



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월31일
 (11) 등록번호 10-1380111
 (24) 등록일자 2014년03월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0057914(분할)
 (22) 출원일자 2013년05월22일
 심사청구일자 2013년05월22일
- (65) 공개번호 10-2013-0060251
 (43) 공개일자 2013년06월07일
- (62) 원출원 특허 10-2011-0055507
 원출원일자 2011년06월09일
 심사청구일자 2011년06월09일
- (56) 선행기술조사문헌
 GenBank Accession #: AA017204(2003. 07. 17.)*
 KR100522667 B1
 W01999042589 A2
 W01999003328 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 경북대학교 산학협력단
 대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
- (72) 발명자
 신재호
 대구 북구 침산로22길 31, 103동 103호 (침산동, 침산동코오롱하늘채아파트)
- 장은경
 대구 북구 복현로 173, 104동 702호 (복현동, 복현화성타운)
- (74) 대리인
 김순용

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **신규의 살충성 단백질, 이를 이용한 해충 방제용 조성물 및 해충 방제 방법.**

(57) 요약

본 발명은 포토랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KACC91627P)로부터 분리한 것을 특징으로 하는 신규한 살충성 단백질에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 신규한 살충성 단백질을 포함하는 해충 방제용 조성물에 관한 것이며, 이를 이용한 해충 방제 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

Temperature cycle	Reaction mixture
95°C 2m	Genomic DNA(50ng/μl) 1 μl
95°C 30s	F-primer(10pmole) 1 μl
AT* 30s	R-primer(10pmole) 1 μl
72°C 1m	10mM dNTP 1 μl
72°C 5m	10xPfu-X buffer 5 μl
4°C	Pfu-X(2.5U/μl) 0.25 μl
	dH ₂ O 40.75 μl

특허청구의 범위

청구항 1

포토랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KACC91627P)로부터 분리한 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 살충성 단백질.

청구항 2

서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 하는 살충성 단백질 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 4의 염기서열로 구성된 살충성 단백질 유전자

청구항 4

제2항의 살충성 단백질을 포함하는 재조합 발현 벡터

청구항 5

제4항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 살충성 단백질을 발현하는 형질 전환체.

청구항 6

제1항의 살충성 단백질 또는 제5항의 형질 전환체를 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 나비목 해충에 대해 살충활성을 갖는 것을 특징으로 하는 해충 방제용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 나비목 해충은 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 털빨가지나방(*Alcis angulifera*), 애모무늬잎말이나방(*Adoxophyes orana*), 감나무잎말이나방(*Ptycholoma lecheana*), 밤애기잎말이나방(*Cydia Kurokoi*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 은무늬굴나방(*Lyonetia prunifoliella*), 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 목화바둑나방(*Diaphania indica*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 이화명나방(*Chilo suppressalis*), 및 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 해충임을 특징으로 하는 해충 방제용 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 조성물은 딱정벌레목 해충에 대해 살충활성을 갖는 것을 특징으로 하는 해충 방제용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 딱정벌레목 해충은 갈색거저리(*Tenebrio molitor* Linnaeus), 오리나무잎벌레(*Agelastica coerulea* Baly), 사과동근나무좀(*Xyleborus apicalis* Blandford), 서울나무좀(*Scolytus seulensis*), 쌀 바구미(*Scolytus seulensis*), 소나무좀(*Tomicus piniperda*), 밤바구미(*Culculio sikkimensis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 해충임을 특징으로 하는 해충 방제용 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 신규한 균주인 포투랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KACC91627P)로부터 분리한 신규의 살충성 단백질, 신규의 살충성 단백질 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터, 발현 벡터를 포함하는 신규의 살충성 단백질 제조 형질 전환체에 관한 것이다.
- [0002] 또한 본 발명은 상기 신규의 살충성 단백질을 포함하는 해충 방제용 조성물에 관한 것이다.
- [0003] 또한 본 발명은 상기 해충 방제용 조성물을 이용하여 해충을 방제하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0004] 곤충 및 다른 해충들은 농작물 손실과 이러한 해충들을 방제(control)하는 비용에 있어서 농부에게 해마다 수천만 달러의 비용을 부담시킨다. 농작물 생산 환경에서 해충에 의하여 야기되는 손실은 농작물 수율의 감소, 농작물 질의 저하, 및 추수 비용 증가를 포함한다.
- [0005] 원하는 수준의 방제를 보장하기 위하여 화학적인 살충제에 가장 많이 의존하고 있다. 이러한 살충제는 토양 위에 결합되거나 또는 토양 속으로 삽입되나 살충제의 지속적인 사용은 내성 곤충이 진화하는 것을 허용하여 왔다. 매우 많은 개체수의 유충, 폭우, 및 살충제 적용 장비의 부적절한 측정과 같은 상황들이 만족스럽지 못한 통제를 초래할 수 있다. 또한, 살충제의 사용은 종종 토양과 표면 및 지하 수원의 오염과 같은 환경적인 관심사를 야기한다.
- [0006] 대중은 또한 음식에서 발견될 수 있는 합성 화학약품의 잔류량에 관심을 가져 왔다. 살충제를 가지고 작업하는 일은 또한 그것을 사용하는 사람에게 해를 끼친다. 따라서, 합성 화학약품은 그들의 잠재적인 유독성 환경 결과들에 대하여 점점 더 면밀히 검사되고 있다. 광범위하게 사용되는 합성 화학 살충제의 예에는 유기염화물, 예를 들면 DDT, 미렉스(mirex), 케폰(kepone), 린단(lindane), 알드린(aldrin), 클로르단(chlordane), 알디카브(aldicarb), 및 디엘드린(dieldrin); 유기인산물, 예를 들면, 클로르피리포스(chlorpyrifos), 파라치온(parathion), 말라치온(malathion), 및 다이아지논(diazinon); 및 카바메이트(carbamates)가 포함된다.
- [0007] 현재 화학적 살충제에 대한 유해성에 대한 우려가 점점 높아지고 있다. 예를 들어 1957년부터 DDT의 유해성에 대한 의문이 제기되기 시작하였고, DDT의 반감기는 2년에서 15년으로 잘 분해되지 않으며 체내의 지방 성분에 주로 쌓이고, 땅이나 물에 남아 있던 DDT는 식물에 흡수된 후 인간이 이를 음식을 통해 섭취할 경우에는 암이 유발될 수 있다는 연구결과가 나오면서 1970년대부터 현재까지 대부분의 국가에서 DDT를 농약으로 사용하는 것을 금지하였다.
- [0008] 또한 염소 또는 벤젠을 원료로 하는 BHC의 경우, 원료가 풍부하고 값이 저렴하고 살충력이 강하며, 인축에는 해가 적기 때문에 미국에서 개발 및 합성을 주도하여 전세계적인 관심을 끌었으나, 사용량의 증가와 함께 최근 환경 오염 문제가 대두되면서 서양 각국과 오스트레일리아 등 여러 나라에서는 엄격하게 상기 농약 사용을 제한하고 있다.
- [0009] 이와 같이 그 동안 해충을 방제하기 위하여 유기 화학적 합성 살충제가 널리 사용되고 있으나, 수십 년에 걸친 남용으로 인하여 해충군의 이상격발 또는 저항성 해충의 출현, 인간을 비롯한 비 목적 층에 대한 독성발현 및 환경 계의 오염 등의 많은 부작용을 야기하고 있다. 전 세계적으로 농약의 잔류 독성과 환경오염으로 인하여 여러 가지 문제점이 나타나자 인류의 건강을 지키기 위하여 우선 독성이 강한 유기합성 농약의 사용을 자제하기로 국제적인 합의가 도출되기도 하였다. 이러한 국제 협약에 의하여 전 세계는 2004년에 지난 10년 전에 사용하던

화학합성 유기인계, 유기염소계 살충제의 50%까지 생산이 감축되었고, 2010년까지 다시 유기인계, 유기염소계 살충제의 생산을 50% 감소시키기로 한 국제적 협의에 동의하여 현재 실행 단계에 있다.

[0010] 그러나 독성농약 감축생산 협의 이후, 현재 전 세계적으로 많은 연구진이 환경 친화적 살충제를 개발하려고 많은 노력을 했음에도 불구하고, 이제까지 사용하였던 유기인계, 유기염소계 농약을 대체할 새롭고 안전한 살충제를 개발하지 못하였기 때문에 전 세계적인 농약감축회의 의결내용이 지켜지기 어려운 상황이며, 조만간 안전한 살충제가 개발되어 생산되지 않으면 해충방제용 살충제뿐만 아니라 식량을 비롯한 농산물 생산에 관련된 농업용 살충제의 부족으로 인해 국내외적으로 큰 문제가 대두될 것으로 예상된다.

[0011] 최근에는 화학비료나 농약의 사용을 줄이거나 대체할 수 있으며, 인축에 위해가 적고 작물에 피해를 일으키지 않으며, 토양 생태계와 같은 환경에 대한 피해가 적은 생물학적 방제의 기술이 미생물에 의해 가능하다는 것이 국내외 여러 연구자들에 의해 입증됨에 따라, 화학농약의 폐단을 보완할 수 있는 생물 농약에 대한 관심과 연구가 증가하고 있는 추세이다.

[0012] 이에 따라 최근 사용이 증가 중인 생물학적인 살충제는 토양 미생물인 바실러스 슈린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*, "B.t.")이다. 어떤 바실러스 독소 유전자는 분리되어 서열이 밝혀졌으며, 재조합 DNA에 기초한 산물이 생산되고 사용이 승인되어 왔다. 게다가, 유전공학 기술의 사용과 함께 이러한 독소를 농경 환경에 전달하기 위한 새로운 접근 방법이 개발 중에 있다. 이들은 곤충에 내성을 가지는 독소 유전자에 의해 유전적으로 조작된 식물의 사용 및 독소 전달 수단으로서 안정화된 완전한 미생물 세포의 사용을 포함한다. 이와 같이, 분리된 바실러스 독소 유전자는 상업적으로 가치가 커지고 있다.

[0013] 그러나 성공적인 바실러스 독소의 사용은 곤충에 의한 B.t. 독소에 대한 내성을 유발하게 되었다. 어떤 곤충은 바실러스 독소의 효과가 잘 듣지 않으며, 이러한 곤충의 예에는 바구미 또는 검은색 뿌리 잘라먹는 벌레(black cutworm)와 같은 곤충뿐만 아니라, 이제까지 B.t. δ -엔도톡신에 대해 뚜렷한 주목할 만한 감수성을 보이지 않아 온 대부분 종의 성충이 포함된다. 따라서, B.t. 트랜스유전자 식물 공학에 있어서 내성 관리 방법이 큰 관심의 대상이 되어왔음에도 불구하고, 다양한 곤충을 효과적으로 방제하기 위해서 식물에서 발현될 수 있는 추가적인 유전자를 개발할 필요가 남아있다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 농작물에 대한 해충 방제를 할 수 있는 신규의 살충성 단백질 을 이용한 새로운 생물 농약의 개발을 목표로 신규한 미생물로부터 해충 방제용으로 사용 가능한 유전자의 탐색을 위하여 노력한 결과 신규한 살충성 단백질을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 신규한 생물학적인 살충제로 가치가 인정되는 살충성 단백질 및 이를 암호화하는 유전자, 유전자를 포함하는 발현 벡터, 신규한 살충성 단백질을 제조하는 형질 전환체를 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 살충성 단백질을 포함하는 해충 방제용 조성물을 제공하고 이를 이용한 새로운 생물학적 해충 방제방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명은 서열번호 1 또는 3의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 살충성 단백질을 제공한다.

[0018] 또한 본 서열번호 1또는 3의 아미노산 서열을 코딩 하는 것을 특징으로 하는 살충성 단백질 유전자를 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 신규한 살충성 단백질 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 이를 포함하는 살충성 단백질 제조 형질 전환체를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태로써, 본 발명은 신규한 살충성 단백질을 포함하는 해충 방제용 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 신규한 살충성 단백질을 포함하는 해충 방제용 조성물을 이용한 해충 방제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따르면, 신규의 살충성 포토랍투스 템퍼라타 M1021(포토랍투스 *temperate* M1021, KACC91627P) 유래의

신규한 살충성 단백질을 확보할 수 있으며 이를 이용하여 새로운 생물학적 살충제로써 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도1은 PCR 조건표를 도시한다. (*Annealing temperature(AT): Tcc F1/R1; 50℃, TcdF2/R2; 54℃, TcaC F3/R3; 54℃)

도2는 이상적인 클론의 개수를 계산하기 위한 식을 도시한다.

도3은 Pooling 및 subpooling PCR을 이용한 tcd locus와 tcc locus에 대한 포짓티브 코스미드 클론을 도시한다. (M; size marker(λ /HindIII), A) Pooling PCR 방법에 의한 tcdB2의 포짓티브 클론을 가진 그룹의 스크리닝 B) Subpooling PCR 방법에 의한 tcdB2의 포짓티브 클론의 확보(PtC 49, 64, 267) C) Pooling PCR 방법에 의한 tccC의 포짓티브 클론을 가진 그룹의 스크리닝 D) Subpooling PCR 방법에 의한 tccC의 positive clone의 확보(PtC 28). *PtC; Photorhabdus temperata M1021's cosmid library)

도4는 제한효소 절단에 의한 재조합 코스미드 플라스미드의 분석 결과를 도시한다.

도5는 코스미드 플라스미드 pS49(A)와 pS28(B)에서의 ORF의 구성을 도시한다(A: 적색, B: 황색 C: 녹색)

도6은 포짓티브 코스미드 클론의 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충력 시험 결과를 나타낸다.

도7은 재조합 독소 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다. (M: 분자 단백질 표준, 화살표는 재조합 독소 단백질의 위치를 나타낸다, 6% SDS-PAGE 겔은 Coomassie brilliant blue를 나타낸다. A)TccA, B)TccB, C)TccC, D)TcaC, E)TcdA1-like, F)TcdB2, G)TccC3)

도8은 꿀벌부채명 나방 유충에 대한 살충력 결과를 도시한다.

도9는 갈색 거저리 유충에 대한 살충력 결과를 도시한다.

도10은 꿀벌부채명 나방 유충(A)과 갈색 거저리 유충(B)에 살충성 독소 단백질을 처리시의 모습을 나타낸다. (상단: 처리전, 하단:처리후)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

본 발명에 따르면 서열번호 1 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 살충성 단백질이 제공되며 또한 이들 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 제공된다.

[0025]

본 발명에 있어서, 상기 살충성 단백질은 포토랍투스 템페라타 M1021(수탁번호: KACC91627P)로부터 분리한 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026]

또한 본 발명에 따른 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 살충성 단백질이다. 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산을 코딩하기 위하여 서열번호 2의 염기서열을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027]

또한 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 살충성 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 서열번호 3의 아미노산 서열은 포토랍투스 템페라타 M1021로부터 분리한 TccC3 유사 단백질로, 이하, 이를 본 발명의 TccC3으로 한다. 바람직하게는 서열번호 3의 아미노산을 코딩하기 위하여 서열번호 4의 염기서열을 사용가능하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028]

한편, 본 발명의 또 다른 양태로써 신규의 살충성 단백질 유전자를 포함하는 세포 내 전달을 위한 재조합 벡터를 제공할 수 있다.

[0029]

용어 “재조합”은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0030]

본 발명에 있어서, 상기 유전자는 플라스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 코스미드 벡터, YAC(Yeast Artificial Chromosome) 벡터를 포함한 다양한 벡터들에 도입될 수 있다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는

게 바람직하나 이에 제한되지 않으며 미생물 내에서 목적 유전자의 발현을 위하여 당업계에서 사용되는 벡터를 제한됨 없이 사용할 수 있다.

- [0031] "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업 스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다.
- [0032] 본 발명은 또한, 본 발명의 *TccB* 또는 *TccC3* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 살충성 단백질 발현하는 형질 전환체를 제공한다. 적절한 숙주 세포로 형질 전환을 위하여 선호되는 숙주 세포는 원핵 세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* 균주 DH5a, *E. coli* 균주 JM101, *E. coli* K12 균주 294, *E. coli* 균주 W3110, *E. coli* 균주 X1776, *E. coli* XL-1Blue(Stratagene) 및 *E. coli* B 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539 와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 따라서 본 발명의 명세서 상의 바람직한 일 구현예인 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 제한 없이 이용될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일례로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.
- [0034] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동 가능하게 연결 (operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동 가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [0035] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 실시예로 pET21a(+) 벡터를 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵 세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0037] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질 감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0038] 본 발명은 또한, 본 발명에서 제공하는 신규한 살충성 단백질을 포함하는 해충 방제용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물로 방제될 수 있는 해충의 예에는 바람직하게는 나비 목 해충 또는 딱정벌레목 해충일 수 있으나 이에 제한되지 않고 적용 가능한 모든 일반적인 해충에 사용 가능하다.
- [0039] 본 발명의 나비목 해충은 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 털뿔가시나방(*Alcis angulifera*), 애모무늬잎말이나방(*Adoxophyes orana*), 감나무잎말이나방(*Ptycholoma lecheana*), 밤애기잎말이나방(*Cydia kurokoi*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 은

무늬굴나방(Lyonetia prunifoliella), 복숭아심식나방(Carposina sasakii), 과밤나방(Spodoptera exigua), 목화바둑나방(Diaphania indica), 흑명나방(Cnaphalocrocis medinalis), 이화명나방(Chilo suppressalis), 밧 왕담배나방(Helicoverpa armigera)으로 이루어진 군으로부터 선택가능하며, 딱정벌레목 해충은 갈색거저리(Tenebrio molitor Linnaeus), 오리나무잎벌레(Agelastica coerulea Baly), 사과동근나무좀(Xyleborus apicalis Blandford), 서울나무좀(Scolytus seoulensis), 쌀 바구미(Scolytus seoulensis), 소나무좀Tomicus piniperda), 밤바구미(Culculio sikkimensis)로 이루어진 군으로부터 선택된 해충일 수 있다.

[0040] 또한 본 발명의 신규한 살충성 단백질을 해충 방제용 조성물로 제조함에 있어서 예를 들어, 에스테르 화합물, 포화 탄화수소 및 에스테르 그리고 필요에 따라 기타 살충 활성 성분, 살비 활성 성분, 반발적 활성 성분, 상충제, 향미제 등을 실온 또는 가열 하에 혼합 및 용해함으로써 제조될 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물이 해충 방제를 위해 사용되는 경우, 본 발명의 조성물은 그 자체로 또는 본 발명의 조성물을 포함하는 해충 방제제 제형의 형태로 적용될 수 있는데 제형에는 예를 들어, 오일, 유제, 수-분산가능한 분말, 플로어블제 (flowable agent) (수성 현탁액, 수성 유제 등), 분말, 과립, 에어로솔, 가열된 증기화제 (살충 코일 (insecticide coil), 전기 살충 매트 (matt), 액체-흡수 샤프트 (shaft)를 가진 가열된 살충-증기화제 등), 가열된 훈증제 (자기-연소형 훈증제, 화학-반응형 훈증제, 다공-세라믹판 훈증제 등), 비가열된 증기화제 (수지 증기화제, 함침지 증기화제 등), 분무제 (포깅(fogging) 등), ULV 제, 및 유독성 먹이 (poisonous bait)가 포함된다.

[0042] 본 발명의 해충 방제용 조성물을 이용하여 해충을 방제하는 방법은 본 발명의 조성물 또는 이의 제형을 해충 또는 해충이 서식하는 장소에 적용하여 실행된다. 본 발명의 조성물 또는 이의 제형을 적용하는 방법은 본 발명의 조성물 또는 이의 제형의 형상, 사용 위치 등에 따라 적절하게 선택되어 적용 가능하다.

[0043] 이하, 본 발명을 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0044] [실험 예1] 포토랍두스 템페라타 M1021(KACC91627p)로부터 genomic 코스미드 라이브러리 제작.

[0045] Genomic library를 제작하기 위한 P. temperata M1021의 chromosomal DNA는 Wilson의 방법(Short Protocols in Molecular Biology, Unit 2.4)에 따라 분리하였다. 분리한 total DNA는 Sau3AI (Fermentas, USA)으로 partial digestion 한 후, sucrose gradient를 이용한 초원심 분리에 의하여 DNA 단편의 크기가 평균 35~45kb되게 size fraction 한 다음, BamHI과 XbaI으로 잘려진 cosmid vector SuperCos 1(Stratagene, Germany)에 ligation 하였다. 이것을 Epicentre 사의 MaxPlax™ lambda Packaging Extracts(EPICENTRE, USA)를 이용하여 packaging한 다음 XL1-Blue MRF'로 infection 하여 M1021 균주의 코스미드 라이브러리를 제작하였다. 제작한 코스미드 라이브러리의 클론은 LB배지와 glycerol(최종농도 25%)을 첨가한 다음 각각 200μl 분주하여 deep freezer(-70℃)에 보관하였다.

[0046] [실험 예2] 코스미드 라이브러리로부터의 독소 콤플렉스 관련 클론의 확보 및 분석.

[0047] 2.1 독소 콤플렉스(tc) 관련 프라이머 제작.

[0048] P. temperata M1021 균주의 코스미드 라이브러리로부터 toxin complex(tc)를 가진 코스미드 클론을 확보하기에 앞서, genome sequence가 이미 알려진 Photorhabdus luminescens W14와 TT01 균주의 두 개의 genomic data를 기본으로 하여 표1 과 같이 프라이머를 제작하였다(제노텍, 대전, 한국). tccF1과 tccR1 primer는 toxin complex 중의 tcc locus에 대한 것이며, TcdF2와 TcdR2 프라이머는 tcd locus, TcaC F3와 TcaC R3 primer는 tca locus를 확인하기 위하여 제작하였다. 제작한 프라이머는 M1021의 genomic DNA를 대상으로 PCR(도1)을 수행하여 그 존재 여부를 확인하였으며, 각각의 PCR product는 PCR purification kit(솔젠트, 대전, 한국)로 정제 한 다음, 서열 확인은 솔젠트사(대전, 한국)에 의뢰하였다.

표 1

Oligonucleotide	Relevant sequence (5'→3')
Tcc F1	AARYTGC GTGAAGAGCAY
Tcc R1	GTGCAATAC CCTTACCTGTGC
TcdF2	ARGACCGTTTTTCCGTTATGARTA
TcdR2	ATCACCGGATTGCACCACATC
TcaC F3	AGCGCATTCAACTGCAACAAGATAT
TcaC R3	CTATGGGGTTCTTGAYCGGTATC

[0049]

[0050]

[0051]

[0052]

[0053]

[0054]

[0055]

[0056]

[0057]

[0058]

[0059]

[0060]

2.2 포토랍투스 템페라타 M1021의 게놈 코스미드 클론에서의 tc 포짓티드 클론확보.

포토랍투스 템페라타 M1021 균주의 cosmid library로부터 *tcc*, *tcd*, *tca*를 포함하는 코스미드 클론을 확보하기 위하여 상기와 같은 조건으로 PCR을 실시하였으며(도1 참조), PCR은 pooling과 subpooling 과정을 통하여 단계적으로 실시하였다.

2.3 포짓티브 코스미드 클론의 플라스미드 분석.

PCR 스크리닝 방법에서 확보한 4개의 코스미드 클론(PtC 49, PtC 64, PtC 267, PtC 28)에 대한 플라스미드는 alkaline lysis method(Birnboim and Doly, 1979)를 이용하여 각각 확보하였으며, 각각의 플라스미드 내에 삽입된 DNA의 양쪽 말단을 확인하기 위하여 SuperCos1 내의 T3와 T7 프라이머를 이용하여 시퀀싱을 실시하였다(제노텍, 대전, 한국). 또한 각각의 플라스미드를 *NotI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *KpnI*, *PstI* 과 같은 제한효소를 이용하여 제한효소에 의한 패턴을 분석하였다.

2.4 포짓티브 코스미드 클론의 살충력 조사.

상기에서 확보한 4개의 코스미드 클론의 살충성 시험은 꿀벌부채명나방 유충(4~5령)을 사용하였으며, 각각의 코스미드 클론을 5 ml LB 배지에서 16시간이상 배양한 다음, 원심분리(12,000rpm, 5min)를 통하여 cell pellet 만을 회수하여 멸균생리식염수에 현탁시킨 다음 유충의 혈체강에 microsyringe을 사용하여 3 μl씩 주사하였다. 대조군으로는 멸균된 LB broth와 0.85% NaCl 용액을 동량 주사하여 각각 25℃ 인큐베이터에 보관하면서 시간에 따른 사멸 정도를 조사하였다.

2.5 포짓티브 코스미드 플라스미드의 서열 및 ORF 분석.

tcd locus와 *tcc* locus에 대한 각각의 플라스미드에 대한 유전 정보를 확인하기 위하여 코스미드 플라스미드에 대한 서열 분석을 제노텍(대전, 한국)에 의뢰하였으며, pS49와 pS28에 대한 서열분석은 primer walking과 shotgun 분석을 통하여 실시하였다. 확보한 DNA 서열은 DNA star(DNASTAR, USA)를 이용하여 모두 assembly 하였으며, 완성된 콘티그는 벡터 NTI program(Invitrogen, USA)의 ORF finder와 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 ORF finder를 이용하여 open reading frame(ORF) 구성을 확인하였다. 각각의 ORF는 NCBI의 BLAST를 이용하여 염기서열과 아미노산 서열의 상동성을 비교하였다.

[실험 예3] 독소 유전자 클로닝 및 재조합 발현.]

3.1 독소 단백질 발현 벡터의 제조.

독소 단백질의 발현벡터로는 pET21a(+)를 사용하였으며, 각각의 독소 유전자를 클로닝하기 위해 제작한 프라이머(제노텍, 대전, 한국)는 표 2에 나타내었다. 표 2에서 보는 것과 같이 독소 단백질의 정제를 위하여 C 말단에 stop codon을 제외한 TEV 서열 및 6His-tag서열을 부착한 프라이머(C-ter 6His-tag/TEV 프라이머)와 마지막으로 C-말단에 부착할 제한효소를 위하여 *SalI* 또는 *HindIII* cassette를 제작하여 사용하였다. PCR 반응은 도1과 같이 실시하였으며, 클로닝 과정은 다음과 같다. 개시코돈을 포함하는 각각의 N 프라이머와 정지코돈을 제외한 C-terminal 부분에 TEV 서열을 연결시킨 각각의 C 프라이머로 Pfu-X polymerase(솔젠트, 대전, 한국)를 이용하

여 PCR을 실시한 다음, C-terminal 부분은 6His·tag과 unique restriction enzyme 및 정지 코돈을 넣어주기 위하여 C-ter 6His-tag/TEV 프라이머 와 cassette 프라이머를 순차적으로 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR template로는 각각의 코스미드 플라스미드 및 genomic DNA를, polymerase는 *Pfu-X* polymerase(솔젠트, 대전, 한국)를 이용하였으며, PCR 반응 시 annealing temperature는 50-60°C, extension time은 1kb/min, 이들 조건의 반응 cycle은 30회 반복하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 0.8% 아가로오스 겔(w/v)에서 확인하였으며 PCR 산물은 PCR purification kit(솔젠트, 대전, 한국)를 이용하여 정제하였다. 정제한 각각의 PCR product와 pET21a(+)
를 PCR product 말단에 부착한 각각의 특정 제한효소로 절단한 다음 T4 DNA ligase(Fermentas, Canada)를 이용하여 연결한 후, *Escherichia coli* DH5 α로 형질전환시켜 재조합 플라스미드를 확보하였다. 확보한 재조합 플라스미드는 sequencing(T3과 T7 프라이머)을 통하여 확인하였다.

표 2

Gene	Oligonucleotide	Relevant sequence (5'→3')
tcdB2	TcdB2-N	GCGGGATCCATGCAAAATTCACAAGAA
	TcdB2-C	CTGAAAGTACAGGTTCTCCATTTTCACCTCAGCAGC
	C-ter 6His-tag/TEV	CGAATTCATTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCCTGAAAGTACAGGTTCTC
	SalI cassette	ACGCGTCGACCGAATTCATTAGTGGTGG
tccC3	TccC3-N	CCTGCAGCATATGATGAAAACTTTGACCCC
	TccC3-C	CTGAAAGTACAGGTTCTCGCTATATCTATGTTTAGG
	C-ter 6His-tag/TEV	CGAATTCATTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCCTGAAAGTACAGGTTCTC
	HindIII cassette	CGCAAGCTTCGAATTCATTAGTGGTGG
tccA	TccA-N	GGAATTCGCTAGCATGAATCAACTCGCCAGT
	TccB-C	CTGAAAGTACAGGTTCTCATGACTGCCCTTGACATG
	C-ter 6His-tag/TEV	CGAATTCATTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCCTGAAAGTACAGGTTCTC
tccB	TccB-N	CCTGCAGCATATGATGTTATCGACAATGGAA
	TccB-C	CTGAAAGTACAGGTTCTCAATAAGTGTCTTCTTGAC
	C-ter 6His-tag/TEV	CGAATTCATTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCCTGAAAGTACAGGTTCTC
tccC	TccC-N	CCTGCAGCATATGAGTACGTCGATACCA
	TccC-C	CTGAAAGTACAGGTTCTCCAAGAAATAACCCGTCG
	C-ter 6His-tag/TEV	CGAATTCATTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCCTGAAAGTACAGGTTCTC
	HindIII cassette	CGCAAGCTTCGAATTCATTAGTGGTGG
tcaC	TcaC-N	GGAATTCGCTAGCATGCAGGATTCATCAGAA
	TcaC-C	CTGAAAGTACAGGTTCTCTGGGGTTCTTGACGCGGT
	C-ter 6His-tag/TEV	CGAATTCATTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCCTGAAAGTACAGGTTCTC

[0061]

[0062]

3.2 재조합 독소 단백질의 발현.

[0063]

상기에서 확보한 재조합 플라스미드는 독소 단백질의 발현을 위하여 *E. coli* BL21(DE3)에 각각 형질전환하였다. 형질전환한 대장균은 3 ml LB broth(Ap^r, 100µg/ml)에서 밤새 키운 다음 100 ml LB broth에 1% 되게 접종하여 37°C의 진탕배양기(220rpm)에서 OD₆₀₀값이 0.8되게 키운 후 IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 최종 1mM 되게 첨가 한 후 시간별로 회수하여 발현정도를 관찰하였다. 대조구로는 *E. coli* BL21(DE3)/pET21a(+)
를 사용하였다. 재조합단백질의 발현은 SDS-PAGE를 통하여 확인하였으며 시간별로 회수한 배양액을 원심 리하여 상등액을 제거하고 난 다음 cell pellet에 1×Laemmli loading dye를 넣어서 현탁시킨 후 99°C에서 5분간 가열하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액은 원심분리(12,000rpm, 10min, 4°C)하여 상등액을 SDS-PAGE를 이용하여 재조합 단백질의 발현을 확인하였다.

[0064]

재조합 독소 단백질의 활성형 발현 양상을 확인하기 위한 실험에는 배양온도, IPTG 첨가농도 및 배지조성을 변화시켜 확인하였으며 IPTG 첨가 농도는 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 배양온도는 15°C, 25°C, 37°C, 배지는 LB, 2×YT, TB(Terrific broth), SB(Super broth), M9 Minimal 배지(표 3)를 사용하여 실험하였다.

표 3

[0065]

	LB	2×YT	TB	SB	M9
배지조성	Tryptone 10 g Yeast extract 5 g NaCl 10 g per 1 liter	Tryptone 12 g Yeast extract 10 g NaCl 5 g per 1 liter	Tryptone 12 g Yeast extract 24 g K ₂ HPO ₄ 12.54 g KH ₂ PO ₄ 2.31 g Glycerol 4 ml per 1 liter	Tryptone 32 g Yeast extract 20 g NaCl 5 g per 1 liter	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 6 g KH ₂ PO ₄ 3 g NaCl 0.5 g NH ₄ Cl 1 g 20% glucose 10 ml 0.1M CaCl ₂ 1 ml 1M MgSO ₄ 1 ml per 1 liter

[0066]

[실험 예4] 재조합 단백질을 가진 대장균을 이용한 살충성 검사.

[0067]

꿀벌부채명나방 유충에 대한 독성 검사는 재조합 단백질의 발현이 최대인 시점의 배양액 2ml을 원심 리하여 상층액을 제거하고 멸균된 0.85% NaCl 용액으로 cell pellet을 두 번 세척한 다음, 배양액의 10배 농도로 현탁시켜 사용하였다. 세포 현탁액은 microsyringe(Hamilton, USA)를 이용하여 3μl씩 꿀벌부채명나방 유충의 혈체강 속으로 주사하였으며, 각각 10마리의 유충을 사용하였다. 주사한 유충은 항온실(25℃, 습도 50%)에 보관하면서 24시간 단위로 변화양상을 관찰하였다. 또한 세포 현탁액내의 cell 농도를 확인하기 위하여 엠펬실린에 포함된 LB agar plate에 도말하여 항온배양기(37℃)에서 배양하였다. 대조구로는 멸균한 0.85% NaCl 용액과 *E. coli* BL21(DE3)/pET21a(+)를 상기의 방법과 동일하게 처리하여 사용하였다.

[0068]

[실험 예5] 결과.

[0069]

5.1. 포토랍투스 템페라타 M1021균주의 코스미드 라이브러리.

[0070]

포토랍투스 템페라타M1021 균주의 genomic 코스미드 라이브러리를 제작한 결과 7.14×10^5 코스미드 클론을 확보하였다. 현재 보고된 *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01과 *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* ATCC43949의 전체 게놈크기가 각각 5.69Mb와 5.06Mb 인 점을 감안할 때 같은 속(family)에 속하는 포토랍투스 템페라타 M1021 균주의 게놈 크기도 5~6Mb 사이 일 것으로 예상된다. 포토랍투스 템페라타M1021 균주의 전체 게놈 크기가 약 5.6Mb이라고 가정한다면, 또한 코스미드 벡터 내에 삽입된 M1021의 genomic DNA fragment 크기가 40kb일 경우 전체 게놈을 99.99% 포함하는데 필요한 이상적인 클론의 개수(N) 도 2의 식에 대입하면 1.28×10^3 클론으로 나타난다. 따라서 본 실험에서 확보한 7.14×10^5 코스미드 클론의 수는 포토랍투스 템페라타M1021 균주의 전체 게놈을 99.99%이상 포함하는 것으로 나타났다. 코스미드 라이브러리로부터 일부 코스미드 클론의 플라스미드를 분리하여 제한효소(restriction enzyme)로 절단한 결과, 삽입되어 있는 DNA 절편의 크기는 약 35-45kb로 나타났고 제한효소에 의한 양상도 서로 다른 것으로 나타났다.

[0071]

5.2 코스미드 라이브러리로부터 독소 콤플렉스 관련 클론의 분석결과.

[0072]

5.2.1 tc 포깃티브 클론의 확보.

[0073]

포토랍투스 템페라타M1021의 genomic DNA를 대상으로 표1의 tcc, Tcd와 Tca pair 프라이머를 이용하여 PCR을 한 결과 각각의 PCR product를 확보하였으며, 서열 분석을 통하여 그 서열을 확인한 결과, 모두 다 살충성 독소 콤플렉스 단백질로 나타났다.

표 4

[0074]

Primer sets	PCR amplicon (kb)	% nucleotide homology	Compared strain(protein)
tcc F1 / tcc R1	0.84	87	<i>P. luminescens</i> strain TT01 (TccC)
TcdF2 / TcdR2	0.77	84	<i>P. luminescens</i> strain TT01 (TcdF2)

TcaC F3 / TcaC R3	1.64	82/83	<i>P. luminescens</i> TT01 <i>P. asymbiotica</i> ATCC43949 (TcaC)
-------------------	------	-------	--

[0075] 5.2.2 플라스미드 분석 결과.

[0076] 상기의 플라스미드에 대한 유전 정보를 확인하기 위하여 전체 시퀀싱 작업은 유전체분석전문기관인 제노텍 (Genotech, Daejeon, Korea)에 의뢰하였으며, pS49와 pS28에 대한 전체 시퀀싱은 primer walking과 shot gun 분석을 통하여 실시하였다. pS49와 pS28내에 삽입된 DNA의 서열은 상기와 같은 서열분석을 통하여 모두 확보하였으며, 확보한 DNA 서열은 DNA star를 이용하여 모두 assembly 하였으며, 완성된 콘티그는 Vector NTI program (Invitrogen, USA)의 ORF finder와 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 ORF finder를 이용하여 open reading frame (ORF) 구성을 확인하였다. 각각의 ORF는 NCBI의 BLAST를 이용하여 염기 서열과 아미노산 서열의 상동성을 비교하였다. pS49와 pS28내에 있는 ORF의 구성은 도. 5과 같으며, 이들 각각 ORF에 대한 상동성과 예상되는 유전자 및 기능은 표 5에 나타내었다. pS49내에 있는 ORFs의 구성을 기존에 보고된 *P. luminescens* W14 및 TT01 균주와 *P. asymbiotica* ATCC43949의 tcd island와 비교해 볼 때, tcdA2, tcdB2 및 tccC3 유전자들이 동일한 방향으로 전사되어 있었으며 또한 tcdB2와 tccC3 사이에 phage holin protein을 암호화하는 tchA도 존재하는 것으로 나타났다. pS49내의 서열에서는 tcdA-like, tcdB-like, tccC-like 유전자들의 또 다른 copies는 확인되지 않았으며, tcd locus의 “core” region (tcdA1-like, tcdA2, tcdB2와 tccC3)만이 확인되었다. 그러나 tcdA1-like gene의 경우 기존에 보고된 tcdA-like gene과 비교하여 크기가 상당히 작은 것으로 나타났으며, tcdA1-like 유전자의 upstream 방향, 즉 pS49의 insert 말단부위에는 hemolysins-related protein을 암호화하는 유전자의 일부가 포함되어있는 것으로 나타났다. 포토람투스 템퍼라타M1021의 tcd island의 구성은 독소유전자의 copy 수가 많은 *P. luminescens* TT01의 것보다는 독소유전자의 copy 수가 적거나 하나인 *P. asymbiotica* ATCC43949의 것과 유사하였으며, 독소 단백질의 하류 방향으로는 multidrug transporter proteins와 polyphosphatase protein 등이 존재하는 것으로 확인되었다. 기존에 보고된 살충성 단백질과의 아미노산 상동성은 TcdA2의 경우 66%, TcdB2는 81%, TccC3는 57%로 나타났으며(표 5), *P. luminescens* 및 *P. asymbiotica*의 살충성 단백질과는 상당한 차이를 나타내었다. 또한 독소단백질의 구성요소인 A, B, C component의 경우 A component는 tcdA2, B component는 tcdB2, C component는 tccC3로 3개의 구성요소를 모두 가지는 것으로 나타났다(도 7 참조).

[0077] tcc locus를 포함하는 pS28의 경우는 tccA, tccB와 tccC를 모두 포함하였으며, 독소유전자의 하류 부분에는 Type VI secretion system (T6SS)을 가지는 것으로 나타났다. Type VI secretion system은 Proteobacteria에 속하는 미생물의 병원성을 유발하는 제6형 유형 분비체계로, 이러한 T6SS는 Hcp와 VgrG와 같은 여러 개의 단백질로 구성되어있는 것으로 알려져 있다. 이러한 유형의 분비체계는 병원성 미생물의 독소단백질 및 여러 가지의 virulence factors 등과 관련이 매우 높은 것으로 알려져 있으며, 포토람투스 템퍼라타M1021 균주의 tcc locus에서도 이와 같은 형태의 분비체계가 있는 것으로 나타났다(도 5). 살충성 단백질과의 아미노산 상동성은 TccA의 경우 89%, TccB와 TccC는 90%의 상동성을 나타내었으며, A component인 tccB를 가지는 것으로 나타났다(표 5).

표 5

[0078]

No.	Predicted product	Homology (%)	Organism
pS49			
1	insecticidal toxin, TcdA like	73	<i>P. asymbiotica</i> ATCC43949
2	insecticidal toxin, TcdA2	66	<i>P. luminescens</i> TT01
3	insecticidal toxin, TcdB2	81	<i>P. luminescens</i> TT01
4	insecticidal toxin, TccC3(서열번호 3)	70	<i>P. luminescens</i> TT01
5	peptide synthetase	87	<i>P. luminescens</i> TT01
6	thiohemplate mechanism natural product synthetase	58	<i>Erwinia amylovora</i> ATCC BAA-2158
7	polyketide synthase type I	46	<i>E. amylovora</i> ATCC49946
8	gramicidin S synthetase 2	45	<i>E. amylovora</i> ATCC BAA-2158
9	polyketide synthase	38	<i>E. amylovora</i> ATCC BAA-2158
10	peptide synthetase	86	<i>P. luminescens</i> TT01
11	hypothetical protein	87	<i>P. luminescens</i> TT01

12	5'-nucleotidase family protein	86	<i>P. asymbiotica</i> ATCC43949
pS28			
1	insecticidal toxin, TccA	89	<i>P. luminescens</i> TT01
2	insecticidal toxin, TccB	90	<i>P. luminescens</i> TT01
3	insecticidal toxin, TccC	90	<i>P. luminescens</i> TT01

[0079] 5.2.3 살충력 실험결과.

[0080] 상기에서 확보한 포깃티브 코스미드 클론에 대한 살충력 조사 결과는 다음과 같다(도 6). 도 6에서와 같이 PtC28 클론의 살충력이 가장 높았으며 주사 후 7일 때에 100% 사멸하는 것으로 나타났다. PtC49의 경우 주사 후 6일 때에 50%의 살충력을 나타내었고 PtC 64와 267 클론은 주사 후 7일 때에 살충력이 50%에 도달하였다. 본 실험에서 대조군으로 사용한 멸균 생리식염수(0.85% NaCl)와 코스미드 벡터인 SuperCos1만을 가진 XL-1 Blue MR F' 을 주사한 꿀벌부채명나방 유충에서는 외관상 변화가 전혀 없는 것으로 나타났다.

[0081] 5.3 독소 유전자 클로닝 및 재조합 발현 결과.

[0082] 현재까지 확보한 9종의 독소 콤플렉스(toxin complex, *tc*) 관련 유전자를 각각 대장균 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현시킨 결과, TcdA-like를 제외한 대부분의 독소단백질들은 isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)에 의해서만 유도되었으며, 예상되는 단백질의 크기는 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다(도 7). 대부분의 독소 단백질이 효과적으로 과발현되었으며 발현 시 온도, IPTG 첨가농도 및 배지조건을 변화시켜 이에 따른 발현 양상을 관찰하였다. 발현온도는 TccB와 TcdB2의 경우 30°C에서, TccC3의 경우는 37°C에서 가장 적합한 것으로 나타났다. IPTG 농도는 0.5~1mM로 나타났으며, 배지의 경우 SB(Super broth)로 나타났다.

[0083] 5.4 살충성 검사

[0084] 각각의 독소 단백질이 가장 많이 발현된 상태의 재조합 대장균을 꿀벌부채명나방의 유충에게 주사한 경우 도 9에서와 같이 TccB가 발현된 대장균에서 가장 높은 살충력을 나타내었으며 주사 후 5일 때에 85%의 유충이 사멸하는 것으로 나타났다. 또한 본 발명의 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 단백질인 TccC3의 경우, 주사 후 7일 때에 62.5%, TccC는 주사 후 6일 때에 57.5%의 살충력을 나타내었으나, 그 이외의 독소 단백질은 살충력이 20% 미만으로 매우 낮게 나타났다(도 8). 갈색거저리 유충의 경우에도 TccB가 발현된 대장균에서 가장 높은 살충력을 나타내었으며 주사 후 5일 때에 유충이 모두 사멸하였다. 또한 주사농도를 50% 줄인 경우에도 80%의 높은 살충력을 나타내었다. 본 발명의 TccC3의 경우는 57.5%, TcdB2는 35%의 살충력을 나타내었다(도 9). 유충에게 주사한 cell의 양은 TccB의 경우 2.7×10^4 cells, TccC3은 1.4×10^5 cells, TcdB2는 3.7×10^4 cells를 나타내었으며 대조구인 pET21a(+)를 함유하는 대장균의 경우는 3.6×10^4 cells를 나타내었다. 멸균된 0.85% NaCl 이나 *E. coli* BL21(DE3)/pET21a(+)를 주사한 꿀벌부채명나방 유충의 경우, 주사 7일 후에는 유충의 90%가 번데기(pupae)로 성장하는 것으로 보아 정상적인 발달 단계가 진행되는 것으로 나타났다. 그러나 살충력을 나타낸 4종의 독소 단백질 이외의 재조합 대장균의 경우에는 살충성을 나타내지는 않았으나 번데기로의 진행이 일어나지 않는 것으로 보아 직접적인 살충력보다는 유충의 발달저해에 관여할 것으로 여겨진다. 두 종류의 유충에게 높은 살충력을 나타낸 *E. coli* BL21(DE3)/pETccB를 주사한 경우 도 10에서와 같이 멜라닌화되면서 죽는 것으로 나타났다.

수탁번호

[0085]

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91627P

수탁일자 : 20110104

도면

도면1

Temperature cycle	Reaction mixture
95°C 2m	Genomic DNA(50ng/μl) 1 μl
95°C 30s	F-primer(10pmole) 1 μl
AT* 30s	R-primer(10pmole) 1 μl
72°C 1m	10mM dNTP 1 μl
72°C 5m	10xPfu-X buffer 5 μl
4°C	Pfu-X(2.5U/μl) 0.25 μl
	dH ₂ O 40.75 μl

도면2

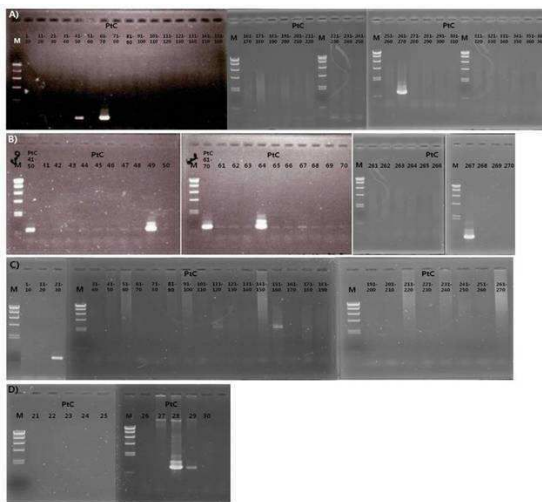
$$N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$$

N=number of clones required to represent an ideal library

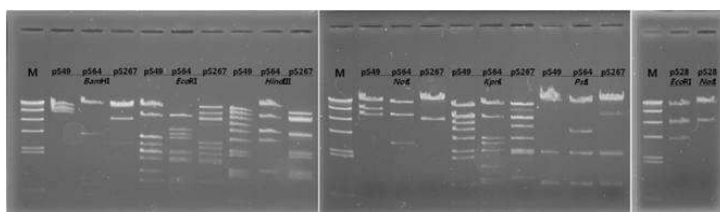
P=probability

F=size of insert/genome size

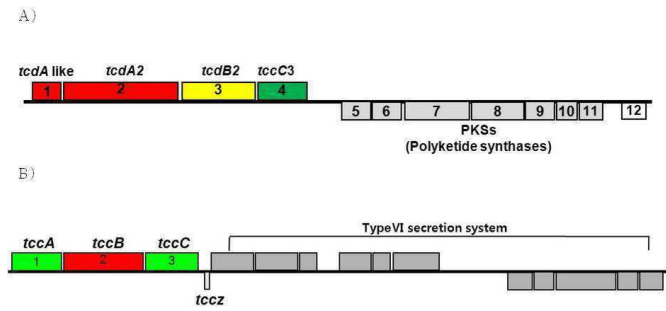
도면3



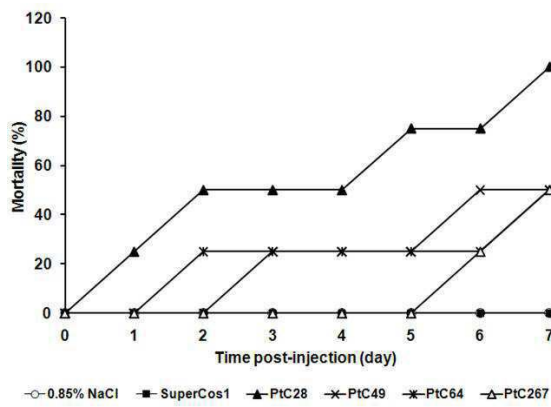
도면4



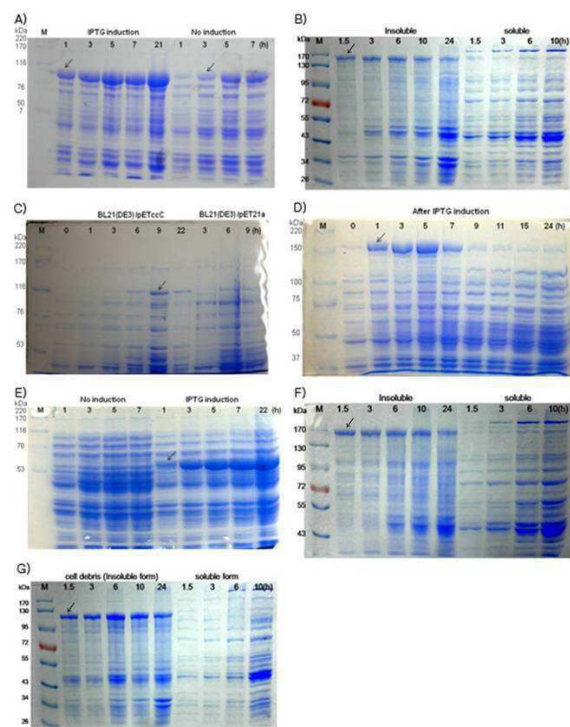
도면5



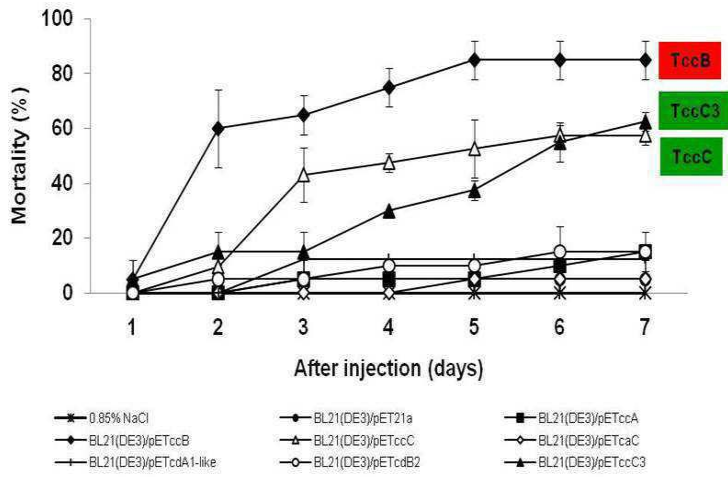
도면6



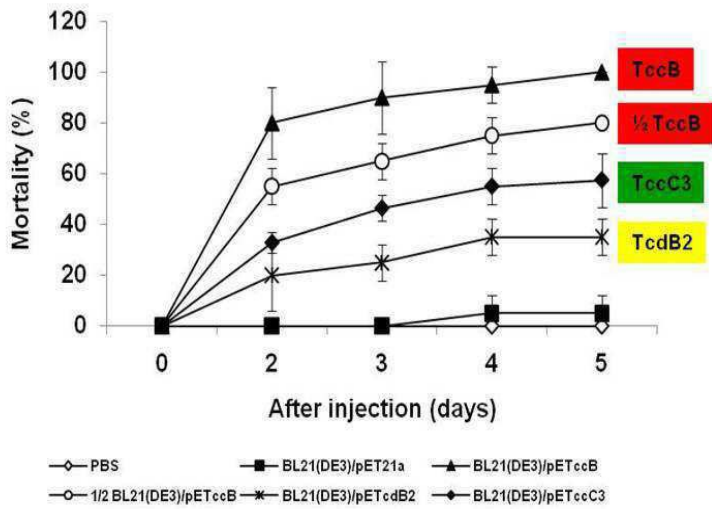
도면7



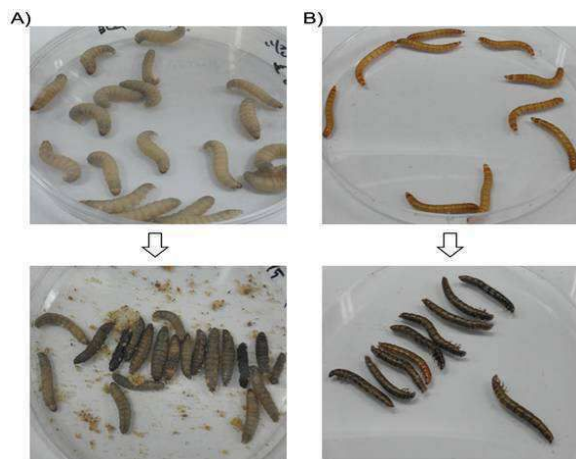
도면8



도면9



도면10



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)