

Streptomyces sp. SAR01 균주에서의 항진균 관련 groES의 발현

이영근* · 김재성 · 조규성 · 장병일 · 추철형

한국원자력연구소 R·방사선응용연구팀

항진균 활성 관련 단백질을 찾기 위해 미역류로부터 *Streptomyces* sp. SAR01을 분리하고, FAME (fatty acid methyl ester) 분석으로 동정하였다. 감마선(^{60}Co) 조사를 이용하여 항진균 활성 결핍 돌연변이체(SAR535)를 유도한 후, 이차원전기영동으로 단백질을 분석한 결과 SAR01에만 존재하는 6종의 단백질을 확인할 수 있었다. 이중 10 kDa chaperonin cpn10 (GroES)과 96%의 상동성을 가진 10 kDa의 단백질을 클로닝하였으며, *E. coli* M15에서 과대 발현됨을 확인하였다. 또한 SAR535에 형질전환시킨 결과 SAR01과 유사한 항진균 활성이 나타났다. 이것으로 볼 때 groES는 *Streptomyces* sp. SAR01의 항진균 활성에 관련된 것으로 사료된다.

Key words □ antifungal protein, 2-DE, gamma radiation, groES, mutant, *Streptomyces*

Streptomyces 종들은 cellulase, hemicellulase, chitinase, glucanase 등의 다양한 곰팡이 세포벽 분해효소와 같은 이차 대사산물을 분비하여 다양한 항생제를 생성하는 능력을 갖기에 곰팡이에 의한 식물병의 제어제로서 개발되어왔다(2,16). 항진균 활성을 갖는 단백질은 생물농약의 유용성뿐만 아니라 식물병원성 곰팡이에 저항성을 갖는 식물의 개발, 종자보존제, 식품첨가물로서의 잠재적인 이용 가치로 인해 생물공학적 관심이 매우 높다(4,6). 생물은 일반적으로 병원성 미생물에 대한 일차방어 수단으로 세포에 의해 매개되는 면역체계와는 별도로 antimicrobial peptides를 체내에 축적하거나 분비한다. 이들 antimicrobial peptides는 Gram 음성균, Gram 양성균 뿐만 아니라 원핵생물, 곰팡이 등에 대하여 항균활성을 가지며 정상 세포에는 작용하지 않는 특징이 있다. Antimicrobial peptides는 병원균의 세포막에 결합하여 α -helix 구조를 이루며 ion-channel을 형성함으로써 병원균을 무력화시키기도 한다. Antimicrobial peptides는 post-translational modification 단계로 proteolytic processing, glycosylation, carboxy-terminal amidation, amino-acid isomerization 그리고 halogenation를 포함하고 있다(15,27,28,30,37). 해양 생태계의 *Streptomyces* sp.로부터 160 kDa의 항진균 단백질인 SAP를 분리하였고(35), *Streptomyces griseus*와 *Streptomyces anreofaciens*에서 항진균 활성을 갖는 rutamycin을 정제해 냈다(34). 또한 *S. griseus*에서 식물의 family 19 chitinase의 하나인 세균성 chitinase C (ChiC)가 발견되어 직·간접적인 항진균 활성과의 관련을 구조적 측면에서 고찰하였다(18). 그밖에 *Streptomyces humidus*로부터 phenylacetic acid와 sodium phenylacetate를, *Streptomyces tendae*로부터 nikkomycin을 분리해내는 등 항진균

물질에 대한 많은 연구가 보고되었다(2,16). 10 kDa의 chaperonin인 GroES는 진핵생물과 여러 속의 세균에서 발견되는 보존성 heat shock 단백질의 일원으로 일반적으로 단백질의 folding과 assembly를 촉진하는 후-전사 조절자로 알려져 있으며, 또한 *Mycobacterium tuberculosis*의 경우 GroES의 과대발현시 전사량의 증가가 관찰되었으며, GroES 결여 돌연변이체의 경우 전사량이 기본적인 수준을 유지하여, GroES가 전사조절자의 역할도 하는 것으로 알려져 있다(10,26). GroES는 *Mycobacterium avium*과 *Mycobacterium paratuberculosis*에서는 대량으로 분비되어 immunodominant antigen으로 보여지고 있다(5). 본 연구실에서 수행한 *Streptomyces* sp. SAR01과 병원성곰팡이들간의 길항실험결과 GroES가 항진균 활성에 관여하는 것으로 생각되어 유전자 측면에서 연구할 필요가 있다고 생각된다.

본 연구는 미역류에 서식하는 세균들 중 항진균 활성을 갖는 *Streptomyces* sp.를 감마선(^{60}Co)을 이용하여 항진균 활성이 결핍된 돌연변이체를 유도하고, 야생형 균주와 돌연변이체의 단백질 발현 차이를 이차원 전기영동으로 분석하며, 발현차이가 나는 groES를 클로닝하여 형질발현시켜 항진균 활성 관련을 알아보고자 수행하였다.

재료 및 방법

감마선 조사를 이용한 항진균 활성 결핍 돌연변이체 유도

2000년 11월 충청남도 대천 해변에서 채취한 미역류 1g을 0.8% 식염수 10ml에 넣고 30분간 교반한 후, 상등액 100 μ l을 NA 배지(nutrient agar: Difco, Detroit, USA)에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. *Candida albicans* 전배양액을 0.7%의 agar가 첨가된 NB 배지(nutrient broth: Difco)에 섞어 NA배지에 top agar를 만든 후, 항진균 세균을 접종하여 37°C에서 6시간 배양한 후, hollow zone의 크기로 항진균 활성도를 측정하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 042-868-8056, Fax: 042-862-6980

E-mail: yklee@kaeri.re.kr

분리된 항진균 세균은 fatty acid pattern (MIDI system) 분석으로 동정하였다. 분리 균주를 petri dish에 도말하여 감마선(^{60}Co)을 각각 총선량이 3, 4, 5 그리고 6 kGy로 되게 조사한 후(^{60}Co irradiator, AECL, dose rate: 920 Gy/hr), *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 검사하여 항진균 활성 결핍 돌연변이체를 분리하였다(25). 조사선량률은 Fricke dosimetry로 측정하였다(36).

단백질 추출

100 ml NB 배지에 12 시간 배양 후, 574×g, 20 분간 원심 분리하여(Centrifuge MF-80, Hanil Science, Seoul, Korea) 균체와 배양액을 분리하였다. 균체를 2 ml tube에 넣고 protein extraction buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 8.3), 2% NP-40, 20 mM MgCl_2 , 2% 2-mercaptoethanol, 1% polyvinyl poly-pyrrolidone (PVPP))를 1 ml 첨가한 후 mini-bead beater (Biospec Products Co.)를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 이것을 10,770×g으로 10 분간 원심분리하여 상등액만 분리한 후 acetone을 80% 첨가하여, -20°C에 10 분간 넣은 후 다시 원심분리하여(Micro-12, Hanil Science) 단백질을 회수하였다(23).

이차원 전기영동

세포로부터 추출한 단백질 200 μg 을 sample lysis buffer (9.5 M urea, 2.4% 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 5-7 : pH 6-8 : pH 7-9 = 1 : 2.5 : 2 : 1 : 0.5)로 만들었다. Cathode buffer는 20 mM NaOH, anode buffer는 10 mM H_3PO_4 로 하여 250 V 30 분, 300 V 30 분, 400 V 30 분간 전기영동을 한 후 600 V 16 시간, 800 V 3 시간 동안 전기영동하였다(23). IEF gel을 5 ml equilibration buffer (2.5% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8))에 넣어 30 분간 교반한 후 2-DE로 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였다(7,24). 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, Richmond, USA)을 이용하여 70 V 18 시간 동안 전개하였다(29). 이차전기영동 후, 고정액 (50% methanol, 10% acetic acid)으로 고정하고 silver staining을 하였다(14).

아미노산 서열 분석

이차전기영동한 gel을 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 mini Trans-blot Cell (Bio-Rad.)를 이용하여 transfer 하였다. 완충액은 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 195 mM glycine, 20% methanol을 사용하였으며, 100 mA 12 시간 동안 transfer하였다. PVDF membrane은 0.3% Ponceu-S에 5 분간 염색 한 후 밀결중류수로 탈색하여 원하는 spot을 회수하였다. N-말단 아미노산 서열 분석은 Procise 491 protein sequencing system (Applied Biosystems, Foster City, USA)으로 하였으며, NCBI

(The National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)로 상동성을 조사하였다.

Primer 제작 및 클로닝

확인된 N-말단 아미노산 서열을 바탕으로 primer (Gro5F; 5'-GGATCCGTGACTACAACCAGCTCC-3', Gro5R; 5'-AAGCTTCTACTTCTCGACCGC-3')를 합성하였으며, 이를 사용하여 PCR을 수행하였고 얻어진 PCR 산물을 먼저 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA)에 클로닝한 후 다시 pQE30 vector (Qiagen, Hilden, Germany)에 클로닝하였다. 합성한 primer에 클로닝을 용이하게 수행하고자 제한효소 인식 염기서열(*Hind*III, *Bam*HI)을 5'-말단에 부착하였다(3).

형질전환

E. coli M15와 항진균 활성 결핍 돌연변이체를 각각 5 ml의 LB 액체배지와 NB에서 배양하여 20 ml의 LB 액체배지와 NB 배지에 1 ml 씩을 접종한 후 4-5 시간 배양하여 흡광도 0.5-0.6일 때 세포를 원심분리기로 수확하고 이를 10% glycerol 용액으로 세 차례 세척하였다. 세척된 미생물을 2 ml의 10% glycerol 용액에 분주하여 -70°C에 보관하여 electro-competent cell로 사용하였다. 클로닝한 vector를 각각 1 μg /10 μl 씩 사용하여 electro-competent cell 90 μl 와 섞어 4°C에서 30 분간 방치하였다. Electroporation (40 μF , 500 V)을 수행한 후 각각 900 μl 의 LB 액체배지와 NB배지를 첨가하여 30°C에서 1 시간 동안 배양하였고 LB와 NA에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin이 첨가된 배지에 도말하여 형질전환체를 유도하였다(8,12). *E. coli* M15 형질전환체의 단백질 발현은 SDS-PAGE로 확인하였고, 항진균 활성 결핍 돌연변이 형질전환체는 이차원 전기영동으로 확인하였으며, 유전자의 항진균성은 *C. albicans*에 대한 생장억제여부로 확인하였다.

결과 및 고찰

감마선(^{60}Co)을 이용한 항진균 활성 결핍 돌연변이체 유도

미역류로부터 항진균 활성 세균 1 종(SAR01)을 분리하였으며, FAME 분석 결과, *Streptomyces* sp.로 동정되었다. 항진균 활성 결핍 돌연변이체를 유도하기 위해 SAR01 균주를 petri dish상에 도말하여 방사선을 조사한 결과, 5 kGy의 방사선 조사선량이하에서만 생존하였다. 생존한 콜로니를 대상으로 *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 확인한 결과, 7 종의 항진균 활성 결핍 돌연변이체를 유도할 수 있었다(Fig. 1). 감마선(^{60}Co)을 이용하여 복숭아의 발아를 촉진시킨 돌연변이체 유도나(31), *E. coli*와 phage의 형질전환 능력을 향상시킨 돌연변이체 유도(32) 등과 함께 이 결과는 감마선(^{60}Co)을 이용하여 다양한 돌연변이체 유도가 가능함을 시사한다.

항진균 활성 단백질의 동정 및 유전자 클로닝

SAR01과 항진균 활성 결핍 돌연변이 SAR535의 세포내단백질의 변화양상을 이차원 전기영동으로 비교하였다. 이차원 전기영

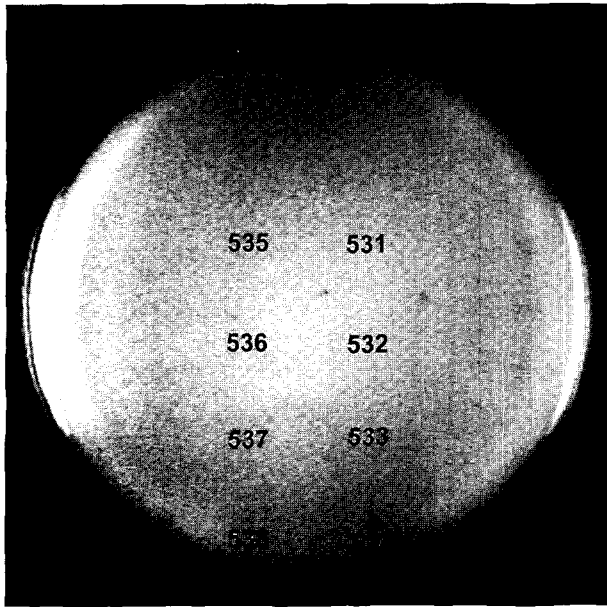


Fig. 1. Antifungal activity deficient mutants of SAR01 against *C. albicans* induced by radiation(⁶⁰Co). *Streptomyces* sp. SAR01 was irradiated at the dose of LD₉₅ by gamma radiation(⁶⁰Co). Antifungal activities of mutants were observed on the *C. albicans* lawn. *: mutant that still has antifungal activity.

동 결과, 서로 다르게 발현되는 6개의 spot을 확인하였다(Fig. 2). 이들 6 종 단백질들은 pI 값(4.0-5.5)에 따라 넓게 분포되어 있으며, 25-10 kDa 사이에 존재하였다. 이들 SAR01 균주에서만 나타나는 spot들은 항진균 활성에 관련되어 있을 것으로 사료된다. 항진균 활성 단백질들은 Ancovenin (2 kDa), Cinnamycin (2 kDa) 그리고 Lactococcin A (5.8 kDa) 등 10 kDa 이하의 분자량을 가진 것이 대부분이다(21). 그래서 본 실험에서도 위와 유사한 분자량을 가진 단백질(spot No. 1; MW 10 kDa, pI 4.5)로부터 유전자 클로닝을 위해 N-말단 아미노산 서열 분석을 실시하였다. 아미노산 서열 분석결과, *Streptomyces coelicolor*로부터 유래한 단백질인 10 kDa chaperonin cpn10 (GroES)과 27개의 아미

GroES	2	TTTSSKVAIKPLEDRIVWSP	LDAEOTTA 29
Spot No. 1	1	TTTSSKVAIKPLEDRIVW	LDAEOTTA 28

Fig. 3. Multiple amino-acid sequence alignments of the GroES (Chaperonin cpn 10, gi:461946) of *S. coelicolor* and Spot No. 1 of Fig. 2. Amino acid sequence of GroES(*S. coelicolor*) was compared with that of Spot No. 1 of Fig. 2. The different bases are shown by box.

노산 잔기가 일치하는 것으로 96% 상동성을 보였다(Fig. 3). Chaperonin인 GroES는 일반적으로 단백질의 folding과 assembly를 촉진하며, 그밖의 다른 기능도 알려져 있다(1,10,11). *Mycobacterium tuberculosis*의 경우 GroES의 과대발현시 전사량의 증가가 관찰되었으며, GroES 결여 돌연변이체의 경우 전사량이 기본적인 수준을 유지하여, GroES가 전사조절자의 역할도 하는 것으로 알려져 있다(26). Spot No. 1의 GroES는 단백질 생성시 중요한 역할을 하며, immunodominant antigen으로도 알려져 있어 *Streptomyces* sp. SAR01 균주의 항진균 활성과도 깊은 관련성이 있을 것으로 생각된다(5). *Streptomyces* sp. SAR01 균주에서 GroES의 항진균 활성을 확인하기 위해 유전자 클로닝을 하였다. 클로닝한 DNA의 염기서열 분석결과, NCBI의 BLAST로부터 검색한 *groES*의 서열과 일부 염기의 차이만 있을 뿐 95%의 상동성을 보였다(Fig. 4).

항진균 관련 groES의 발현

*groES*를 pQE30 vector에 클로닝하여(p30GS) *E. coli* M15에서 형질발현시킨 결과 IPTG 처리 시간의 경과에 따라 과대발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5). *E. coli* M15 형질전환체의 *C. albicans*에 대한 항진균 활성 실험은 세대 주기를 고려하여 *C. albicans*에 대해 *E. coli*를 100배 희석하여 처리하였다. *E. coli* M15는 *C. albicans*에 대한 11%의 성장억제효과를 보였으나, *E. coli* M15 형질전환체의 경우 GroES를 과대발현시킨 결과 54%의 성장억제효과를 보였다. 또한 GroES가 과대발현시 *C. albicans*가 분열되지 않고 침전되는 현상을 보였으나 사멸세포는 보이지 않았다. SAP와 Magainin 등과 같은 항진균 활성을 가진 단백질들은 그 자체만으로 병원성미생물을 사멸시키고, 또한 간

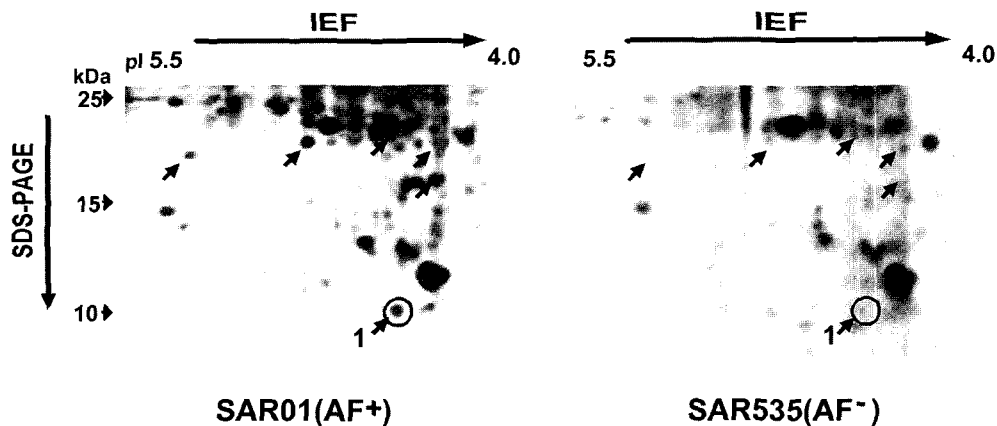


Fig. 2. 2-D Electrophoresis analysis of intracellular proteins between SAR01 (AF+) and SAR535 (AF-). After IEF (pI 4.0-5.5, 15 cm height) and SDS-PAGE (13% acrylamide gel, 15 cm×16 cm), gel was stained with 0.2% silver nitrate.

Protein GroES	1	GGACCGCATCTGGTCCAGCCGCTCGACGC	30
Spot No. 1		GGACCGCATCTGGTCCAGCCGCTCGACGC	
Protein GroES	31	CGAGCAGACCACGGCTCGGCCTGGTCAT	60
Spot No. 1		CGAGCAGACCACGGCTCGGCCTGGTCAT	
Protein GroES	61	TCCGGACACGGCCAGGAGAAGCCCCAGGA	90
Spot No. 1		TCCGGACACGGCCAGGAGAAGCCCCAGGA	
Protein GroES	91	GGGCGTCGTCTGGCCGTCGGCCCGGGCCG	120
Spot No. 1		GGGCGTCGTCTGGCCGTCGGCCCGGGCCG	
Protein GroES	121	CTTCGAGACGGCCACCGCCTTCGGCTCGA	150
Spot No. 1		CTTCGAGACGGCCACCGCCTTCGGCTCGA	
Protein GroES	151	CGTCAGACCGGGACGTCGT	172
		CGTCAGACCGGGACGTCGT	

Fig. 4. Multiple DNA sequence alignments of the *groES*(Chaperonin cpn 10, gi:491946) of *S. coelicolor* and Spot No. 1 of Fig. 2. DNA sequence of *groES*(*S. coelicolor*) was compared with DNA sequence cloned from Spot No. 1 of Fig. 2. The different bases are shown by boxes.

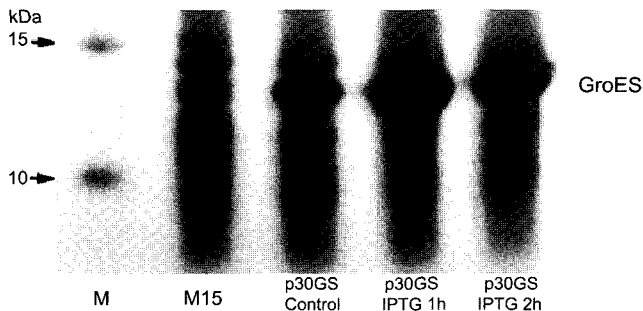


Fig. 5. Expression of *groES* in *E. coli* M15 after IPTG treatment. After transformation of pQE30 including *groES* into *E. coli* M15, *groES* expression was analysed on the basis of IPTG treatment period by SDS-PAGE (13% acrylamide gel, 15 cm×16 cm).

접적으로 host의 면역체계를 활성화시켜 다른 미생물들로부터 host를 보호한다(35,37). 본 실험결과는 빠른 세대 주기를 가진

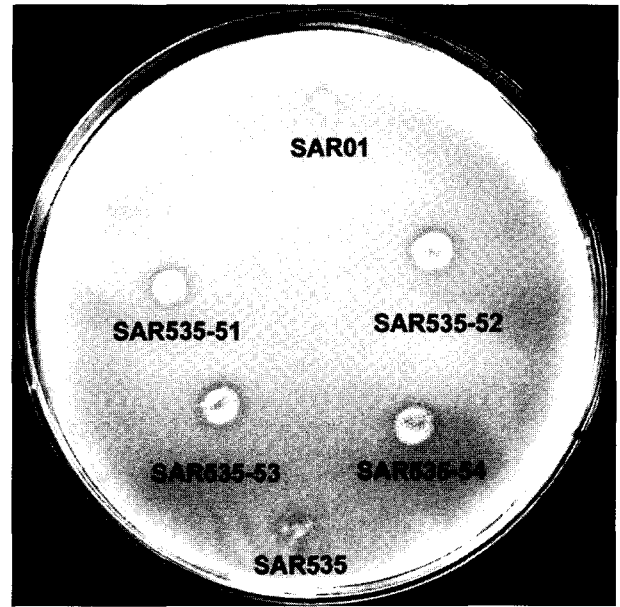


Fig. 7. Antifungal activities of SAR535 transformants against *C. albicans*. After transformation of pQE30 including *groES* into *Streptomyces* sp. SAR535, antifungal activity was observed on the lawn of *C. albicans*. SAR535-51, SAR535-52, SAR535-53 and SAR535-54 are transformants of cloned *groES*.

E. coli M15에 의한 *C. albicans*의 생육저하효과와 함께 GroES에 의한 성장저해가 상호적으로 나타난 결과로 보여지며, 사멸세포는 없는 것으로 보아 직접적인 항진균 활성보다는 간접적인 항진균 활성을 가진 것으로 사료된다. GroES의 간접적인 항진균 활성을 확인하기 위해 GroES의 발현이 되지 않는 항진균 활성 결핍 돌연변이체인 SAR535에 p30GS를 형질전환시킨 결과 이차원 전기영동상에서 단백질 발현이 확인되었다(Fig. 6). 또한 이 유전자를 복원시킨 SAR535 형질전환체에서의 경우 야생형 균주와 비슷한 항진균활성을 보였다(Fig. 7). GroES가 성장면에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 *E. coli*를 이용한 실험 결과로 볼 때 돌연변이체의 성장력의 회복이나 증가로 인한 결

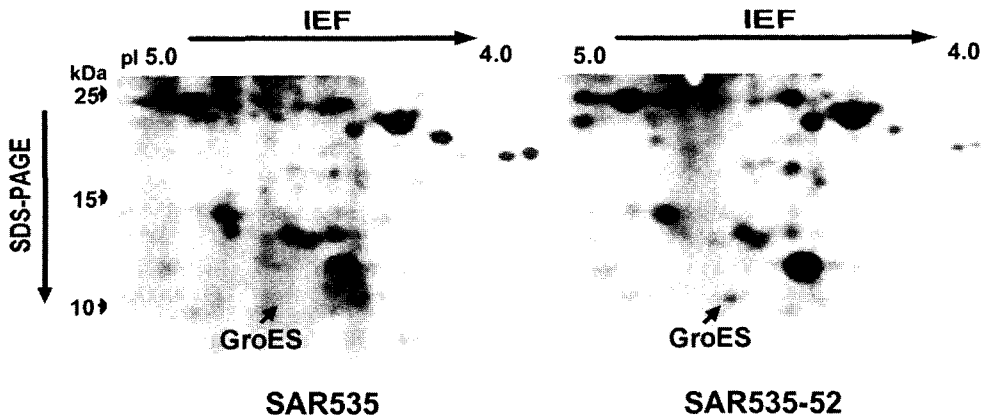


Fig. 6. Polypeptide profiles of SAR535 and SAR535-52. After IEF (pI4.0-5.0, 15 cm height) and SDS-PAGE (13% acrylamide gel, 15 cm×16 cm), gel was stained with 0.2% silver nitrate. SAR535-52 is a transformant of cloned *groES* into SAR535.

과보다 GroES의 간접적 효과로 인해 항진균활성이 회복된 것으로 사료된다. 또한, GroES의 주된 역할이 chaperone인 것은 주지하는 사실이나, *Mycobacterium tuberculosis*에서의 실험결과에서 전사 조절자로서 작용하는 예도 보고되고 있다(26). 이상의 결과로 볼 때, groES가 *Streptomyces* sp. SAR01의 항진균 활성 기작에 직·간접적으로 관련된 유전자인 것으로 사료된다.

단백질과 유전자의 양 방향에서의 연구결과 모두 GroES가 *Streptomyces* sp. SAR01 균주의 항진균 활성 기작에 관여함을 확인하였다(Fig. 2,7). 지금까지 보고된 항진균 활성을 갖는 단백질들은 직접적으로 항진균 활성을 갖는 데 반하여 본 연구에서 밝혀진 GroES의 경우 일반적으로 단백질의 folding에 관여한다(10,11). 다른 유전자의 전사조절자로의 기능은 일부 알려져 있으나(26), *Streptomyces* sp. SAR01 균주에서의 GroES에 의한 단백질의 folding이나 GroES 의존성 유전자가 항진균 활성과 관련이 있다는 최초의 보고이다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

- Boosbun, C.-I., R.J. Wilkinson, and J. Ivanyi. 2002. Selective T-cell recognition of the N-terminal peptide of GroES in tuberculosis. *Infect. Immun.* 70, 1645-1647.
- Bormann, C., K. Aberle, H.P. Fiedler, and H. Schrempf. 1990. Genetic complementation of *Streptomyces tendae* deficient in nikkomycin production. *Appl. microbiol. biotechnol.* 32, 424-430.
- Cheng, S., C. Fockler, W. Barnes, and R. Higuchi. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 5695-5699.
- Chet, I., R. Shapira, A. Ordentlich, and A.B. Oppenheim. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant Soil.* 129, 85-92.
- Cobb, A.J. and R. Frothingham. 1999. The GroES antigens of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vert. Microbiol.* 67, 31-35.
- Dempsey, D.M.A., H. Silva, and D.F. Klessig. 1998. Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends Microbiol.* 6, 54-61.
- Dives, B. J.. 1964. Disc electrophoresis-II: method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16, 6127-6145.
- Fridovich, I.. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 20, 875-880.
- Guhr, P., S. Neuhofen, C. Coan, J.G. Wise, and P.D. Vogel. 2002. New aspects on the mechanism of GroEL-assisted protein folding. *Biochim. Biophys. Acta* 1596, 326-335.
- Han, W. and P. Christen. 2001. Mutations in the interdomain linker region of DnaK abolish the chaperone action of the DnaK/DnaJ/GrpE system. *FEBS Lett.* 497, 55-58.
- Hanahan, D.. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmides. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hayakawa, M., K. Ishizawa, and H. Nonomura. 1988. Distribution of rare actinomycetes in Japan soil. *J. Ferment. Technol.* 66, 367-373.
- Helmut, B., H. Beier, and H.J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Hoffmann, J.A., F.C. Kafatos, C.A.J. Jr., and R.A.B. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hwang, B.K., S.W. Lim, B.S. Kim, J.Y. Lee, and S.S. Moon. 2001. Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3739-3745.
- Ikeyama, S., K. Kusumoto, H. Miyake, K. Rokutan, and S. Tashiro. 2001. A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranylgeranylacetone, suppresses apoptosis of cultured rat hepatocytes caused by hydrogen peroxide and ethanol. *J. Hepatol.* 35, 53-61.
- Itoh, Y., T. Kawase, N. Nikaidou, H. Fukada, M. Mitsutomi, T. Watanabe, and Y. Itoh. 2002. Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1084-1092.
- Jaattela, M.. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* 31, 261-271.
- Jiang, C.L. and L.H. Xu. 1996. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunna, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 249-253.
- Juan, C. O. and A. G. Pisabarro. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4, 13-19.
- Kim, B.S., J.Y. Lee, and B.K. Hwang. 1998. Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and scumud soils of Korea. *J. Microbiol.* 36, 86-92.
- Kim, S.T., K.S. Cho, Y.S. Jang, and K.Y. Kang. 2001. Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 22, 2103-2109.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, Y.-K., H.-H. Chang, J.-S. Kim, and K.-S. Lee. 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. *Radiat. Phys. Chem.* 57, 145-150.
- Legname, G., P. Buono, G. Fossati, N. Monzini, P. Mascagni, D. Modena, and F. Marcucci. 1996. Evidence for GroES acting as a transcriptional regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 412-418.
- Matsuzaki, K.. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1-10.
- Minowada, G. and W.J. Welch. 1995. Clinical implications of the stress response. *J. Clin. Invest.* 95, 3-12.
- O'Farrell, P.H.. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Hancock, R.E.W. and G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends microbiol.* 8, 402-410.
- Saamin, S. and M. M. Thompson. 1998. Radiation-induced muta-

- tions from accessory buds of sweet cherry, *Prunus avium* L. cv Bing. *Theor. Appl. Genet.* 96, 912-916.
32. Shanado, Y., K. Hanada, and H. Ikeda. 2001. Suppression of gamma ray-induced illegitimate recombination in *Escherichia coli* by the DNA-binding protein H-NS. *Mol. Gen. Genet.* 265, 242-248.
 33. Weller, D.M.. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407.
 34. White, J.D., Y. Ohba, W.J. Porter, and W. Shan. 1997. Synthesis of the spiroketal segment (C19-C34) of the rutamycins, antifungal metabolites of *Streptomyces* species. *Tetrahedron Lett.* 38, 3167-3170.
 35. Woo, J.-H., E. Kitamura, H. Myouga, and Y. Kamei. 2002. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2666-2675.
 36. Woods, R.J. and A.K. Pikaev. 1994. Radiation dosimetry. p. 106-120. *In* Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing. John Wiley & Sons, Inc., New York.
 37. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

(Received August 12, 2002/Accepted September 4, 2002)

ABSTRACT: *groES* Expression Related to Antifungal Activity of *Streptomyces* sp. SAR01

Young-Keun Lee*, Jae-Sung Kim, Kyu Seong Cho, Byung Il Jang and Chul Hyung Choo
(Radioisotope · Radiation Application Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea)

To analyse proteins and gene related to antifungal activity, SAR01 strain was isolated from a brown seaweed and identified as *Streptomyces* sp. by FAME(fatty acid methyl ester) analysis. Antifungal activity deficient mutant(SAR535) of *Streptomyces* sp. SAR01 was induced by gamma radiation(⁶⁰Co). It was found that 6 specific protein spots appeared only in SAR01 by 2-D electrophoresis analysis. Among them, a protein of 10 kDa had homology of 96% with 10 kD chaperonin cpn 10 (GroES) by Basic Local Alignment Search Tool(BLAST, NCBI) analysis. SAR535 transformants into which *groES* was transferred by electroporation revealed antifungal activity newly similar with SAR01. It suggested that *groES* be supposed to be related to the antifungal activity of *Streptomyces* sp. SAR01.