

빙핵활성 세균으로부터 빙핵활성 단백질의 정제 및 특성

김기청* · 이 웅 · 송동업 · 조백호
전남대학교 농과대학 농생물학과

Purification and Characterization of Ice Nucleating Proteins from Ice Nucleation-Active Bacteria

Ki Chung Kim*, Ung Lee, Dong Up Song and Baik Ho Cho

Department of Agricultural Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT : Ice nucleation-active (INA) proteins having high ice nucleation activities were isolated and purified from the outer-membrane of *Pseudomonas syringae* 8401, *P. fluorescens* 8701 and *Erwinia herbicola* 8701. The bacterial cells were ground only with glass beads without using any detergents such as Triton X-100. The cell extracts were centrifuged with sucrose density gradient, followed by gel filtration, DEAE-ion exchange column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis in a non-denaturing buffer system and electroelution from the SDS-PAGE gel plates. Three INA proteins of 155 kD, 75 kD and 50 kD were identified both from *P. syringae* and *P. fluorescens*, and two proteins of 75 kD and 50 kD were identified from *E. herbicola*. The small INA proteins of 75 kD and 50 kD were first reported in the present study. All of these proteins, regardless of their molecular sizes and bacterial origins, had very high ice nucleation-activities of -5.5 to -7.5°C , indicating that these proteins have the highest activities in comparison to those previously reported by others. From these results we could suggest that even the relatively small protein of 50 kD may persist high ice nucleation activity. The activities of the purified INA proteins were inactivated by trypsin, heat higher than 37°C , Hg^{2+} , or SDS. In contrast, the activity increased by 1°C by adding phosphatidylinositol. The pH range for optimal activity was 6 to 8.

Key words : INA proteins, ice nucleation-active bacteria, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola*.

Pseudomonas, *Erwinia*, *Xanthomonas*속의 일부 세균들이 식물체 표면에 서식하면서 빙핵원(氷核源)으로 작용함에 따라, 식물체 내·외에 있는 물이 과냉각상태에 이르지 못하고, 비교적 고온인 $-1\sim-4^{\circ}\text{C}$ 에서 쉽게 결빙하므로 농작물에 상해(霜害)를 유발하는 것으로 알려졌다(10, 14). 이들 세균이 물의 과냉각을 억제하여 결빙을 촉진시키는 기작에 관해서는 아직 명확한 설명이 없다. 다만 물의 결빙을 촉진시키는 관련 물질로서 빙핵세균의 세포외막에 위치하는 어떤 단백질이 여러 연구자에 의해 제시되었다(4, 8, 9, 14, 18, 20, 23, 24, 25). 한편 빙핵활성 원인물질로서 mannose나 glucosamine 등의 carbohydrate성 화합물일 가능성(10, 22), protein-glucan complex에 결합되어 있는

phosphatidylinositol(11)일 가능성도 제시되었다. 또 Govindarajan 등(3)은 oligomeric ice protein의 구조적 조합에 lipid 혹은 detergent가 작용하여 소수성(疎水性) 환경을 유지하므로 빙핵활성 단백질의 빙핵활성이 유지될 수 있다고 하였다.

그러나 분리된 단백질의 빙핵활성이 $-8\sim-10^{\circ}\text{C}$ 로, 세균 자체의 빙핵활성 $-1\sim-3^{\circ}\text{C}$ 보다 훨씬 낮고, 또 유전자 조작에 의해 클로닝된 *Escherichia coli*의 빙핵활성(4, 18, 23, 24)도 빙핵세균 자체의 그것보다 훨씬 낮기 때문에, 분리된 단백질이 곧 빙핵활성 원인물질이라고 하기에는 의문이 남는다. 한편 분리된 단백질은 단일 단백질이 아니고 분자량을 달리한 수종의 단백질이 분리되므로(20) 이들 단백질이 서로 다른 빙핵활성 단백질인지 아니면 하나의 단백질에서 유래한 절편들인지도 명확하지 않다.

*Corresponding author.

따라서 이 연구는 국내에서 직접 분리하여 강력한 병해활성이 확인된 *P. syringae* 8401, *P. fluorescens* 8701, *E. herbicola* 8701의 외막으로부터, 세균 자체의 병해활성에 가까운 병해활성을 유지하고 있는 단백질을 분리, 정제하여, 이들 단백질의 분자량과 병해활성을 영향하는 몇 가지 요인을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주. 전남대학교 식물병리학연구실에서 분리, 보존하고 있는 병해세균 *P. syringae* 8401, *P. fluorescens* 8701, *E. herbicola* 8701과 대조균주로서 병해세균이 아닌 참다래의 세균성괴양 병원균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*, 토양분리 세균인 *P. fluorescens* 1계통 및 *E. coli* LE392를 nutrient agar glycerol 배지(NAG; nutrient broth 8 g, 2.5% glycerol, distilled water 1 L)에서 25°C, 24시간 배양한 후, 단클로니를 분리하여 공시균주로 사용하였다.

세포막의 분리. Matsushita 등(17)의 방법을 수정, 보완하여 분리하였다. 공시 세균 각각을 22°C의 nutrient broth(NB; nutrient broth 8 g, distilled water 1 L)에서 36시간 진탕배양 후, 원심분리(10,000 g, 10 min)하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 멸균수와 0.02 M Tris-Cl 완충액(pH 7.5)에서 차례로 세척하여 세포 3 g(wet weight)당 0.01 M MgCl₂와 20% sucrose, 0.2 mM dithiothreitol, 33 µg/ml DNase와 RNase, 그리고 proteinase inhibitor로 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)가 함유된 0.02 M Tris-Cl 완충액(pH 7.5)에 현탁하였다. 이 현탁액을 0°C에서 2분 간격으로 3회 분쇄(MSK Glass bead Mill)한 다음, 원심분리(18,000 g, 10 min)하여 상등액을 취했고, pellet은 동일한 완충액에 다시 현탁한 후 동일한 방법을 거쳐 상등액을 회수하였다. 이 과정은 pellet이 거의 형성되지 않을 때까지 수행하였다. 회수된 상등액을 혼합한 후 초고속원심분리(68,000 g, 90 min)하여 얻은 pellet(세포막분획)을 -20°C에 보관, 사용하였다.

세포 외막의 분리. 세포막을 Osborn & Munson (19), Hancock & Nikaido(7) 및 Lindow 등(15)의 방법을 적절히 이용하여 설탕밀도구배원심법으로 내·외막을 분리하였다. 설탕-Tris-Cl 완충액(pH 7.5) 65%(w/w)-1 ml, 60%-2 ml, 55%-2 ml, 50%-2 ml, 45%-2 ml, 40%-2 ml, 35%-2 ml, 및 30%-2 ml를 Beckman rotor SW28.1 원심관에 차례로 증충한 다음, 세포막을 포함한 20% 설탕이 함유된 0.02 M Tris-Cl 완충액(pH 7.5) 2 ml(단백질 15~18 mg/ml)를 loading하여 120,000 g에

서 18시간 원심분리하였다. 구배분획 1.5 ml씩을 0.02 M Tris-Cl 완충액에 대해 12시간, 3회 투석한 다음 Centriprep-3(Amicon Co.)으로 농축하여 세포외막 분획으로 사용하였다.

병해활성. 단백질의 정제. 설탕밀도구배원심법에 의해 분리한 외막분획을 microfiltration (pore size : 0.45 µm)한 후, 0.02 M Tris-Cl 완충액으로 평형화시킨 Sephacryl S-400(mobile phase : 0.02 M Tris-Cl 완충액; flow rate : 20 ml/h)을 이용, gel filtration chromatography하였다. 병해활성을 유지하는 분획만을 Centriprep-3으로 농축하여 이 농축액을 DEAE-cellulose (washing buffer : 0.02 M Tris-HCl; gradient elution buffer : 0.02 M Tris-Cl/1 M NaCl; flow rate : 20 ml/h)를 이용, ion exchange chromatography한 후, 출현한 A₂₈₀ peak별로 탈염 및 농축과정을 거쳐, 병해활성을 측정하였다. 모든 chromatography는 4°C cold chamber에서 실시하였다.

Ion exchange chromatography에 의해 분획한 세포외막 단백질을 10% non-denaturing buffer system(15)을 이용한 2개의 polyacrylamide gel 상에서 함께 전개시킨 후, 하나의 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색시켜서 band의 위치를 확인하였고, 염색하지 않은 다른 하나의 gel에서는 전자와 동일한 위치의 gel을 잘라내, electroelutor(Exelutor PAK6)를 이용하여 단백질을 추출하였다. Elution buffer(3.0 g Tris, 14.4 g glycine, distilled water 1 L, pH 8.8)에서 4분씩 2회 elution시켜 µl당 10 ng으로 농축(총 200 µl)한 시료들의 병해활성을 측정하여 -7°C 이상의 병해활성을 유지하고 있는 분획들을 10% discontinuous SDS-PAGE하여 분자량을 결정하였다. 분자량의 측정에는 high molecular weight standard mixture(Sigma)와 함께 전개하여 표준곡선상에서 측정하였으며, 모든 전기영동은 순환 항온수조를 이용하여 4°C에서 실시하였다.

단백질의 정량. 단백질의 정량은 BCA kit(Pierce Co.)를 이용하여 562 nm 흡광도에서 bovine serum albumin(1 mg/ml)의 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

Trypsin처리에 의한 병해활성의 변화. 병해활성 단백질에 trypsin TPCK(16,400 unit/µl)를 200 : 1, 1000 : 1, 2000 : 1로 처리하여 27°C에서 30분간 반응시킨 후 즉시 병해활성을 측정하였다.

보존 pH 및 온도에 따른 병해활성의 변화. pH에 따른 변화는 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 4~9까지 조정된 용액에 ml당 병해활성 단백질을 50 µg으로 정량하여 첨가한 후 20°C에서 2시간 동안 방치하였다가 병해활성을 측정하였다. 그리고 온도에

다른 변화는 단백질을 0.02 M Tris buffer(pH 7.5)에 ml당 50 μ g을 용해시켜 보존온도를 5, 15, 25, 37, 65°C로 달리하여 각 온도에 1시간 동안 정치시킨 후 빙핵활성을 측정하였다.

중금속 이온과 각종 화합물에 대한 빙핵활성의 변화. 0.02 M Tris buffer(pH 7.5)에 ml당 단백질을 50 μ g을 용해시킨 후, 금속이온으로서 HgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂, FeCl₂, ZnSO₄, CuCl₂를 최종 농도가 10 mM이 되도록 첨가하였으며, 금속이온에 대한 착화합물로서 SDS, EDTA, 8-OH-quinoline을 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 18~19°C 2시간 동안 반응시킨 후 빙핵활성을 측정하였다.

Phosphatidylinositol에 대한 빙핵활성의 변화. 세포막의 주요성분인 L- α -phosphatidyl-inositol(Sigma Co.)을 ml당 단백질을 50 μ g으로 정량한 용액에 대해 1%, 5%, 10%, 25%, 50%의 농도로 첨가하여 20°C에서 2시간 보존한 다음 빙핵활성을 측정하였다.

빙핵활성의 측정. Makino(16)의 micropipette법으로 측정하였다. Micro-pipette(Type 10 lambda, Scientific Co., USA)에 단백질(50 μ g/ml)을 50 μ l 취한 다음, 시료에 대한 열의 영향을 고려하여 20 mm정도의 공기층을 선단부에 남기고 gas burner로 봉합하였다. 동결온도는 본 실험실에서 제작한 냉각기를 사용하여, 냉매인 에탄올의 온도를 분당 0.3°C씩 저하시키면서 측정하였는데, micropipette 내부의 액면과 에탄올의 면이 일치하도록 유지시켜 micropipette내의 동결상태를 관찰하였다. 이때 micropipette내부에 동결이 일어나면 물의 용적이 8.3% 증가해서 액면이 상승하기 때문에 육안으로 쉽게 동결온도를 확인할 수 있었다.

결 과

세포외막 단백질의 정제 및 빙핵활성. 저자의 실험실에서 분리, 보관중인 3종의 빙핵세균 *P. syringae* 8401, *P. fluorescens* 8701 그리고 *E. herbicola* 8701로

부터 빙핵활성이 가장 높은 단콜로니를 균주별로 각각 분리하였다. 빙핵세균들간에 약간의 차이는 있지만 이들 빙핵세균 현탁액(10⁶ cells/ml)의 동결온도는

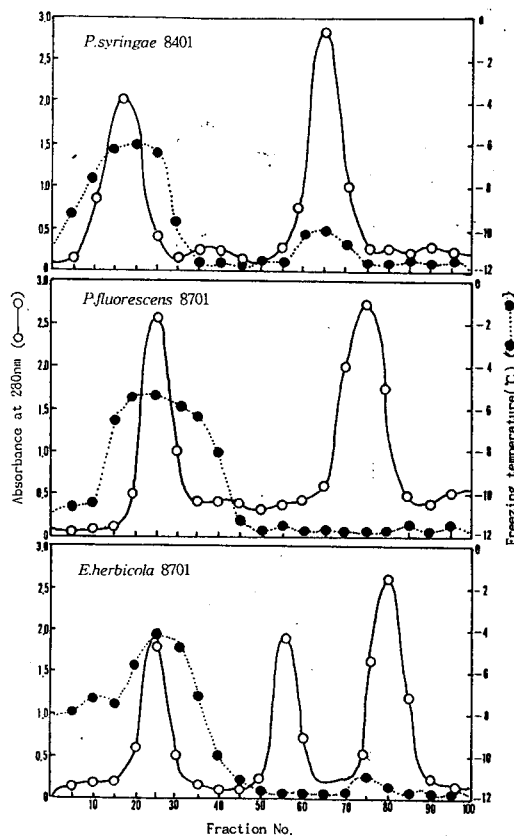


Fig. 1. Gel filtration chromatography of the outer membrane fractions of the cells of different ice-nucleation bacterial species obtained after sucrose density gradient centrifugation. Proteins were eluted at a flow rate of 0.5 ml · min⁻¹ at 4°C and measured at A₂₈₀ (○—○). Ice-nucleation activity was indicated by freezing temperature (●—●).

Table 1. Ice-nucleation activities of the outer cell membrane fractions in 3 bacterial species, *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens* and *Erwinia herbicola*

Fraction	Suspension volume (ml)	Total protein (mg)			Ice nucleation activity (°C) ^a		
		PS ^b	PF ^b	EH ^b	PS	PF	EH
Intact cell	—	—	—	—	-3.2±0.3	-2.8±0.2	-2.5±0.2
Crude membrane	20	250	250	250	-4.1±0.4	-4.0±0.2	-3.8±0.3
Outer membrane	30	132	125	145	-4.1±0.3	-4.2±0.3	-4.0±0.3

^a Ice-nucleation activity (°C) was measured by micropipette method.

^b PS : *Pseudomonas syringae* 8401; PF : *P. fluorescens* 8701; EH : *Erwinia herbicola* 8701.

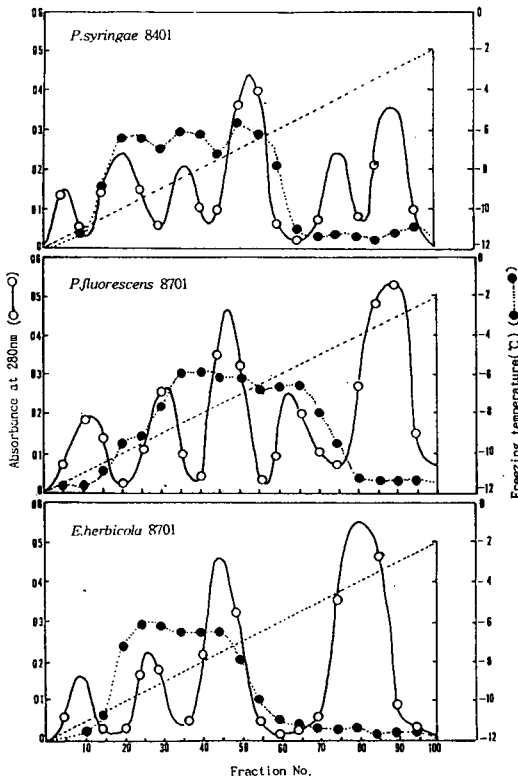


Fig. 2. Ion exchange chromatography of the outer cell membrane fraction of different bacterial species obtained after gel filtration chromatography. Proteins were eluted at a flow rate of 0.5 ml · min⁻¹ at 4°C and estimated at A₂₈₀ (○—○). Ice-nucleation activity (●··●) was presented by freezing temperature.

-2~-3°C정도를 유지하였다(Table 1). 이들 세균으로부터 분리된 조세포막들은 세균 세포자체의 빙핵활성보다는 약간 낮지만 -4°C정도에서 동결하여 상당한 빙핵활성반응을 근거로 설탕부유밀도별로 분획하여 분리하였는데, 이 과정에서 세포질내 물질이나 내막이 부분적으로 제거되었음은 물론 총단백질의 양도 감소되었음에도 불구하고, 분리된 외막분획의 빙핵활성은 조세포막의 빙핵활성을 거의 유지하고 있었다(Table 1).

외막분획으로부터 빙핵활성 원인물질을 분리하기 위해 gel filtration column chromatography(GFC)와 DEAE-ion exchange column chromatography(DEAE-IEC)를 실시하였다. GFC에서는 3종의 빙핵세균 모두 정도의 차이는 있지만 첫 A₂₈₀ peak의 분획에서 빙핵활성을 보유한 수용성 단백질이 분리되었는데, 이들의 빙핵활성은 -4.2~-6.0°C이었다(Fig. 1). 그러나 이들

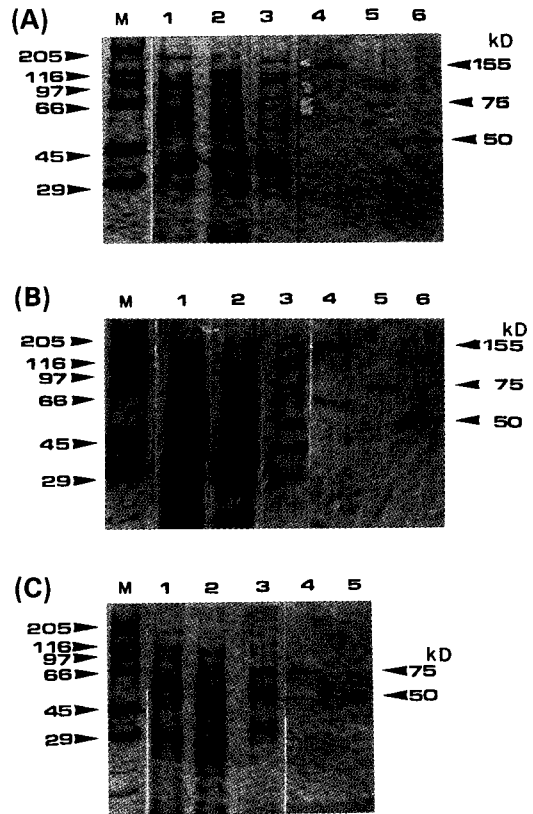


Fig. 3. SDS-PAGE profiles of ice nucleation proteins of *Pseudomonas syringae* 8401(A), *P. fluorescens* 8701(B) and *Erwinia herbicola* 8701(C). Lane M : standard markers; Lane 1 : outer membrane fractions after sucrose density gradient centrifugation; Lane 2 : first-peak fractions after gel filtration chromatography; Lane 3 : specific peak fractions after ion exchange chromatography; Lane 4-6 : ice nucleation proteins after electroelution.

Table 2. Ice-nucleation activity of the proteins purified from outer cell membranes of ice nucleation-active (INA) bacteria

INA bacteria	Proteins	INA activity ^a
<i>P. syringae</i> 8401	PS-1 (155 kD)	-6.4±0.1
	PS-2 (75 kD)	-7.0±0.1
	PS-3 (50 kD)	-6.8±0.1
<i>P. fluorescens</i> 8701	PF-1 (155 kD)	-6.7±0.1
	PF-2 (75 kD)	-7.3±0.1
	PF-3 (50 kD)	-6.2±0.1
<i>E. herbicola</i> 8701	EH-1 (75 kD)	-6.2±0.1
	EH-2 (50 kD)	-5.5±0.1

^a Ice nucleation-activity was estimated by micropipette method.

Table 3. Effect of trypsin on the activities of ice nucleation-active proteins from ice-nucleation bacteria, *Pseudomonas* and *Erwinia* species

Ice nucleation bacteria	INA protein ^a	Freezing temperature (°C)								
		0 min			20 min			40 min		
		L ^b	M ^b	H ^b	L	M	H	L	M	H
<i>P. syringae</i> 8401	PS-1	-7.8	-7.3	-7.3	-10.0	-9.7	-9.3	-16.0<	-16.0<	-16.0<
	PS-2	-8.4	-8.1	-8.0	-10.8	-10.4	-10.3	-16.0<	-16.0<	-16.0<
	PS-3	-7.3	-7.8	-8.0	-10.4	-10.5	-10.5	-16.0<	-16.0<	-16.0<
<i>P. fluorescens</i> 8701	PF-1	-7.9	-7.5	-7.5	-11.0	-10.2	-10.2	-16.0<	-16.0<	-16.0<
	PF-2	-8.8	-8.0	-8.0	-11.0	-11.2	-11.3	-16.0<	-16.0<	-16.0<
	PF-3	-8.0	-7.5	-7.5	-10.3	-10.4	-10.9	-16.0<	-16.0<	-16.0<
<i>E. herbicola</i> 8701	EH-1	-7.7	-7.4	-7.2	-10.2	-10.2	-10.0	-16.0<	-16.0<	-16.0<
	EH-2	-7.8	-7.2	-7.3	-11.1	-10.2	-10.1	-16.0<	-16.0<	-16.0<
Trypsin		-16.0<	-16.0<	-16.0<	-16.0<	-16.0<	-16.0<	-16.0<	-16.0<	-16.0<

^a PS-1 and PF-1 : 155 kD; PS-2, PF-2 and EH-1 : 75 kD; PS-3, PF-3 and EH-2 : 50 kD.

^b The ice nucleation proteins were incubated at 27°C for 30 min with different concentrations of trypsin. The molar ratios of trypsin are as follows : L, 1/200; M : 1/1000; H : 1/2000.

분획들을 농축하여 SDS-PAGE하여 본 결과, 분획간에 분자량별 band 구분이 명확하지 않았다(Fig. 3, A, B, C; each Lane 2). 그래서 GFC에서의 첫 peak분획을 다시 DEAE-IEC한 결과, 빙핵활성을 보유한 peak는 *Pseudomonas*속 균에서는 각각 3개씩, *E. herbicola*에서는 2개가 나타났다(Fig. 2). 이들의 빙핵활성은 -5.8~-6.2°C로서 GFC 실시 후보다는 약간 저하되었다. 즉 빙핵활성 단백질은 분리, 정제과정을 통해 세균세포 자체의 빙핵활성(-2~-3°C)에 비해 2.3~3.0°C정도 저하되었으며, 세포 외막의 그것에 비해 1.8~2.0°C 저하되었다(Fig. 2). 이들을 제외한 다른 peak에서는 빙핵활성이 전혀 나타나지 않았다.

GFC에서 얻은 빙핵활성 A₂₈₀ peak를 다시 DEAE-IEC하여 농축한 다음 SDS-PAGE한 결과 band의 구분이 GFC 후보다는 훨씬 뚜렷해졌으며(Fig. 3, A, B, C; each Lane 3). gel의 background면에서 약간 차이가 날 뿐 전반적인 주요 band의 종류에서는 대부분 같았다. Electroelution을 통해 확인된 빙핵활성 band는 *Pseudomonas*속 균에서는 각각 3개, *E. herbicola* 8701에서는 2개 band가 빙핵활성을 유지하고 있었으며, 이들의 분자량은 각각 155 kD, 75 kD, 50 kD이었다(Fig. 3, A, B, C; each Lane 4~6). *E. herbicola* 8701에서는 155 kD의 band는 나타나지 않았다. 또한 분리된 이들 각각의 단백질 band의 빙핵활성은 세균 자체의 빙핵활성보다 4~5°C 정도 낮았다(Table 2).

빙핵활성 단백질의 활성에 미치는 여러 가지 요인.

정제된 빙핵활성 단백질들에 대해 trypsin을 molar ratio별로 27°C에서 처리한 결과, 시간이 경과할수록 점차 빙핵활성이 감소하여 20분이 지난 후에는 완전히 빙핵활성을 상실하였다(Table 3). Molar ratio별 빙핵활성의 차이는 비슷하였으며 각 단백질간에 차이도 없었다. 한편, 빙핵활성 단백질들의 보존 pH에 따른 빙핵활성 변화를 보면, 정도의 차이는 있으나 분리된 단백질 모두 pH 6, 7, 8에서는 -6.5°C 전후에서 동결하여 비교적 안정한 빙핵활성을 유지하였으나, 그 범위를 벗어나면 점차 빙핵활성이 감소하는 경향을 보였으며, pH 5와 pH 9에서는 빙핵활성을 완전히 상실하였다(Fig. 4). 또한 보존 온도에 따른 빙핵활성 변화도 균에 따라 다소의 차이는 있었으나, 25°C까지는 비교적 안정한 빙핵활성을 유지하였고, 30°C 이상에서는 점차 빙핵활성이 감소하는 경향을 보였으며, 37°C 이상에서는 활성을 완전히 상실하였다(Fig. 5). 여러 가지 금속이온과 단백질 변성제가 빙핵활성 단백질에 미치는 영향은, 빙핵활성 단백질 모두 Hg²⁺이온과 SDS에 의해 빙핵활성을 상실하였으나 다른 금속이온들과 착화합물들은 빙핵활성에 큰 영향을 미치지 않았다(Table 4). Lipid의 일종인 L- α -phosphatidylinositol의 농도별 첨가에 의한 단백질 활성을 조사한 결과(Fig. 6), L- α -phosphatidylinositol 1%와 5%에서 세가지 균 모두 -4.2~-6.0°C에서 동결하여 빙핵활성이 1°C정도 상승하였지만 10%이상에서는 더 이상 상승하지 않았다.

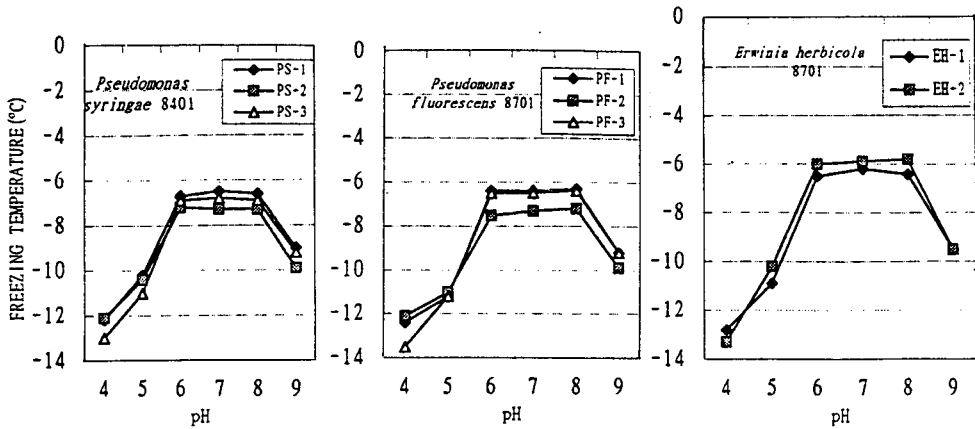


Fig. 4. Effect of pH on the activity of ice nucleation-active (INA) protein. INA proteins were preincubated at the indicated pHs for 1 hr prior to measuring the INA activities. PS-1 and PF-1 : 155 kD proteins; PS-2, PF-2 and EH-1 : 75 kD proteins; PS-3, PF-3 and EH-2 : 50 kD proteins.

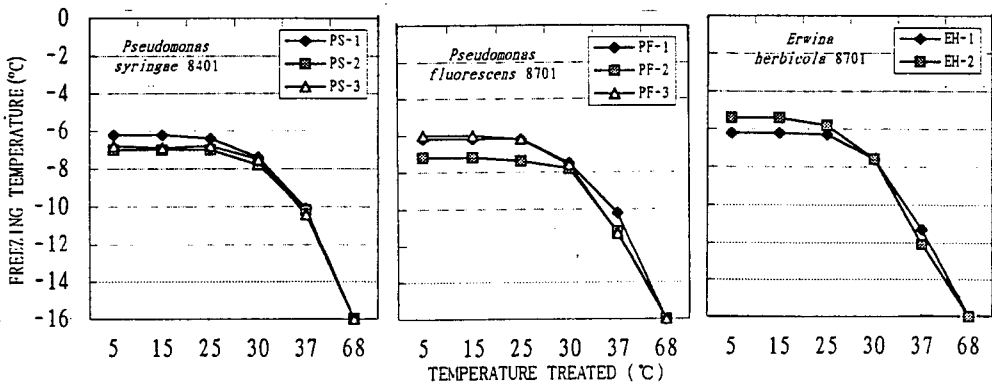


Fig. 5. Effect of temperature on the activities of ice nucleation-active proteins. INA proteins were preincubated at the indicated temperatures for 1 hr prior to measuring the INA activity. PS-1 and PF-1 : 155 kD proteins; PS-2, PF-2 and EH-1 : 75 kD proteins; PS-3, PF-3 and EH-2 : 50 kD proteins.

고 찰

빙핵활성 단백질에 관한 대부분의 실험들이 Triton X-100(3), Octyl-β-D-thioglucopyranoside(15), Nonidet P-40(23) 등 단백질 변성제를 사용하여 세포막을 분리하였다. 그러나 이들 단백질 변성제의 사용은 세포막으로부터 비교적 많은 양의 수용성 단백질을 회수할 수 있는 장점이 있는 반면에, 단백질이 순수정제되었다 할지라도 단백질과 결합한 변성제가 쉽게 제거되지 않기 때문에 단백질의 생물학적 활성을 밝히는 데는 적합하지 않는 것으로 고려되고 있다(6). 실제로, 보고된 빙핵활성 단백질의 활성은 -8°C~-10°C로서 세균 자체의 빙핵활성(-2~-3°C)에 훨씬 미치지 못하기 때문에 빙핵활성 원인물질의 진위여부가 논란의

대상이 되고 있다. 따라서 이 실험에서는 국내에서 분리한 빙핵세균 *P. syringae* 8401, *P. fluorescens* 8701, *E. herbicola* 8701의 세포를 아무런 변성제도 사용하지 않고 glass bead로만 마쇄한 후, 설탕밀도 구배원심 분리법을 이용하여 세포외막을 분리한 다음, 외막 단백질을 gel filtration column chromatography, DEAE-ion exchange column chromatography 그리고 non-denaturing buffer system을 이용한 polyacrylamide 전기영동 gel상에서 electroelution을 통해 높은 빙핵활성을 유지하는 단백질을 정제하였다. 회수율은 세균 60 g(wet weight)으로부터 50~100 μg 정도로 0.02~0.04%에 불과하였지만, 지금까지 보고된 어느 정제 단백질보다도 훨씬 높은 빙핵활성을 유지하는 빙핵활성 단백질을 얻을 수 있었다. 이것은 세포외막의 분리 및

Table 4. Effect of metal ions and some compounds on the activities of ice nucleation-active proteins from ice nucleation bacteria

Compound	Freezing temperature (°C)							
	<i>P. syringae</i> 8401			<i>P. fluorescens</i> 8701			<i>E. herbicola</i> 8701	
	PS-1 ^a	PS-2 ^a	PS-3 ^a	PF-1	PF-2	PF-3	EH-1	EH-2
Metal ions								
HgCl ₂	-14.5	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0
MnCl ₂	-6.8	-6.8	-6.9	-6.9	-7.0	-7.0	-6.5	-6.0
CaCl ₂	-6.3	-6.3	-6.4	-6.4	-6.2	-6.0	-6.3	-6.0
MgCl ₂	-6.5	-6.8	-6.6	-6.4	-6.9	-6.4	-6.5	-5.9
FeCl ₂	-7.1	-7.3	-7.4	-7.3	-7.8	-7.0	-7.0	-6.8
ZnSO ₄	-7.1	-7.5	-7.2	-7.0	-7.3	-7.0	-7.2	-6.9
CuCl ₂	-8.0	-7.9	-7.8	-8.1	-8.1	-8.4	-8.2	-8.0
Reducing agent								
Mercaptoethanol	-7.5	-7.5	-7.3	-7.4	-7.8	-7.8	-7.8	-7.0
DTT	-6.8	-6.8	-6.8	-6.2	-7.4	-6.3	-5.8	-5.9
Chelating agent								
SDS	-13.2	-13.2	-13.0	-14.0	-14.0	-14.2	-13.2	-14.5
EDTA	-7.4	-7.4	-7.1	-7.4	-7.4	-7.3	-7.2	-7.1
Quinolinol	-8.2	-8.2	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-7.4	-7.2
None	-6.4	-6.4	-6.8	-6.7	-7.3	-6.2	-6.2	-5.5

^a Ice nucleation-active proteins : PS-1 and PF-1 : 155 kD; PS-2, PF-2 and EH-1 : 75 kD; PS-3, PF-3 and EH-2 : 50 kD.

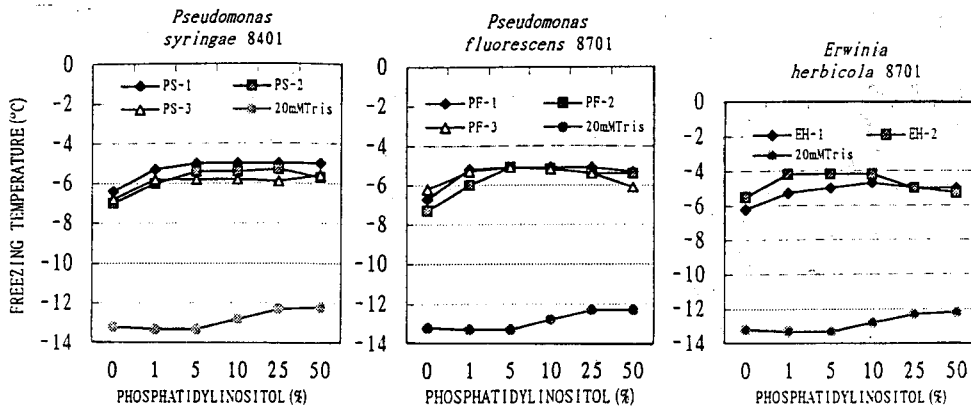


Fig. 6. Effect of phosphatidylinositol on the activities of ice nucleation-active proteins. The purified INA proteins were preincubated at the indicated concentration for 1 hr prior to measuring the activities. PS-1 and PF-1 : 55 kD proteins; PS-2, PF-2 and EH-1 : 75 kD proteins; PS-3, PF-3 and EH-2 : 50 kD proteins.

그 속에 들어있는 단백질의 추출과정에서 사용하는 변성제에 의해 빙핵활성이 많이 손상된다는 것을 시사한 것이다. SDS-PAGE gel상에 나타난 정제된 빙핵활성 단백질은 단일 band가 아닌, 균종에 따라 각기 분자량이 다른 수개의 band로 나타났는데, *P. syringae*에서는 3개(155, 75 및 50 kD), *E. herbicola*에서는 155 kD를 제외한 2개(75 및 55 kD)의 band가 검출되었다(Fig. 3). 이들 각 단백질의 빙핵활성은 모두 -5.5

~-7.3°C(Table 2)로서 세균 자체의 빙핵활성(-2~-3°C)에는 미치지 못하는 반면, 지금까지 빙핵활성 원인물질로서 보고된 어느 단백질보다 높은 빙핵활성인 것이다.

분리과정에서의 빙핵활성 변화를 보면, 특히 세포 외막으로부터 단백질이 유출되는 gel filtration column chromatography 과정에서 상당한 저하를 나타냈다(Fig. 1). 이는 Kozloff 등(12)이 추정했던 것처럼 빙

핵활성 단백질이 막에 존재하는 다른 여러 가지 비단백성 물질, 즉 mannose, glucosamine, 기타 다른 sugar 들 및 lipid 등과의 상호작용에 의해 완전한 빙핵활성을 나타낼 가능성을 하나 생각할 수 있고, 또 빙핵활성의 원인이 단백질의 구조자체에서 연유한다고 가정할 때, lipid 등이 이들 단백질의 적절한 구조적 조합에 관여(2)할 가능성, 그리고 세포외막으로부터 단백질을 분리, 정제하는 과정에서 proteolysis 등에 의한 단백질의 구조적 손상에 의한 가능성을 생각할 수 있다. 그러나 trypsin을 처리했을 경우 molar ratio에 상관없이 빙핵활성 단백질 모두 빙핵활성이 상실되었고(Table 3), Hg^{2+} 이온이나 SDS가 빙핵활성을 상실시킨 것(Table 4)은 단백질간의 공유 및 비공유결합성 상호작용이 빙핵활성에 영향을 주는 것으로 추측되므로, 빙핵활성 단백질의 구조적 배열상태가 빙핵원으로 작용할 가능성이 크다. 그러나 Kozloff 등(12)은 빙핵활성이 $-4^{\circ}C$ 인 강력한 빙핵구조에서는 phosphatidylinositol의 집적이 높기 때문에 $-9^{\circ}C$ 의 비교적 낮은 빙핵활성으로는 phosphatidylinositol의 역할을 설명할 수 없다고 하였으며, 그 이유로서 정제과정 중에 변성제나 유기용매의 사용으로 phosphatidylinositol을 용해시켰을 가능성을 시사하였고, 강력한 빙핵구조에는 lipoglyco-protein complex외에도 여러 가지 세포막내 물질들이 서로 complex를 이룬다고 하였다. 이 실험에서도 detergent는 물론 lysozyme이나 SDS 등 단백질에 영향을 줄 수 있는 어떠한 변성제나 유기용매를 사용치 않고 단백질을 분리한 다음 phosphatidylinositol과 직접 반응시킨 결과(Fig. 6), phosphatidylinositol 자체는 $-13.2^{\circ}C$ 로서 빙핵활성이 존재하지 않지만 빙핵활성 단백질과 반응할 경우에 빙핵활성을 평균 $1^{\circ}C$ 정도 상승시킨 것으로 보아 oligomeric ice proteins의 적절한 조합에 lipid나 당과 같은 막속의 비단백성 물질이 관여하여 빙핵활성을 상승시킬 가능성이 큰 것으로 보아지며, 정제과정 중에 비단백성 물질과 단백질의 분리로 인한 물리적 혹은 생화학적 배열의 변화가 빙핵활성의 저하를 가져올 수도 있다고 생각된다.

세포막으로부터 분리된 빙핵활성 단백질은 *P. syringae* 8401과 *P. fluorescens* 8701에서는 각각 155 kD, 75 kD 및 50 kD 분자량의 3개 band, *E. herbicola* 8701에서는 75 kD와 50 kD의 2개 band의 단백질만이 검출되었고, *Pseudomonas* spp.에서 검출된 155 kD band 단백질은 검출되지 않았다(Fig. 3). 이들 단백질의 빙핵활성은 $-6.2 \sim -7.3^{\circ}C$ 로서 모두 큰 차이가 없었다(Table 2). 이처럼 빙핵세균의 속(屬)에 따라 빙핵

활성 단백질 수가 서로 다른 것인지는 이 실험만으로는 판단하기 어렵고, 보다 광범위한 검토가 요구되는 부분이다. 또 이들 서로 다른 분자량을 갖는 빙핵활성 단백질이 본질적으로 다른 단백질인지, 아니면 단일 단백질이 분리, 정제과정을 통해 절단된 절편들인지도 명확하지 않다. 그러나 저자들의 별도의 실험에 의한 혈청학적 특성과 단백질들의 N-terminal residues 검정결과(미발표)에 의하면 단일 단백질일 가능성이 높다.

그러나 분명한 것은 분자량이 큰 것이든 작은 것이든 빙핵활성은 거의 같다는 사실이다. 즉 가장 작은 50 kD 단백질이나 이보다 3배가 큰 155 kD 단백질의 빙핵활성이 동일하다는 것이다(Table 2). 이는 빙핵활성을 나타낼 수 있는 빙핵활성 단백질의 최소단위는 최대 50 kD이고, 이것이 몇 겹으로 중첩되어 있을 가능성을 시사한다고 볼 수 있다. 그 이유로서는 빙핵활성에 관여하는 유전자로서 *P. syringae*에서 *ina Z*(4), *ina C*(18), *P. fluorescens*에서 *ina W*(1), *E. herbicola*에서 *ina E*(18) 등이 cloning되었는데, 이들 유전자 산물인 단백질의 크기는 153, 150 및 180 kD로서 상호간에 매우 높은 상동성이 있는 것으로 보고되어 있기 때문이다(4, 15, 24). 그러나 분자량이 아주 작은 75 kD나 50 kD의 빙핵활성 단백질은 이 실험에서 처음 밝혀진 단백질인 것이다.

요 약

3종의 빙핵세균 *Pseudomonas syringae* 8401, *Pseudomonas fluorescens* 8701, *Erwinia herbicola* 8701의 세포 외막으로부터 아무런 변성제도 사용치 않고 sucrose density gradient centrifugation, Sephacryl gel filtration chromatography, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, non-denaturing buffer를 이용한 PAGE, electroelution, SDS-PAGE를 통해 빙핵활성 단백질을 고도로 정제할 수 있었다. *P. syringae*와 *P. fluorescens*에서는 각각 3종류(155 kD, 75 kD, 50 kD)의 빙핵활성 단백질이, *E. herbicola*에서는 155 kD를 제외한 2종류(75 kD, 50 kD)의 빙핵활성 단백질이 확인되었다. 75 kD 및 50 kD의 작은 빙핵활성 단백질은 이 연구를 통해 처음 밝혀진 것으로, 지금까지 보고된 빙핵활성 단백질(150 kD 이상)보다는 훨씬 작은 것이다. 이는 빙핵활성을 나타내는 단백질의 기본단위는 이 실험의 결과만에 의하면 최대 50 kD임을 시사한다. 이들 단백질은 그 유래된 세균의 종류나 또는 단백질 분자량의 크기에 관계없이 모두 $-5.5 \sim -7.5^{\circ}C$

에서 물을 동결시키는 높은 빙핵활성을 갖고 있었다. 이는 지금까지 보고된 어느 정제단백질의 빙핵활성보다 높은 것이다. 정제된 단백질의 빙핵활성은 trypsin 처리에 의해 상실되었고, pH 6~8범위에서는 안정하였으며, pH 5이하, pH 9이상에서는 활성을 상실하였다. 보존온도에 대한 영향은 30°C 이상이 되면 점차 활성이 감소하는 경향을 보이다 37°C 이상에서는 활성이 완전히 상실되었다. 금속이온으로서 Hg^{2+} 이온과 SDS에 의해 활성이 상실되었으나 phosphatidylinositol의 첨가에 의해서는 활성이 약간 증가(-1°C)하였다.

감사의 말씀

이 연구는 전남대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음을 밝혀두며, 여기에 지원해 주신 학교 당국에 감사를 표합니다.

참고문헌

- Corotto, L. V., Wolber, P. K. and Warren, G. J. 1986. Ice nucleation activity of *Pseudomonas fluorescens*: mutagenesis complementation analysis, and identification of a gene product. *EMBO J.* 5 : 231-236.
- Deining, C. A., Mueller, G. M. and Wolber, P. K. 1988. Immunological characterization of ice nucleation proteins from *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* 170 : 669-675.
- Govindarajan, A. G. and Lindow, S. E. 1988. Phospholipid requirement for expression of ice nuclei. *Pseudomonas syringae* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 263 : 9333-9338.
- Green, R. L. and Warren, G. J. 1985. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature*(London) 317 : 645-648.
- Hames, B. D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Hames, B. D. and Rickwood, D. eds., IRL press, Oxford, pp. 1-91.
- Hjelmeland, L. M. 1993. Solubilization of native membrane proteins. *Methods in Enzymol.* 182 : 253-264.
- Hancock, R. E. W. and Nikaido, H. 1978. Outer membrane of gram negative bacteria XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J. Bacteriol.* 136 : 381-390.
- Kim, J. H., Park, S. H., Han, M. H. and Hahm, K. S. 1989. Purification and characterization of ice nucleating protein from *Pseudomonas syringae*. *Korean Biochem. J.* 22(1) : 73-77.
- Kim, Y. C., Kim, K. C. and Cho, B. H. 1989. Outer membrane proteins involved in ice nucleation-activity of *Pseudomonas syringae*. *Korean J. Plant Pathol.* 5 : 54-59.
- Kozloff, L. M., Schofield, M. A. and Lute, M. 1983. Ice-nucleating activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* 153 : 222-231.
- Kozloff, L. M., Lute, M. and Westaway, D. 1984. Phosphatidylinositol as component of the ice nucleating site of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *Science* 226 : 845-846.
- Kozloff, L. M., Turner, M. A., Arellano, F. and Lute, M. 1991. Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria. *J. Bacteriol.* 173 : 2053-2060.
- Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Lindow, S. E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21 : 363-384.
- Lindow, S. E., Lahue, E., Govindarajan, A. G., Panopoulos, N. J. and Gies, D. 1989. Localization of ice nucleation activity and the ice C gene product in *Pseudomonas syringae* and *E. coli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2 : 262-272.
- Makino, T. 1982. Micropipette method: A new technique for detecting ice nucleation activity of bacteria and its application. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 48 : 452-457.
- Matsushita, K., Adachi, O., Shinagawa, E. and Ameyama, M. 1978. Isolation and characterization of outer and inner membranes from *Pseudomonas aeruginosa* and effect of EDTA on the membranes. *J. Biochem.* 83 : 171-181.
- Orser, C. S., Staskawicz, B. J., Panopoulos, N. J., Dahlbeck, D. and Lindow, S. E. 1985. Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 164 : 359-366.
- Osborn, M. J. and Munson, R. 1989. Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram-negative bacteria. *Methods in Enzymol.* 31 : 642-653.
- Song, D. U., Kim, K. C. and Cho, B. H. 1993. Ice nucleation-active proteins produced by *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia herbicola*. *Korean J. Plant Pathol.* 9 : 172-179.
- Turner, M. A., Arellano, F. and Kozloff, L. M. 1990. Three separate classes of bacterial ice nucleation structures. *J. Bacteriol.* 2521-2926.
- Turner, M. A., Arellano, F. and Kozloff, L. M. 1991. Components of ice nucleation structures of bacteria.

- J. Bacteriol.* 6516-6527.
23. Watabe, S., Abe, G., Hirata, A., Emori, Y., Watabe, M. and Arai, S. 1993. Large-scale production and purification of an *Erwinia ananas* ice nucleation protein and evaluation of its ice nucleation activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 603-606.
24. Warren, G., Corotto, L. and Wolber, P. K. 1986. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Res.* 14 : 8047-8068.
25. Wolber, P. K., Deininger, C. A., Southworth, M. W. and Warren, G. J. 1986. Identification and purification of a bacterial ice-nucleation protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 7256-7260.