli* K-12)를 포함하여 분리된 균주는 액체배양(LB media)을 24시간 진행 한 후 4°C에서 10분간 13,000 rpm 원심분리를 진행하여 펠렛은 완전히 제거 하였다. 상층액은 다시 한 번 같은 조건으로 원심분리하여 배양액만 주입에 사용하였다. 균들이 완전히 제거가 되었는지 여부는 상층액을 1 ml를 고체배지에도포하여 48시간 배양하여 콜로니(colony)생성 여부를 재확인 하여 배양액만 있는지를 다시 한 번 확인 확인하였다. 분리된 배양액 10~40 μl 를 직접 유충 혈강내 주입하여 생존율, 병원성 여부, 혈구세포들의 면역 활성화를 관찰 하였다. 병원성 여부 및 생존율 분석은 카플란-마이어 분석(Kaplan Meier survival) 방법을 사용하였고 혈구세포들의 면역반응은 혈구세포의 리소좀(Lysosome) 활성화를 지표로 사용하였다.

혈림프(hemolymph) 채혈, 혈구세포 염색, 유세포분석(Flow cytometry) 및 생존율 조사

혈림프 채혈은 4령 유충의 등(Dorsal) 부분을 70% 에탄올(Etanol)을 사용하여 멸균 한 뒤 유리 파스츄어피펫(Pasteur pipette; >2mm) 채혈기를 사용하여 약~500 μl 의 혈림프(Hemolymph)를 추출하였다. 혈림프는 항응고제(98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM EDTA, 4.1 mM citric acid, pH 4.5)를 이용하여 약 1:1 비율로 혼합하였고 4°C, 1,000 g에서 10 분간 원심

분리 한 후 혈구세포들을 관찰 하였다. 혈구세포들은 세포내 리소좀(Lysosome)만 특별히 염색하는 LysoTracker Red (7.5 nM; Molecular Probes)시약을 사용하였다(Kwon et al., 2014). 시약과 30분간 실온에서 배양 한 후 3분 간격으로 3반복 PBS buffer (137 mM Sodium Chloride; 10 mM phosphate; 2.7 mM Potassium Chloride; pH = 7.4)로 세척 후 현미경으로 관찰하고 유세포분석기(BD Bioscience; San Jose, CA)를 사용하여 혈구세포를 분석하였다(Kwon et al., 2014). 배양액 주입 후 면역반응 유도 시간은 12~180시간으로 정하였으며 표준통계 소프트웨어 프로그램을 사용하여 통계 분석하였다(IBM SPSS statistics 22.0).

현미경(Microscopy)관찰

혈구세포들 관찰을 위하여 라이카 현미경(Leica DM2500 upright and Leica DMI 3000B inverted fluorescence microscopes), 콘포컬(Olympus FV1000 confocal microscope)현미경을 사용하였다.

결과 및 고찰

미생물 배양액 주입과 생존율

본 연구는 미생물 분비물질 자체가 곤충 면역반응을 촉발하는 지에 대한 연구로서 재료 및 방법에 묘사한 것과 같이 두 종류의 미생물을 배양, 이용하였다. 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.)은 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)의 장(Gut)에 존재하는 공생균이며 대장균(*E. coli* K-12)은 주입(10^6 colony-forming units (CFU)) 72시간 후 유충의 50% 이상을 사망케 하는 강력한 병원성 미생물이다(Lee et al., 2016). 이러한 결과와 정보를 바탕으로 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.)과 대장균(*E. coli* K-12)을 24시간 동일한 조건, 동일한 양을 배양 하였다(10^6 CFU). 배양 후 3번의 원심분리를 통하여 배양된 세균자체를 완전히 제거 하였다. 배양균 제거 여부는 세균이 제거 된 배양액 500 μl 를 고체배지에 도포하여 72시간 재 배양하여 콜로니 형성 여부를 확인하였고 72시간 이후에도 콜로니가 전혀 형성되지 않는 것을 확인 한 후 아래 실험을 진행하였다.

대장균(*E. coli* K-12) 배양액(Ec media), 단순 배양액(LB media), 공생균인 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액(Ch media)을 주입 비교하여 면역 활성화 여부를 확인 하였다(Fig. 1A). Fig. 1A와 같이 병원균 배양액(Ec media)을 주입 한 그룹은 주입 150시간 이후 ~60% 이상의 유충이 사망 하였으나 공생균 배양액(Ch media) 주입 유충은 주입 150시간

이후 ~60% 이상 생존하고 있음을 확인 하였다(Fig. 1A). 단순 배양액(LB media) 주입 그룹은 ~80% 이상 생존하는 것을 관찰 하였다. 주입 180시간 후 병원균 배양액(Ec media) 주입 그룹은 ~30% 이하, 공생균 배양액(Ch media) 주입 그룹은 ~60% 이상 생존율을 나타냈으며 컨트롤 그룹은(LB media) ~80% 이상 생존하고 있음을 최종적으로 확인하였다(Fig. 1A). 결론적으로, 단순 배양액(LB media), 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액과 비교하여 병원균인 대장균(*E. coli* K-12) 배양액

(Ec media)에는 곤충의 병원성을 야기하는 분비물질(Metabolites; pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)들이 다량으로 존재하고 이러한 분비물질들이 곤충의 면역반응을 촉발하여 곤충이 생존하거나 또는 이러한 물질들에 의하여 사망하는 것으로 판단 할 수 있었다.

이러한 곤충 면역반응의 여부는 Fig. 1B에서도 확인 할 수 있었다. 유충에서 대장균(*E. coli* K-12) 배양액(Ec media)을 주입한 주사 자리가 72시간 이후부터 멜라닌화(melanization)화

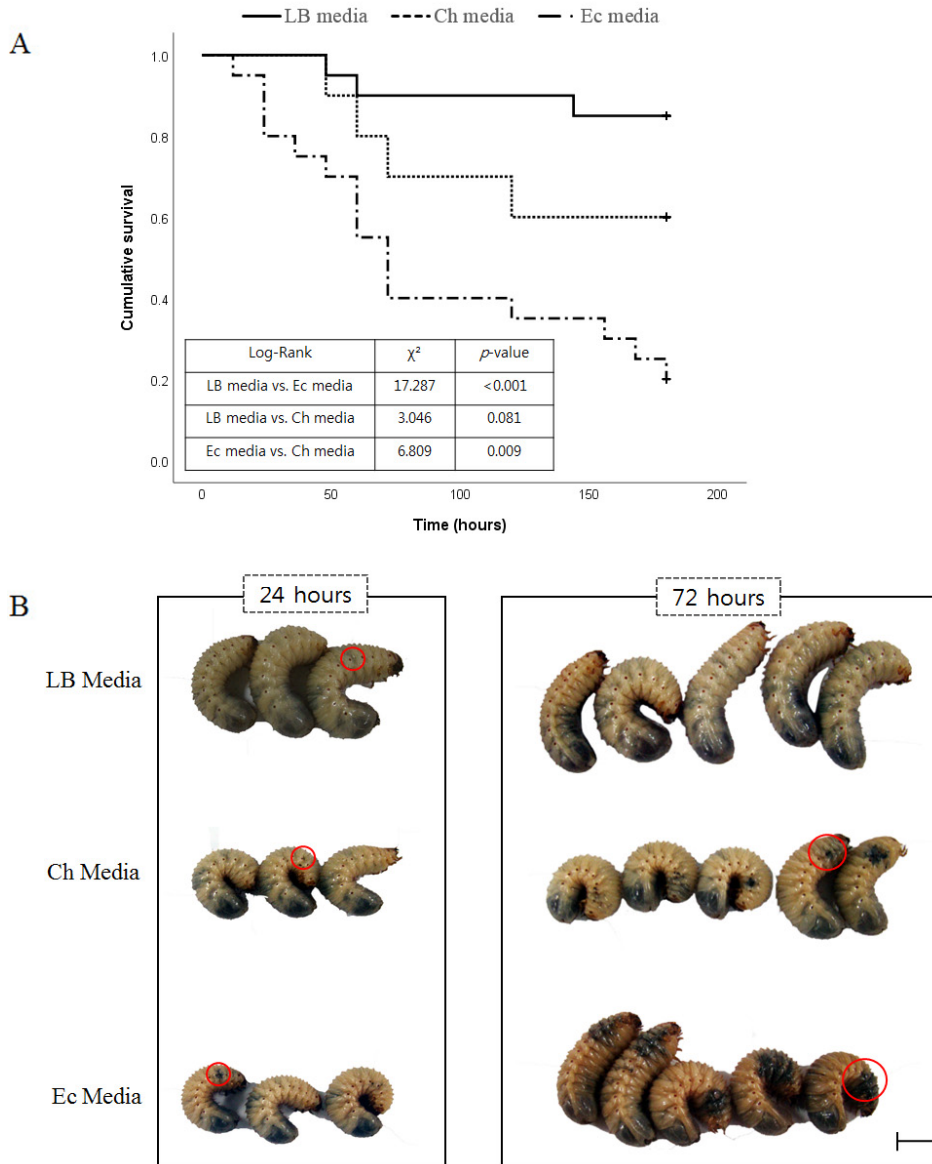


Fig. 1. Kaplan-Meier survival analysis and melanization in LB medium-, Ch medium-, and Ec medium-challenged group. (A) Kaplan-Meier survival curve with log-rank test comparing survival of *Protaetia brevitarsis seulensis* larva injected with LB media, Ch media, or Ec media. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant. Pairwise comparison: LB media vs. Ec media, $p < 0.001$; LB media vs. *Chryseobacterium* sp., $p = 0.081$; *Chryseobacterium* sp. vs. Ec media, $p = 0.009$. (B) Melanization was observed in all the larvae after injection. However, it was observed that melanin accumulates and grows around the injection site only in Ec medium-challenged larva after 72 hours (Indicated by red circles). Scale bar = 1 cm.

강하게 진행되었고 180시간까지 지속적으로 유지되면서 유충이 죽거나 강한 면역반응으로 건강하지 못한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 그러나 단순 배양액(LB media)과 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액이 주입된 유충들은 72 시간을 지나면서 멜라닌화는 감소되거나 차츰 없어지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 강한 갈색의 멜라닌화(Melanization)는 곤충 면역반응 지표 중 하나로서 곤충의 프로페놀옥시다아제(prophenoloxidase) 활성화에 따른 곤충 세포성, 체액성 면역반응으로서 패턴인식수용체를 비롯하여 세린단백질도 관여하는 것으로 알려져 있다(Lu et al., 2014).

위의 결과와 같이 배양액만 주입 한 후 면역반응이 촉발되는 것은 아마도 배양액내에 존재하는 다양한 분비물질들이 유충의 면역반응을 촉발하는 것으로 추측할 수 있다. 병원균인 대장균(*E. coli* K-12) 배양액(Ec media)에 존재하는 다양한 분비물질들에 대한 연구는 매우 활발히 진행되었다. 동시에, 다양한 분비물질들에 관련된 모든 자료는 ECMDDB (*E. coli* Metabolome Database, ecmdb.ca)에서 찾아볼 수 있다. 특히 위 자료는 대장균 대사경로데이터베이스(metabolic pathway database)를 바탕으로 분비물질들의 정보를 제공하는데 약 3,700개 이상의 작은 분자량 물질, 1,400개 이상의 효소와 연관된 물질, 380개 이상의 수송체(Transporters) 물질, 3,000개 이상의 분비물질이 등록되어 있다(Sajed et al., 2015). 이러한 수많은 물질 중 특히, D-Mannose, LPS (1-O-antigen), LPS (4-O-antigen), Ra-LPS, N-Acetyl-alpha-neuraminatate 등은 동물의 면역반응도 촉발하는 물질들로 보고되고 있다. 특히, D-Mannose는 글루코스(Glucose)와 연관된 당(sugar)형태로 모기(*Aedes albopictus*)의 침샘에서 C-type lectin과 결합하는 특성을 갖고 면역반응을 야기하는 것으로 보고되고 있다(Cheng et al., 2014). 또한 다양한 종류의 리포다당류(lipopolysaccharide, LPS)들은 곤충의 면역을 강하게 야기하는 병원성발현분자들인 분자패턴인식물질로서 수많은 연구가 곤충을 대상으로 연구되었다. 이러한 물질들은 최종적으로 곤충의 항생단백질들 발현을 유도하거나 세포성면역반응을 촉발하여 침입한 병원성 미생물들을 치사케 한다(Carlsson et al., 1998; Michel et al., 2001; Charles and Killian, 2015).

비록 본 연구에서는 많은 비용과 시간이 필요로 하는 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액에 존재하는 수 천종 이상의 분비물질들을 일일이 조사하지 못 하였으나 병원균인 대장균(*E. coli* K-12) 배양액(Ec media)에 존재하는 분비물질들과 분명한 차이가 있음을 추측할 수 있었다. 이러한 차이가 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충의 생존율과 면역반응에 영향을 주는 것으로 유추할 수 있었다.

미생물 배양액 주입에 따른 혈구세포 리소좀(Lysosome) 활성화

Fig. 1B의 결과와 같이 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충에서 발생한 멜라닌화가 면역반응과 직접 연관이 있는 것인지를 혈구세포 면역 활성화 여부로 재확인하였다. Fig. 1의 방법과 같이 대장균(*E. coli* K-12) 배양액(Ec media), 단순 배양액(LB media), 공생균인 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액(Ch media)을 주입한 후 혈구세포를 채혈하여 세포성면역반응 여부를 확인 하였다(Fig. 2). 본 연구자들은 이전 연구에서 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충 내 존재하는 혈구세포의 종류 및 특성에 대하여 자세히 보고 하였다(Kwon et al., 2014; Lee et al., 2016; Cho, 2016). 특히, 면역담당세포인 과립혈구세포(Granulocytes)는 외래물질을 인지하고 식균작용(Phagocytosis)을 통하여 병원균을 제거하는 주요 면역세포이며 이때 과립혈구세포질 내 리소좀(Lysosomes)이 매우 활성화 되는 것을 보고 한 바 있다(Kwon et al., 2014; Hwang et al., 2015). 그러므로 배양액들이 주입된 유충들 과립혈구세포질 내 리소좀 활성화 여부가 세포성면역반응 지표로 활용하여 확인 하였다. 주입 1시간 후 모든 그룹에서 과립혈구세포 리소좀의 활성화는 관찰 되지 않았다(Fig. 2A-C). 그러나 주입 12시간 이후 대장균(*E. coli* K-12) 배양액(Ec media) 주입

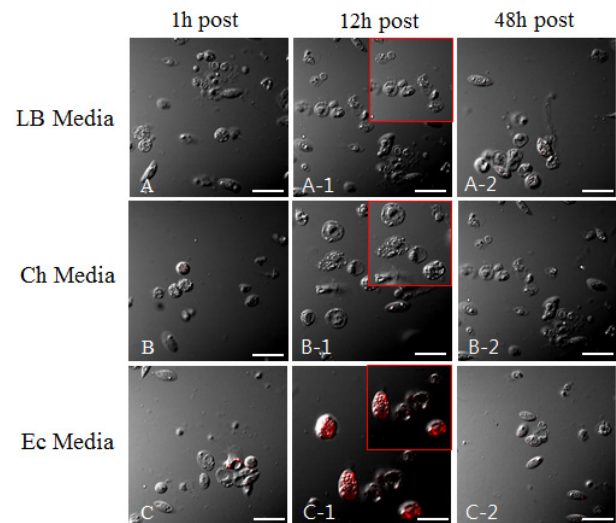


Fig. 2. Cellular immune response. (A, B, and C) Activation of lysosomes was not observed in any larvae after 1 hour of injection. (A-1, B-1, and C-1) After 12 hours of injection, lysosomes in granulocytes were found to be strongly activated in Ec medium-challenged larva (Indicated by red signal) (A-2 and B-2) Lysosomal activation was not observed in LB medium- or Ch medium-challenged larva even after 48 hours. (C-2) After 48 hours, lysosomal activation were gradually disappeared in Ec medium-challenged larva. Scale bar = 10 μ m.

곤충 그룹에서만 리소좀이 활성화 되는 것을 관찰 하였다(Fig. 2C-1). 주입 48시간이 지나면서 대장균(*E. coli* K-12) 배양액 (Ec media) 유충은 리소좀의 활성화가 점차 줄어드는 것을 확인 하였고 이는 병원성 물질들이 리소좀에 의하여 제거가 완료 되는 것으로 추측 할 수 있었다(Fig. 2C-2). 단순 배양액(LB media)이나 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액 (Ch media)의 경우에는 관찰 시작과 관찰 끝(48시간)까지 과립혈구세포 리소좀의 활성화는 관찰 되지 않았다(Fig. 2A-1, A-2, B-1, and B-2).

일반적으로 면역세포들은 외래물질을 인지 후 다양한 반응 단백질(대표적으로 항생/항균 단백질)을 발현하고 동시에 외래물질을 인지하여 식균작용을 통하여 외래물질을 제거한다. 특히, 식균작용을 통하여 세포질내로 들어온 외래물질들은 활성화된 리소좀과 결합하여 리소좀내 다양한 효소들에 의하여

외래물질이 제거된다. 따라서 병원균인 대장균(*E. coli* K-12) 배양액(Ec media) 내에는 곤충면역을 활성화 시키는 물질들이 다량으로 존재하고 이들을 제거하기 위하여 과립혈구세포의 리소좀 활성화가 관찰 된 것으로 추정 할 수 있었다. 반대로 공생균인 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액(Ch media)에는 기주의 면역을 활성화 시키는 물질이 없거나 매우 적게 존재하는 것으로 추정 할 수 있었다.

미생물 배양액 주입에 따른 유세포분석

현미경 관찰 결과들의 신뢰도를 높이고 리소좀의 활성화를 정량적으로 측정하기 위하여 유세포분석기(Flowcytometry)를 통하여 분석하였다. 유충 한 마리당 10,000개의 혈구세포를 넣고 염색되는 혈구세포수를 측정한 후 통계분석을 실시하였다.

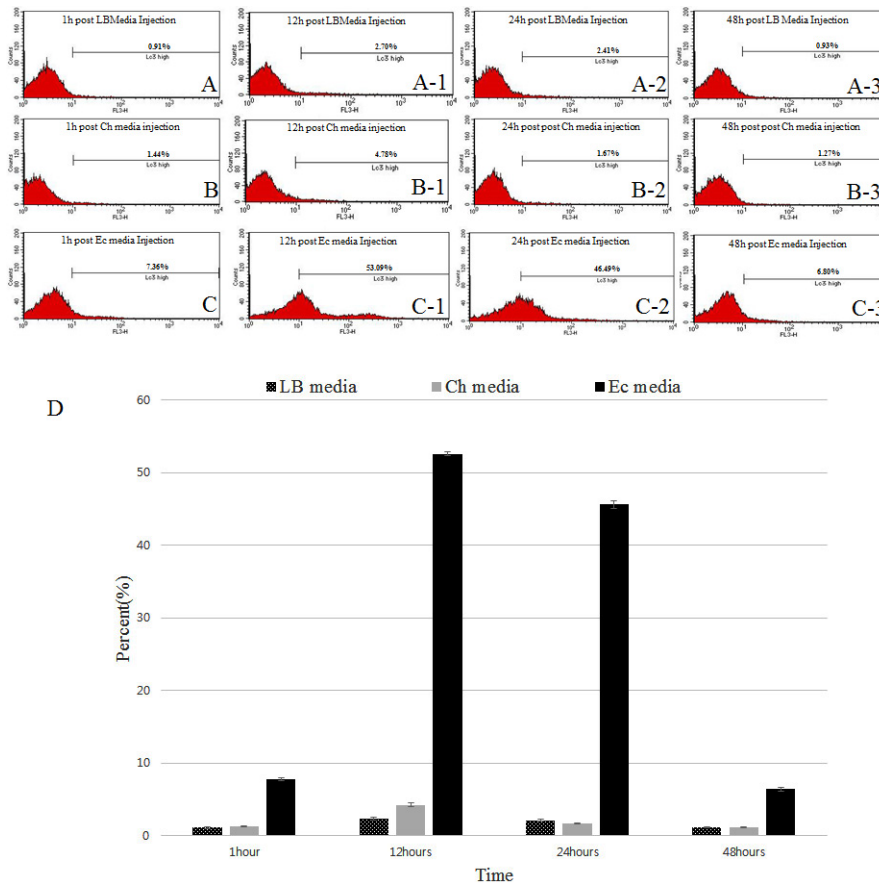


Fig. 3. Flow cytometry analysis. The red filled histogram indicate positive staining of lysosomes. (A, B, C) After 1 hour of injection, lysosomes were not activated in any medium-challenged group. (A-1, B-1, and C-1) After 12 hours, the staining level in LB medium- or Ch medium-challenged larva remained very low at 2.70% or 4.78%, but the staining level in Ec medium-challenged larva soared to 53.09%. (A-2, A-3, B-2, and B-3) After 24 hours and 48 hours, larva injected with LB medium or Ch medium still maintained low activation of lysosomes. (C-2 and C-3) The larva injected with Ec medium maintained the activation of lysosomes (46.49%) continuously after 24 hours and returned to their original state after 48 hours (6.80%). (D) Student's t-test analysis of flow cytometry results to compare differences between LB medium-, Ch medium-, and Ec medium-challenged group. The experiment was repeated for three times. Error bars indicate Mean±SEM. *P < 0.05 (t-test).

대장균(*E. coli* K-12) 배양액(*Ec media*), 단순 배양액(*LB media*), 공생균인 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액(*Ch media*)을 주입한 후 혈구세포를 채혈하여 활성화 되는 리소좀에 대하여 유세포분석을 수행하였다(Fig. 3A-D).

대장균(*E. coli* K-12) 배양액(*Ec media*)의 경우 주입 ~1시간 후 혈구세포의 리소좀 활성화는 7.36%로 관찰되었다(Fig. 3C). 주입 12시간 후 53.09%로 강하게 활성화 되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3C-1). 24시간 후 46.49%로 리소좀의 활성화가 지속적으로 유지되었고(Fig. 3C-2), 48시간 후 염색량 6.80%로 다시 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3C-3). 그러나 단순 배양액(*LB media*) 주입 유충들은 평균적으로 0.9% (Fig. 3A - A-3), 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액(*Ch media*) 주입 유충들의 경우도 주입 12시간 후 최대 4.78%만 염색되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B - B-3). Fig. 3D는 그룹 별(유충 10마리 씩) 유세포 분석 3반복 결과를 나타내며 대장균(*E. coli* K-12) 배양액(*Ec media*) 주입 유충들에서만 리소좀 활성화가 1시간 이후부터 차츰 증가하여 12시간에 최대로 나타나고 시간의 흐름에 따라 차츰 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3D). 이는 ~12시간 내 식균작용에 따른 리소좀이 빠르게 활성화 되고 병원균의 원인 물질들을 제거 한 후 시간이 흐르면서 원래 상태로 복귀 되는 것으로 판단 할 수 있었다. 그러나 단순 배양액(*LB media*), 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액(*Ch media*) 주입 유충들의 경우는 배양액내 병원균의 원인 물질들이 없거나 또는 양이 매우 적게 존재하여 리소좀의 활성화가 관찰 되지 않았던 것으로 판단 할 수 있었다.

위의 결과들은 병원성 미생물들이 성장하면서 배출하는 다양한 분비물질(*Metabolites*)들이 곤충에서는 면역 촉발 인자로 사용되고 있음을 나타낸다. 앞으로 공생균인 크리세오박테리움(*Chryseobacterium* sp.) 배양액(*Ch media*)내 존재하는 수 천 종 이상의 분비물질들 분석을 통하여 각각의 곤충 면역촉발 인자를 정확히 특정 한다면 원인 물질들에 의한 체계적인 곤충 면역 신호전달 연구, 미생물 감염 없이 면역 활성화, 면역 억제, 질병 예방, 치료 등 다양한 병리학 분야에도 적용이 가능 할 것으로 판단한다.

사 사

본 연구는 한국연구재단(과제번호: NRF-2017R1D1A3A03000529)의 지원 하에 수행 되었습니다. 2017-강원대학교 전임교원기초연구비(D1001239-01-01) 지원도 감사드립니다.

Literature Cited

- Bang, K., Hwang, S., Lee, J., Cho, S., 2015. Identification of immunity-related genes in the larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Coleoptera: Cetoniidae) by a next-generation sequencing-based transcriptome analysis. *J. Insect Sci.* 15, 142.
- Brestoff, J.R., Artis, D., 2013. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol.* 14, 676-684.
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S., 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to whole organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 796-810.
- Carlsson, A., Nyström T., de Cock H., Bennich H., 1998. Attacin-an insect immune protein-binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiology* 144, 2179-2188.
- Charles, H.M., Killian K.A., 2015. Response of the insect immune system to three different immune challenges. *J. Insect Physiol.* 81, 97-108.
- Cheng, J., Wang, Y., Li, F., Liu, J., Sun, Y., Wu, J., 2014. Cloning and characterization of a mannose binding C-type lectin gene from salivary gland of *Aedes albopictus*. *Parasites Vectors* 7, 337.
- Cho, S., 2016. Ultrastructure characterization of hemocytes in larva of *Protaetia brevitarsis seulensis*. *Korean J. Appl. Entomol.* 55, 215-221.
- Ferrandon, D., Imler, J., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 862-874.
- Hwang, S., Bang, K., Lee, J., Cho, S., 2015. Circulating hemocytes from larvae of the Japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. *PLoS ONE.* 10, e0128519.
- Kwon, O., 2009. Effect of different diets on larval growth of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe) (Coleoptera: Cetoniidae). *Entomol. Res.* 39, 152-154.
- Kwon, H., Bang, K., Cho, S., 2014. Characterization of the Hemocytes in Larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: Involvement of Granulocyte-Mediated Phagocytosis. *PLoS ONE.* 9, e103620.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295-1309.
- Lee, J., Hwang, S., Cho, S., 2016. Immune tolerance to an intestine-adapted bacteria, *Chryseobacterium* sp., injected into the hemocoel of *Protaetia brevitarsis seulensis*. *Sci. Rep.* 6, 31722.
- Lemaitre, B., Hoffmann J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697-743.
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, I., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y., Ling, E., 2014. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front Physiol.* 5, 252.

-
- Michel, T., Reichhart, J., Hoffmann, J.A., Royet, J., 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nat.* 414, 756-759.
- Rooks, M.G., Garrett, W.S., 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 341-352.
- Sajed, T., Marcu, A., Ramirez, M., Pon, A., Guo, A., Knox, C., Wilson, M., Grant, J., Djoumbou, Y., Wishart, D., 2015. ECMDDB 2.0: A richer resource for understanding the biochemistry of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 44, D495-501.
- Shelby, K.S., Popham, H.J., 2012. RNA-seq study of microbially induced hemocyte transcripts from larval *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects* 3, 743-762.
- Strand, M.R., 2008. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15, 1-14.
- Vlisidou, I., Wood, W., 2015. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS J.* 282, 1368-1382.