

이차원전기영동법을 이용한 길항세균 *Bacillus licheniformis* DM3와 이의 항진균 활성 결여 돌연변이균주간 단백질 비교 분석

이영근* · 김재성 · 정혜영 · 장유신 · 장병일

한국원자력연구소, 방사선이용연구부
(2003년 6월 11일 접수, 2003년 8월 10일 수리)

Two-Dimensional Electrophoresis Analysis of Proteins between *Bacillus licheniformis* DM3 and Its Antifungal Activity Deficient Mutant

Young-Keun Lee*, Jae-Sung Kim, Hye-Young Chung, Yu-Sin Jang and Byung-IL Jang (Radiation Application Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea)

ABSTRACT : In the course of screening for antifungal agents, a bacterial strain, DM3 was isolated from a mud sample collected at Daechon in Chungnam province and identified as *Bacillus licheniformis* based on API 50CHB test. It has antifungal activity against 12 plant pathogenic fungi in paper disc assay. At the 95% lethal dose of gamma radiation (^{60}Co , 10 kGy, $D_{10}=2.32$ kGy), the antifungal activity deficient mutant (mDM3) against *Colletotrichum gloeosporioides* was induced. From 2-D electrophoresis analysis, serine hydroxymethyltransferase(45.0 kDa), hypothetical protein(40.7 kDa), NifU protein homolog(15.4 kDa), and resolvase(12.5 kDa) homologous proteins were detected only in *B. licheniformis* DM3. Lysozyme(18.1 kDa) and alkyl hydroperoxide reductase(15.6 kDa) homologous proteins were expressed uniquely in *B. licheniformis* mDM3. Further studies are needed to reveal that these proteins from *B. licheniformis* DM3 could be closely related to the antifungal activity against plant pathogenic fungi.

Key words: antifungal protein, *Bacillus licheniformis* DM3, gamma radiation, mutant, 2-DE.

서 론

식물병을 치료하거나 예방하기 위한 화학합성농약의 오염은 토양오염의 원인이 되어 문제가 되고 있다. 식물병원성 진균에 의해 발생하는 식물병을 방제하기 위하여 세균을 이용한 생물학적 방제에 관한 연구가 많이 되었는데, 이는 세균이 곰팡이보다 항진균 활성 기작의 유전학적, 생화학적 분석이 용이하고 대사산물의 대량생산이 손쉬운 점 때문이다¹⁾.

*Bacillus*속의 균은 일반적으로 높은 온도 내성, 액체 배양 시 빠른 성장과 포자 형성 등의 요인으로 인하여 대량생산이 용이하기 때문에 많은 연구가 되고 있다. 현재 *Bacillus*속의 균은 토양전염성 식물병 방제용 종자처리제나 수확 후, 야채 등의 부패방지용으로 개발되어 사용되고 있다^{2,3)}. *B. licheniformis*는 미국 식품의약국(FDA)에 의해 인체 및 환경에 무해한 미생

물로 인정받고 있으며 다양한 식물병원균에 대한 억제효과가 있다고 알려져 있다^{4,6)}. 따라서 안전하고 환경 친화적인 농산물 생산에 기여할 수 있는 유익한 미생물이라 할 수 있다. *B. licheniformis*로부터 항진균 및 항세균 활성을 나타내는 펩타이드인 lichenysin 합성 효소가 발견된 바 있다⁷⁾. 이처럼 직접 항진균 활성을 보이는 항진균 물질과 이의 합성 유전자와 효소의 연구는 매우 잘 이루어져 있으나 이의 발현을 조절하는 유전자나 효소 등 직, 간접적으로 작용하는 대사과정에 관한 연구는 미비한 상태이다. 이러한 연구를 위해서는 항진균 활성이 결여된 돌연변이체가 매우 유용하며, 세포 내 다수의 단백질 발현을 동시에 비교하고 이를 분리, 분석하여 동정할 수 있는 연구 방법이 사용되어야 한다.

감마선을 이용하여 균주의 돌연변이를 유도하는 방법은 인위적인 유전자 조작이 아닌 물리적인 방법으로서 진화가 가속화된 경우의 일부라고 평가가 가능하므로⁸⁾ 환경적응성이 높고 생태계 교란의 위험성이 미미할 것으로 추정되며 UV나 X-ray의 특성과는 달리 감마선은 투과력이 크고 선량의 강도

*연락처:

Tel: +82-42-868-8056 Fax: +82-42-862-6980
E-mail: yklee@kaeri.re.kr

가 커 조작의 시행횟수를 최대한 줄일 수 있어 시간과 경제적 효과 또한 뛰어나다. 생물은 감마선과 같은 이온화방사선에 노출되면 세포 내 DNA에서 다양한 돌연변이가 야기된다^{9,10}. 1927년 이온화 방사선이 돌연변이원으로 알려진 이래¹¹ DNA 손상에 의한 돌연변이 기작의 일부가 알려졌으며, 균주 개량 및 돌연변이체 유도에 유용한 물리적 방법으로 보고되었다¹².

이차원 전기영동(two-dimensional gel electrophoresis/2-DE)은¹³ 재현성있게 고해상력으로 단백질을 분리하는 매우 이상적인 방법이다. 2-DE를 통하여 분리된 단백질들은 매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화 비행시간형 질량분석법(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry/MALDI-TOF MS)을 이용하여 동정과 특성 파악이 가능하다¹⁴.

본 연구에서는 항진균 활성 관련 대사과정에 연관된 단백질의 연구를 위하여 항진균 활성을 가지는 *B. licheniformis* DM3을 새롭게 분리, 동정하고 방사선조사에 의해 항진균 활성결핍 돌연변이체 *B. licheniformis* mDM3를 유도하였다. 야생형 균주와 돌연변이 균주의 단백질 발현 차이를 이차원 전기영동으로 확인하고 차이는 단백질들을 MALDI-TOF MS로 분석하여 항진균 활성과의 연관성에 대해 논하였다.

재료 및 방법

항진균 세균의 분리 및 동정

2002년 5월 충청남도 대천 해변에서 채취한 진흙 1 g을 0.8% 식염수 10 mL에 넣고 30분간 교반한 후, 상등액 100 μ L를 Nutrient Agar배지(NA, Difco, USA)에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 분리된 후보균주들은 *Candida albicans* (KCTC 7270)를 대상으로 1차적으로 항진균 활성을 검정하였다. 12종의 식물병원성 진균을 agar plug 상태로 PDA (potato dextrose agar, Difco, USA)배지에 접종하고 이로부터 20 mm 거리에 후보균주가 접종된 paper disc를 위치시켜 25°C에서 배양하며 항진균 활성을 조사하였다. 식물병원성 진균 12종은 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터(*Alternaria alternata* KACC 40020, *Alternaria solani* KACC 40570, *Botrytis cinerea* KACC 40574, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Colletotrichum higginsianum* KACC 40193, *Fusarium oxysporum* KACC 40239, *Phytophthora capsici* KACC 40475, *Phythium ultimum* KACC 40705, *Rhizoctonia solani* KACC 40124, *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40923)와 농업과학기술원(*Botryosphaeria dothidea*와 *Mycosphaerella melonis*)으로부터 분양 받았다. 분리된 항진균 세균은 API 50CHB kit (bio-Merieux, France) 분석으로 동정하였다.

감마선 조사를 이용한 항진균 활성 결핍 돌연변이체 유기

전배양된 균주 50 μ L를 Nutrient Broth배지(NB, Difco, USA) 15 mL에 접종하여 37°C에서 overnight 배양한 후, 1.5 mL Eppendorf tube에 1 mL씩 분주하여 95%의 치사율을 보

이는 방사선량(10 kGy, ⁶⁰Co irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd., dose rate : 920 Gy/hr)에서 조사한 후 *C. gloeosporioides*에 대한 항진균 활성 결핍 돌연변이체를 분리하였다¹². 조사선량률은 Fricke dosimetry로 측정하였다¹⁵.

세포 내 단백질의 이차원 전기영동

500 mL NB배지에 12시간 액체배양 후, 20분간 원심분리하여(1,609 \times g) 균체와 배양액을 분리하였다(Centrifuge MF-80, Hanil Science Industrial Co.). 냉동된 막자사발에 균체를 넣고 액체질소를 부어 막자로 cell을 파쇄하였다. 50 mL centrifuge tube에 옮기고 단백질 추출 용액(0.5 M Tris-HCl pH 8.3, 2% Nonidet P-40, 20 mM MgCl₂, 2% 2-mercaptoethanol, 1% polyvinyl polypyrrolidone(PVPP))를 12.5 mL 첨가한 후 4°C에 10분간 방치하였다. 20분간 원심분리하여(1,609 \times g) 상등액에 acetone을 첨가하여(1:4, v/v) -20°C에 10분간 침전시킨 후 다시 원심분리하여 단백질을 회수하였다¹⁶. 세포로부터 추출한 단백질 200 μ g을 sample lysis buffer(9.5 M urea, 24% NP-40, 3% ampholyte, 0.12 M DTT)에 녹여 1차 전기영동으로 IEF(isoelectric focusing)를 실시하였다. IEF gel은 9.5 M urea, 2% NP-40, 4.5% acrylamide, 2.5% ampholyte(pH 3~10 : pH 4~6 : pH 6~8 = 1.5 : 2.5 : 3)로 만들었다. Cathode buffer는 20 mM NaOH, anode buffer는 10 mM H₃PO₄로 하여 250 V 30분, 300 V 30분, 400 V 30분간 전기영동을 한 후 600 V 10시간, 800 V 5시간, 1,000 V 2시간 30분 동안 전기영동하였다¹⁶. IEF gel을 5 mL equilibration buffer(2.5% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.125 M Tris-HCl(pH 6.8))에 넣어 30분간 교반한 후 2-DE로 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였다¹⁷. Separation gel은 13%, stacking gel은 4%의 acrylamide를 이용하였고, 전개 완충용액은 25 mM Tris-HCl(pH 8.3), 195 mM glycine 및 0.1% SDS(Bio-Rad, Co.)을 이용하여 70 V 18시간 전개하였다¹³. 이차원전기영동 후 고정하고(50% methanol, 10% acetic acid) 염색하였다(0.2% silver nitrate)¹⁸.

MALDI-TOF MS와 data분석

Silver staining된 gel에서 차이는 spot를 회수하여 한국 기초과학연구원에 의뢰하여 MALDI-TOF(Applied Biosystems 4700 proteomics analyzer, USA)으로 분석하였다¹⁹. 회수된 spot들은 trypsin으로 digestion하였고 시료는 0.5% trifluoroacetic acid(TFA), matrix에는 50% acetonitrile/0.5% TFA가 사용되었다. Matrix 용출용액에는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid가 사용되었다. MALDI-TOF 질량 스펙트럼은 MS reflector positive ion mode에서 분석되었다. MASCOT(<http://www.matrixscience.com/>)을 이용하여 단백질을 동정하였다²⁰.

결과 및 고찰

항진균 세균 동정

대천 진흙으로부터 분리한 세균 중 1차적으로 *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 갖는 DM3균주를 분리하였다. DM3균주는 API 50CHB kit를 이용한 생화학적 동정 분석을 통하여 *Bacillus licheniformis*(71.0% 상동)로 동정되었다. 또한 항진균 세균의 항진균 활성 스펙트럼을 조사한 결과, 12종의 식물병원성 진균에 항진균 활성을 나타냈다(Table 1).

감마선(⁶⁰Co)을 이용한 항진균 활성 결핍 돌연변이체 유기

B. licheniformis DM3의 D₁₀값이 2.32 kGy로 나타나 *B. subtilis*를 비롯한 다른 *Bacillus*속의 균과 비교하였을 때 방사선에 대해 낮은 감수성을 보였다¹¹⁾. 일반적으로 최종 생존률이 10%가 되는 선량을 D₁₀ value라 하는데 이는 방사선 감수성의 지표가 된다¹⁵⁾. D₉₅의 방사선량으로 조사하여 항진균 활성의 변화를 갖는 돌연변이체를 유도하였고(Fig. 1) *B. licheniformis* DM3의 돌연변이체는 *Phytophthora capsici*를 제외한 11종의 식

물병원성 진균에 대해서 항진균 활성을 상실하였다(Table 1). 방사선 조사에 의한 다양한 돌연변이체 유도가 보고되었다²¹⁾. 이러한 연구 결과는 방사선을 이용함으로써 미생물의 기능을 변화시켜 활용가치가 뛰어난 돌연변이체 유도가 가능함을 시사한다.

이차원 전기영동 및 MALDI-TOF MS에 의한 항진균 활성 관련 단백질 비교 연구

B. licheniformis DM3와 항진균 활성 결핍 돌연변이 *B. licheniformis* mDM3의 세포내 단백질의 변화양상을 이차원 전

Table 1. Antifungal spectra of *Bacillus licheniformis* DM3 and its mutant mDM3 against plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Antifungal activity	
	DM3	mDM3
<i>Alternaria alternata</i>	+	-
<i>Alternaria solani</i>	+	-
<i>Botrytis cinerea</i>	+	-
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	+	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+	-
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	-
<i>Mycosphaerella melonis</i>	+	-
<i>Phytophthora capsici</i>	+	+
<i>Pythium ultimum</i>	+	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+	-

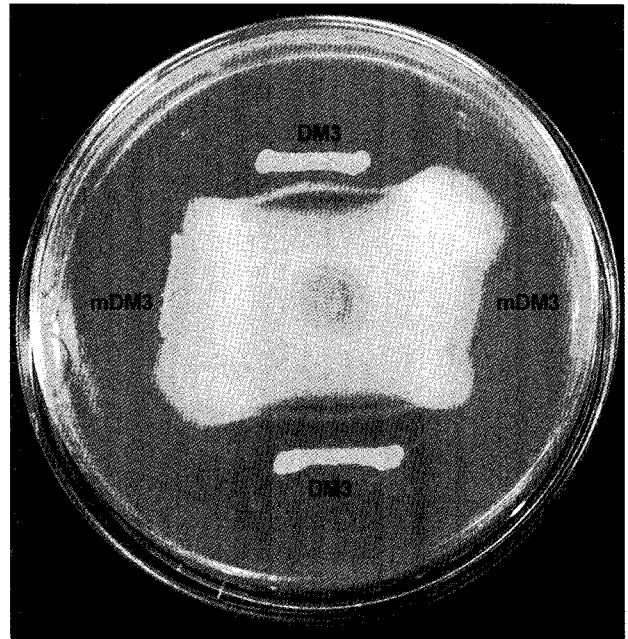


Fig. 1. Antifungal activity of radiation induced mutant (*Bacillus licheniformis* DM3) against *Colletotrichum gloeosporioides*. DM3; *B. licheniformis* DM3; mDM3, *B. licheniformis* mDM3.

Table 2. Proteins identified from 2-DE of *Bacillus licheniformis* DM3 and its antifungal activity deficient mDM3 by MALDI-TOF MS

Spot No. ^{a)}	2-DE		Mascot database search results				
	pI	MW (kDa)	Accession ^{b)}	Mass	Homologous protein	Score ^{c)}	Coverage (%) ^{d)}
1	6.11	45.0	gi16080743	45.461	Serine hydroxymethyltransferase(<i>Bacillus subtilis</i>)	126	36.87
2	4.75	40.7	gi23058322	35.896	Hypothetical protein(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	63	26.09
3	5.37	15.4	gi16080320	16.156	NifU protein homolog(<i>Bacillus subtilis</i>)	83	57.14
4	5.66	12.5	gi1065027	24.724	Resolvase(<i>Bacillus subtilis</i>)	34	20.28
5	4.76	18.1	gi16078850	14.281	Lysozyme(<i>Gallus gallus</i>)	93	74.42
6	4.72	15.6	gi16081061	20.614	Alkyl hydroperoxide reductase(<i>Bacillus subtilis</i>)	69	70.30
7	4.80	15.6	gi16081061	20.614	Alkyl hydroperoxide reductase(<i>Bacillus subtilis</i>)	51	45.46

a) The numbering corresponding to the 2-DE image in Fig. 2.

b) Accession number in NCBI.

c) Score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 50 are significant ($p < 0.05$).

d) Percentage of the protein sequence covered by the matched peptides.

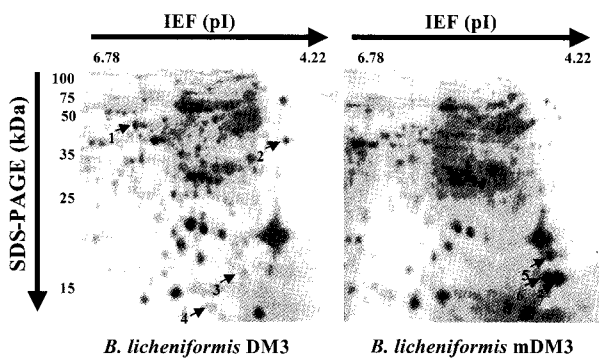


Fig. 2 Comparison of 2-dimensional electrophoresis patterns of intracellular proteins between *Bacillus licheniformis* DM3 and its antiungual activity deficient mutant. After IEF (pI4.22~6.78, 15 cm height) and SDS-PAGE (13% acrylamide gel, 15 cm × 16 cm), gel was stained by 0.2% silver nitrate.

기영동으로 비교하였다. 이차원 전기영동 결과, 육안으로 명확히 구분되는 서로 다르게 발현되는 7개의 spot을 확인하였다(Fig. 2). 이외에 단백질 생성량이 증가되거나 감소된 spot들을 관찰할 수 있었다. *B. licheniformis* DM3에서만 발현하는 4개의 단백질들의 pI 값과 분자량은 spot 1은 pI 6.11, 45 kDa, spot 2는 pI 4.75, 40.7 kDa, spot 3는 pI 5.37, 15.4 kDa, 그리고 spot 4는 pI 5.66, 12.5 kDa이었다. 또한 *B. licheniformis* mDM3에서만 발현하는 3개의 단백질들의 pI 값과 분자량은 spot 5는 pI 4.76, 18.1 kDa, spot 6은 pI 4.72, 15.6 kDa 그리고 spot 7은 pI 4.80, 15.6 kDa이었다(Table 2).

7개의 단백질 spot을 gel로부터 절개하였고 trypsin으로 digest하였다. Tryptic peptide들의 분자량은 MALDI-TOF MS 분석에 의해 결정되었다. 얻어진 단백질 score는 protein database search에서 유의한($p < 0.05$) 유사성을 보였다. MALDI-TOF MS의 분석 결과 각 spot의 tryptic peptide들은 가장 상동성이 높은 단백질 서열에 대해 20~74% coverage를 보였다(Table 2).

B. licheniformis DM3에서만 발현하는 4종의 단백질들을 분석한 결과, spot 1은 *B. subtilis*의 serine hydroxymethyltransferase(SHMT; 45.461 kDa), spot 2는 *Pseudomonas fluorescens*의 hypothetical protein(35.896 kDa), spot 3는 *B. subtilis*의 NifU protein homolog(16.156 kDa), 그리고 spot 4는 *B. subtilis*의 resolvase(24.724 kDa)와 유의한($p < 0.05$) 유사성을 지닌 단백질들로 동정되었고 *B. licheniformis* mDM3에서 spot 5는 *Gallus gallus*의 lysozyme(14.181 kDa)과 spot 6과 7은 *B. subtilis*의 alkyl hydroperoxide reductase(AHPR; 20.614 kDa)와 역시 유의한($p < 0.05$) 유사성을 보였다.

B. licheniformis DM3에서만 발현된 spot 1(SHMT)의 data는 Fig. 3에 제시하였다. Fig. 3A는 trypsin-digested protein spot 1의 MALDI-TOF MS peptide mass fingerprint spectrum을 보여준다. Fig. 3B는 matching peptide들의 목록이다. 17개의 peptide들이 protein database NCBI에서 accession-number gi16080743인 SHMT(*B. subtilis*)와 높은 유사성을 보였다. 이들

17개의 peptide들은 Fig. 3C에 protein sequence에서 제시하였다. SHMT는 pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-의존성 효소로서 one-carbon metabolism의 중심적 역할을 수행한다. SHMT는 serine과 tetrahydrofolate를 glycine과 5,10-methylene tetrahydrofolate로 만드는 비가역반응을 촉매한다. 5,10-methylene tetrahydrofolate는 purine, thymidine, choline과 methionine의 생합성과정에 주요 대사중간산물로 사용된다²². SHMT가 길항작용에 관계한다고 보고된 바는 없으나 세포 내 주요 단위체들의 합성에 관여하며 *B. licheniformis* mDM3에서 현저하게 발현이 억제되었기에 *B. licheniformis* mDM3가 핵산과 아미노산 요구주인가를 조사했으나 요구성이 아님을 확인하였다. 따라서, SHMT의 작용을 대신할 기작이 *B. licheniformis* mDM3에서 작동되고 있을 것으로 판단된다.

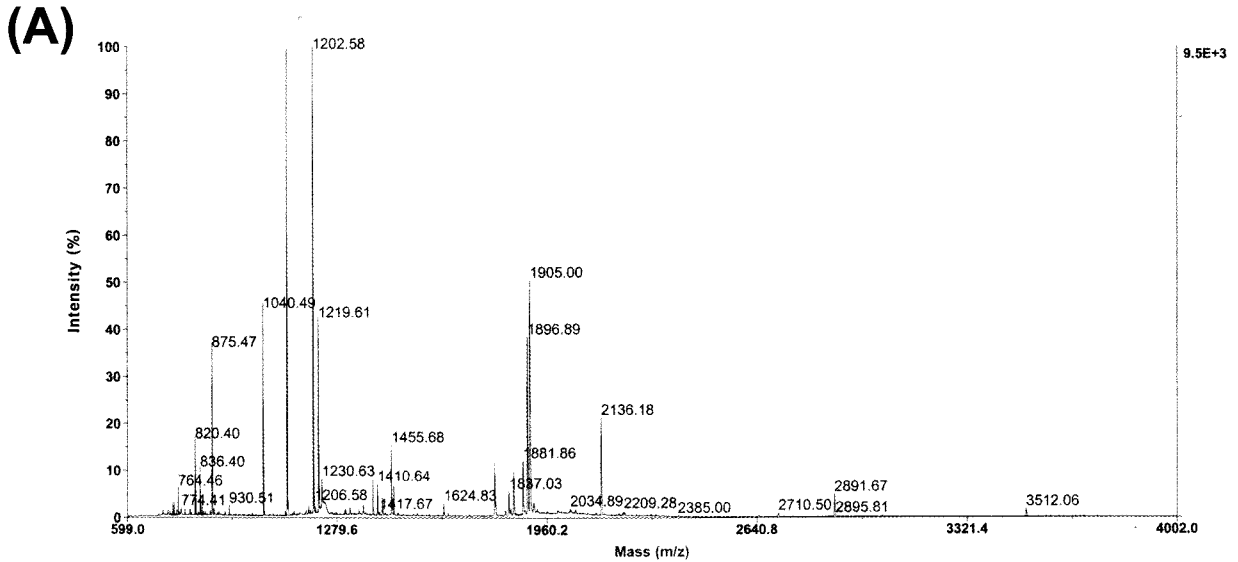
B. licheniformis DM3에서만 발현된 spot 3(NifU homolog protein)은 두 개의 다른 [2Fe-2S] cluster를 포함한 homodimer이다. [2Fe-2S]cluster는 nitrogenase [Fe-S] cluster형성에 필요한 Fe를 가지고 있고 NifU protein안에 단단히 붙어있어 강한 chelating reagent로도 제거할 수 없다. [Fe-S] cluster는 redox, catalytic, 또는 regulatory property를 가지고 있는 수많은 단백질에서 발견되었다. *B. subtilis* NifU protein은 혐기성 상태에서 nitrogen-fixing을 위해 nitrogenase의 Fe-S cluster의 합성과 연관되어 Fe를 나르거나 Fe-S cluster 집합에 매개체를 제공하는 기능을 갖는다고 보고되어 있으며²³, *Azotobacter vinelandii*에서 NifU의 mononuclear iron-binding을 확인함으로써 nitrogenase의 catalytic component안에 포함된 metallocluster의 [Fe-S]의 형성과 회복에 대해 연구하였다²⁴. Klinger 등²⁵이 *B. licheniformis*에서 O₂반응 유전자 조절자로 작용하는 Fe-S cluster를 포함하는 fumarate nitrate reductase regulator인 FnrBI 유전자를 cloning하였다. 이 Fnr 단백질은 혐기 상태에서 산소부족에 따른 nitrate reductase의 발현을 증가시키는 조절자의 역할을 수행한다. 이러한 연구결과들로 보아 차후에 *B. licheniformis* DM3가 혐기 상태에서 nitrogen을 확보하기 위해 영양원으로 사용할 때 NifU와 FnrBI간의 상호작용으로 길항작용을 유도할 수 있는지에 대하여 연구할 필요성이 있다.

B. licheniformis DM3에서만 발현된 spot 4(resolvase)는 Tn3, Tn1721, Tn21, 그리고 RP4에 의해 encoding되며 선택적으로 intramolecular resolution reaction을 촉매하는 작은 분자량(21 kDa)의 단백질로 알려져 있다²⁶. Resolvase는 DNA recombination에 관여하여 세포증식, 분열, DNA 복제 및 crossing over 등 유전적 변이와 환경 적응성을 증가시키기 위해서 길항작용에 필요한 유전자 조합의 재구성 등의 역할을 수행함으로써 직, 간접적으로 항진균 활성 물질의 생성을 유도하는 등의 방법으로 세포의 생존에 밀접하게 관여될 것으로 판단된다.

B. licheniformis mDM3에서만 발현된 spot 5(lysozyme)는 조류의 난, 식물, 세균, 동물 분비물, 눈물, 타액, 우유, 그리고 호흡 분비물 등을 포함한 다양한 생물의 체액과 조직에 분포되어 있는 antibacterial protein으로 알려져 있다. Lysozyme의

살세균 반응은 그람음성 세균에는 약하나 그람양성 세균에는 매우 효과적이다. 이는 그람양성 세균의 세포벽이 outer membrane, inner membrane, 그리고 peptidoglycan 층으로 구성되어 있기 때문이라고 여겨지며 lysozyme은 세균의 세포벽에 있는 peptidoglycan의 N-acetylglucosamine과 muramic acid 사이에 β -(1,4)-glycosidic 고리를 가수분해하는 촉매 역할을 한다.

계란 lysozyme의 C-terminus로 hydrophobic pentapeptide (Phe-Phe-Val-Ala-Pro)의 genetic fusion으로 *E. coli*와 같은 그람음성 세균에 대하여 살세균 반응을 향상시킨 방법이 보고되어 있고²⁷⁾ 효모의 일종인 *Pichia pastoris*에서 불안정한 lysozyme mutant가 그람음성 세균 뿐 아니라 그람양성세균에 대하여 살세균 반응을 보임을 연구하였다²⁸⁾. 그람음성 세균인



(B) 1. **g1116080713** Mass: 45461 Score: 126
serine hydroxymethyltransferase [*Bacillus subtilis*]

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
764.46	763.45	763.47	-0.02	159	165	0	ALAHKPK
820.40	819.39	819.41	-0.02	233	239	0	GGMILCR Propionamide (C)
836.40	835.39	835.40	-0.02	233	239	0	GGMILCR Oxidation (M); Propionamide
875.47	874.47	874.49	-0.02	358	366	0	LGTAAVTSTR
1040.49	1039.48	1039.51	-0.03	51	59	1	YAEGYPGKRR
1117.60	1116.59	1116.63	-0.03	166	176	0	LIVAGASAYPR
1187.59	1186.58	1186.59	-0.01	407	415	1	FPLYKELDY
1208.61	1207.60	1207.62	-0.02	280	290	0	TYAQNVISNAK
1364.68	1363.67	1363.72	-0.05	280	291	1	TYAQNVISNAKR
1410.64	1409.63	1409.68	-0.05	233	244	1	GGMILCREEFGK Propionamide (C)
1426.66	1425.65	1425.65	-0.00	386	397	1	NHEDEGKLEEAR
1624.83	1623.82	1623.85	-0.03	326	340	0	VAEHLVDEIGITSNK
1836.02	1835.01	1835.01	-0.00	249	266	0	SIFPGIQGGPLMHVIAAK
1852.04	1851.03	1851.01	0.02	249	266	0	SIFPGIQGGPLMHVIAAK Oxidation (M)
1881.86	1880.85	1880.84	0.02	60	75	0	YGGCEHVDVVEDIAR Carbamidomethyl (C)
1895.89	1894.88	1894.85	0.03	60	75	0	YGGCEHVDVVEDIAR Propionamide (C)
1904.01	1903.00	1902.98	0.01	341	357	0	NAIPYDPEKPFVTSRIR

No match to: 829.47, 930.51, 1111.57, 1179.58, 1202.58, 1219.61, 1230.63, 1321.62, 1395.76, 1455.68, 1460.64, 1624.83, 1881.86, 1887.03, 2034.89, 2209.28, 2385.00, 2710.50, 2895.81, 3321.4, 3512.06, 4002.0

(C) 1 MKHLPAQDEQ VFNAIKNERE RQTKIELIA SENFVSEAVM EAQGSVLTNK YAEGYPGKRY
 61 YGGCEHVDVV EDIARDRAKE IFGAEHVNQ PHSGAQANMA VFYFTILEQGD TVLGMNLSHG
 121 GHLTHGSPVN FSGVQYNFVE YGVDKETQYI DYDDVREKAL AHKPKLIVAG ASAYPRTIDF
 181 KKFREIADEV GAYFMVDMAH IAGLVAAGLH PNPVPYADFV TTTTHKTLRG PRGGMILCRE
 241 EFGKKIDKSI FPGIQGGPLM HVIAAKAVSF GEVLQDDFKT YAQNVISNAK RLAEALTKEG
 301 IQLVSGGTDN HLILVDLRSI GLTGKVAEHV LDEIGITSNK NAIPYDPEKP FVTSRIRLGT
 361 AAVTSRFGFDG DALEEVGAI I ALALKNHEDE GKLEEARQRV AALTDKFPPLY KELDY

Fig. 3. Analysis of spot 1 on *Bacillus licheniformis* DM3 2-DE map by MALDI-TOF MS. (A), MALDI-TOF MS peptide mass fingerprint spectrum obtained from crude peptide mixture after in-gel tryptic digest of spot 1; (B), The list of matching peptides between the experimental and theoretical values; (C), The sequence of serine hydroxymethyltransferase identified. The matched peptides are shadowed in the sequence.

*Gluconacetobacter diazotrophicus*가 lysozyme 유사활성을 보이는 12.5 kDa의 bacteriocin 단백질을 생산한다는 연구결과가 최근에 발표된 바 있다²⁹). 비록 본 연구에서 이와 같은 bacteriocin 단백질을 *B. licheniformis* DM3에서 생산하는 지에 대한 연구는 수행되지 않았으나 항진균 활성 결핍 돌연변이체 *B. licheniformis* mDM3에서 lysozyme과 유사한 단백질의 발현이 up-regulation된 것은 매우 특이한 경우로 이에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

B. licheniformis mDM3에서만 발현된 spot 6과 spot 7(AHPR)은 organic peroxide의 무독화 체계와 관련되어 있다³⁰). *Xanthomonas campestris*는 organic peroxide-induced gene인 AHPR와 Ohr을 생산하여 organic peroxide 독성을 방어함이 밝혀졌다³¹). 방사선 유도 돌연변이체인 *B. licheniformis* mDM3에서는 유전자 재조합을 통한 환경 독소의 제어에 관여하는 resolvase의 활성이 낮아진 것으로 보아 AHPR의 활성을 높여 세포 생존을 영위할 수 있을 것으로 예측된다.

본 연구 결과로 보아 *B. licheniformis* DM3에서만 뚜렷하게 발현되는 4개의 단백질들이 항진균 활성과 직, 간접적으로 관련이 있을 것으로 판단되며 미생물의 생존에 필요한 에너지원의 확보차원에서 길항적인 대사과정이나 대사산물 생산에도 관련이 있을 것으로 사료된다.

요 약

항진균 활성균주를 선발하는 과정에서 DM3 균주를 대천 바닷가에서 수집된 진흙 시료로부터 분리하였으며 API 50CHB kit를 이용하여 동정한 결과 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다. 이 균주는 12종의 식물병원성 진균에 대해 항진균활성을 나타내었다. 감마선(⁶⁰Co)을 조사하여 항진균 활성 결핍 돌연변이체(mDM3)를 유도한 후, 이차원전기영동으로 단백질을 분석한 결과 DM3와 mDM3에만 존재하는 각각 4종과 3종의 단백질을 확인할 수 있었다. 2-DE 결과 *B. licheniformis* DM3에서 spot 1은 serine hydroxymethyltransferase(45.0 kDa), spot 2는 hypothetical protein(40.7 kDa), spot 3는 NifU protein homolog(15.4 kDa), 그리고 spot 4는 resolvase(12.5 kDa)와 상동성을 지닌 단백질로 동정되었고 *B. licheniformis* mDM3에서만 발현된 spot 5는 lysozyme(18.1 kDa)과 spot 6, 7은 alkyl hydroperoxide reductase(15.6 kDa)으로 동정되었다. *B. licheniformis* DM3에서 이들 단백질들의 항진균 활성 관련 여부를 규명하기 위해서 더 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

- Baker, K. F. (1987) Evolving concepts of biological control of plant pathogens, *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 67-85.
- Brannen, P. M. and Kenney, D. S. (1997) Kodiak[®]-a successful biological control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 19, 169-171.
- Fravel, D. R., Connick, W. J. and Lewis, J. A. (1998) Formulation of microorganisms to control plant diseases. In Burges, H. D. (eds). *Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes and seed treatments.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, p.187-202.
- Asaka, O. and Shoda, M. (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4081-4085.
- Berger, F., Li, H., White, D., Frazer, R. and Leifert, C. (1996) Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouse, *Phytopathology* 86, 428-344.
- Seddon, B., Edward, S. G. and Rutland, L. (1996) Development of *Bacillus* species as antifungal agents in crop protection. In Lyr, H., Russell, P. E. and Sisler, H. D. (eds) *Modern fungicides and antifungal compounds.* Intercept, Andover, UK. p.155-160.
- Konz, D., Doekel, S. and Marahiel, M. A. (1999) Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide licheysin, *J. Bacteriol.* 181, 133-140.
- Chang, H. H., Lee, Y. K., Kim, J. S., Lee, K. S. and Cho, K. S. (2003) Mutation spectrum of manganese (II) peroxidase gene in *Pleurotus ostreatus* mutants induced by gamma radiation, *J. Microbiol.* 41, 52-57.
- Halliwell, B. and Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian cells, *FEBS Lett.* 281, 9-19.
- Becker, D. and Sevilla, M. (1993) The chemical consequences of radiation damage to DNA, *Adv. Radiat. Biol.* 17, 121-180.
- Lee, Y. K., Kim, J. K., Song, I. G., Chung, H. Y. and Chang, H. H. (2001) Characteristics of antifungal bacterium, *Bacillus subtilis* YS1 and its mutant induced by gamma radiation, *Kor. J. Microbiol.* 37, 305-311.
- Lee, Y. K., Chang, H. H., Kim, J. S., Kim, J. K. and Lee, K. S. (2000) Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities, *Rad. Phys. Chem.* 57, 145-150.

13. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
14. Nordhoff, E., Egelhofer, V., Giavalosco, P., Eickhoff, H., Horn, M., Przewieslik, T., Theiss, D., Schneider, U., Lehrach, H. and Gobom, J. (2001) Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures, *Electrophoresis* 22 (14), 2844-2855.
15. Woods, R. J. and Pikaev, A. K. (1994) Radiation dosimetry. In Woods, R. J. and Pikaev, A. K. (eds) Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing. John Wiley & Sons., New York, p.106-120.
16. Kim, S. T., Cho, K. S., Jang, Y. S. and Kang, K. Y. (2001) Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays, *Electrophoresis* 22, 2103-2109.
17. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
18. Helmut, B., Beier, H. and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 8, 93-99.
19. Farzin G., Catherine R. W., Denise A. M., Brian S. I. and Sheenah M. M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity, *Electrophoresis* 20, 601-605.
20. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Ceasy, D. M. and Cotrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
21. Lee, Y. K., Kim, J. S., Chung, H. Y., Cho, K. S. and Lee, Y. B. (2002) Mutant induction of several antifungal bacteria by gamma radiation(⁶⁰Co), *Kor. J. Environ. Agric.* 21, 216-222.
22. Rao, N. A., Ambili, M., Jala, V. R., Subramanya, H. S. and Savithri, H. S. (2003) Structure-function relationship in serine hydroxymethyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta.* 1647, 24-29.
23. Yuvaniyama, P., Agar, J. N., Cash, V. L., Jonson, M. K. and Dean, D. R. (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 599-604.
24. Agar, J. N., Yuvaniyama, P., Jack, R. F., Cash, V. L., Smith, A. D., Dean, D. R. and Jonson, M. K. (2000) Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein, *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 167-177.
25. Klinger, A., Schirawski, J., Glase, P., and Uden, G. (1998) The *Fnr* gene of *Bacillus licheniformis* and the cysteine ligands of the C-terminal FeS cluster, *J. bacteriol.* 180, 3483-3485.
26. Thorpe, H. M. and Smith, C. M. (1998) *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5505-5510.
27. Arima, H., Ibrahim, H. R., Kinoshita, T. and Kato, A. (1997) Bactericidal action of lysozyme attached with various sizes of hydrophobic peptides to the C-terminal using genetic modifications, *FEBS Lett.* 415, 114-118.
28. Liu, S. T., Saito, A., Azakami, H. and Kato, A. (2003) Expression, purification, and characterization of an unstable lysozyme mutant in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.* 27, 304-312.
29. Pinon, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniclla, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solas, M.-T. and Legaz, M.-E. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen, *Res. Microbiol.* 15(3), 345-351.
30. Poole, L. B. and Ellis, H. R. (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins, *Biochemistry* 35, 56-64.
31. Vattanaviboon, P., Whangsuk, W., Panmanee, W., Klomsiri, C., Dharmsthiti, S. and Mongkolsuk, S. (2002) Evaluation of the roles that alkyl hydroperoxide reductase and Ohr play in organic peroxide-induced gene expression and protection against organic peroxides in *Xanthomonas campestris*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 177-182.