

Streptomyces sp. SAR01 균주에서의 항진균 관련 단백질 분석

이영근* · 김재성 · 조규성 · 장병일 · 추철형

한국원자력연구소, RI · 방사선응용연구팀

Analysis of Antifungal Proteins in *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

Abstract - To analyze proteins related to antifungal activity, SAR01 strain was isolated from seaweed and identified as *Streptomyces* sp. from the result of FAME (fatty acid methyl ester) analysis. The isolated strain had antifungal activities against 7 species of plant pathogenic fungi. Antifungal activity deficient mutant (SAR535) of *Streptomyces* sp. SAR01 was induced by gamma radiation (^{60}Co , 5 kGy). By 2 D electrophoresis analysis, 6 protein spots were found in wild strain (SAR01) but these spots disappeared in mutant strain (SAR535). Among them, 5 proteins showed similarities to heat shock protein 70 (HSP70), Fe-containing superoxide dismutase II (Fe-SODII), ribosome recycling factor (RRF), 10 kDa chaperonin (GroES) and inorganic pyrophosphatase (PPase), respectively. It suggested that the above 6 proteins could be closely related to the antifungal activity of *Streptomyces* sp. SAR01.

Key words : Antifungal protein, 2-DE, Gamma radiation, Mutant, *Streptomyces* sp.

서 론

방선균, *Streptomyces* sp.들은 cellulase, hemicellulase, chitinase, glucanase 등의 다양한 곰팡이 세포벽 분해효소와 같은 이차 대사산물을 분비하여 다양한 항생제를 생성하는 능력을 갖기에 곰팡이에 의한 식물병의 제어제로서 개발되어왔다(Franklin *et al.* 1989; Lechevalier 1988). 특히 농경을 위해 개발된 항생제의 약 60% 이상이 *Streptomyces*로부터 유래한 것으로 보고되었다(Tanaka and Omura 1993). 또한 *Streptomyces* sp.들은 다른 방선균인 *Actinomyces* sp.에 비해 다양한 항생 능

력을 갖는 균주일 뿐만 아니라 논, 호수, 뺨, 열대우림, 동굴토양 등 다양한 환경으로부터 분리되고 있다(Okami and Hotta 1988; Hayakawa *et al.* 1988; Jiang and Xu 1996; Kim *et al.* 1998). 이러한 항진균 활성을 갖는 여러 생물 물질 중에서 단백질은 식물, 곤충, 곰팡이로부터 분리되어 그 특성이 규명되어 왔다. 식물로부터 유래되는 항진균 단백질은 cysteine-rich small defensin, 리보솜 불활성화 단백질, 지질 전이단백질, 키틴결합 단백질과 곰팡이의 접착에 대하여 방어기작을 나타내는 것으로 보여지는 pathogenesis-related 단백질(PR 단백질) 등이 보고되었으며 이들 대부분의 단백질은 생성되는 즉시 항진균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Yun *et al.* 1997). 항진균 활성을 갖는 단백질은 생물농약으로서의 유용성 뿐만 아니라 식물병원성 곰팡이에 저항성을 갖

* Corresponding author: Young-Keun Lee, Tel. 042-868-8056,
E-mail. yklee@nanum.kaeri.re.kr

는 식물의 개발, 종자보존제, 식품첨가물로서의 잠재적인 이용 가치로 인해 생물공학적인 관심이 매우 높다 (Dempsey *et al.* 1998). 감마선을 이용하여 균주의 돌연변이를 유도하는 방법은 인위적인 유전자 조작이 아닌 물리적인 방법으로서 진화가 가속화된 경우의 일부라고 평가가 가능하므로 환경적응성이 높고 생태계 교란의 위험성이 미미할 것으로 추정된다.

본 연구에서는 미역류 표면에 서식하는 세균들 중 항진균 활성을 갖는 *Streptomyces* sp.를 분리한 후, 감마선을 이용하여 항진균 활성이 결핍된 돌연변이를 유도하여 야생형 균주와 돌연변이 균주의 단백질 발현 차이를 이차원 전기영동으로 비교 분석하고 이를 통해 항진균 활성에 관련된 단백질을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 항진균 세균의 분리와 동정

미역류 1g을 0.8% 식염수 20 ml에 넣고 30 분간 교반한 후, 상등액 100 μ l을 각각 R2A (Difco, USA) 배지와 NA (nutrient agar, Difco, USA) 배지에 도말하였다. 37°C에서 16시간 배양 후, 특징적인 콜로니를 항진균 활성세균 후보군으로 이용하였다. 일차적으로 *Candida albicans*를 대상으로 항진균 활성을 측정된 뒤, 최종 선별된 항진균 활성 세균을 대상으로 *Rhizoctonia solani*를 포함한 식물병원성 진균류 12종에 대한 항진균 활성스펙트럼을 분석하기 위하여 agar plug 형태로 식물병원성 진균류를 각각 PDA (potato dextrose agar, Difco, USA) 배지의 중앙에 접종한 후, 전 배양된 항진균 세균의 배양액을 paper disc (Advantec, Toyo) 접종 방법으로 *in vivo* 길항실험을 행하였다. Disc의 가장자리에서부터 투명 억제대까지의 길이를 측정하여 상대적인 항진균 활성도를 조사하였다.

분리된 항진균 세균은 일차적으로 Gram stain을 시행한 후, API 50CHB/E kit를 이용한 생화학적 특성을 파악하고 fatty acid pattern 분석 (MIDI system)과 연계하여 균주를 동정하였다.

2. 병원성 곰팡이

분리 세균의 항진균 활성을 측정하기 위한 *C. albicans*와 식물병원성 진균 12종 (*Pyricularia grisea* KACC 40415, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria solani* KACC 40570, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Alternaria alternata* KACC 40020, *Phyto-*

phthora capsici KACC 40158, *Pythium ultimum* KACC 40705, *Rhizoctonia solani* KACC 40411, *Mycosphaellera melonis*, *Botryosphaeria dothidea* and *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457)은 한국농업과학기술원 농업미생물 보존센터 (KACC)로부터 기증 받은 균주를 사용하였다.

3. 감마선 조사를 이용한 항진균 활성 결핍 돌연변이 유도

분리 균주를 petri dish에 도말하여 3, 4, 5 그리고 6 kGy의 감마선 (^{60}Co)을 조사한 후 (^{60}Co irradiator, AECL, dose rate : 920 Gy/hr), 1차로 *C. albicans*에 대한 항진균 활성이 결핍된 돌연변이 균주를 조사하고 최종적으로 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성 결핍을 확인하였다.

4. 단백질 분획의 항진균 활성 분석

500 ml NB (nutrient broth, Difco, USA) 배지에 12시간 액체배양 후, 3,000 rpm, 20분간 원심분리하여 균체와 배양액을 분리하였다 (Centrifuge MF-80, Hanil Science Industrial Co.). 균체는 2 ml tube에 넣고 12,000 rpm, 10분간 원심분리하여 배양액을 완전히 제거한 후, protein extraction buffer (0.5 M Tris-HCl pH 8.3, 2% NP-40, 20 mM MgCl_2 , 2% 2-mercaptoethanol, 1% polyvinyl pyrrolidone (PVPP))를 1 ml 첨가한 후 mini-bead beater (Biospec Products Co.)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 이것을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액에 acetone이 80% 되도록 첨가한 후, -20°C에 10분간 넣은 후 다시 원심분리하여 단백질을 회수하였다 (Kim *et al.* 2001).

1 mg의 단백질을 500 μ l의 ddH₂O에 녹여, Microcon centrifugal filter devices (Millipore Co.)를 이용하여, 100 kDa <, 100~50 kDa, 50~30 kDa, 30~3 kDa, 그리고 3 kDa >의 5구간으로 분액하였다.

5. 1차 IEF 및 2차 SDS-PAGE

이차전기영동은 O'Farrell (1975)의 방법을 변형하여 실시하였다. 세포로부터 추출한 단백질 200 μ g을 sample lysis buffer (9.5 M urea, 2.4% NP-40, 3% ampholyte, 0.12 M DTT)에 녹여 1-DE로 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 H₃PO₄로 하여 250 V 30분, 300 V 30분, 400 V 30분간 전

기영동을 한 후 600 V 16시간, 800 V 3시간 동안 전기영동하였다. IEF gel을 뽑은 후 5 ml equilibration buffer (2.5% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.125 M Tris (pH 6.8))에 넣어 30분간 교반한 후 2-DE로 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였다 (Davis *et al.* 1964). Separation gel은 13%, stacking gel은 4%의 acrylamide를 이용하였고, 전개 완충용액은 25 mM Tris (pH 8.3), 195 mM glycine 및 1% SDS (Bio-Rad. Co.)을 이용하여 70 V 18시간 동안 전개하였다. 이차전기영동 후, gel은 Helmut 등 (1987)의 방법에 따라 고정액 (50% methanol, 10% acetic acid)으로 고정하고 silver staining을 하였다. 건조 전, gel은 상온에서 1시간 동안 50% methanol에서 교반시켰다.

6. 아미노산 서열 분석

이차 전기영동한 젤을 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 mini Trans-blot Cell (Bio-Rad Co.)를 이용하여 transfer 하였다. 완충액은 25 mM Tris (pH 8.3), 195 mM glycine, 20% methanol를 사용하였으며, 100 mA 12시간 동안 transfer하였다. PVDF membrane은 0.3% Ponceu-S에 5분간 염색 한 후 ddH₂O로 탈색하여 원하는 spot을 회수하였다. Amino acid N-terminal sequencing은 Procise 491 Protein sequencing system (Applied Biosystems, KBSI)으로 하였으며, sequence는 NCBI (The National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)로 유사성을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 항진균 세균 SAR01 strain의 분리

미역류로부터 14종의 균주를 분리하였으며, 1차적으로 *C. albicans*에 대한 항진균 활성 조사 결과, No. 10균주가 항진균 활성을 보여 SAR01로 명명하였다 (Fig. 1). 분리된 SAR01을 FAME 분석 결과, *Streptomyces* sp.로 동정되었다. SAR01 균주는 사상성이었으며, 액체 배양시 성장체가 입자성으로 침전되는 현상을 보였다. 따라서 SAR01 균주는 생물반응기를 이용한 대량생산시 회수가 쉬운 큰 장점을 지닌 것으로 판단된다.

2. 감마선 (⁶⁰Co)을 이용한 항진균 활성 결핍 돌연변이 유도

SAR01의 항진균 활성 관련 유전자를 탐색하기 위해

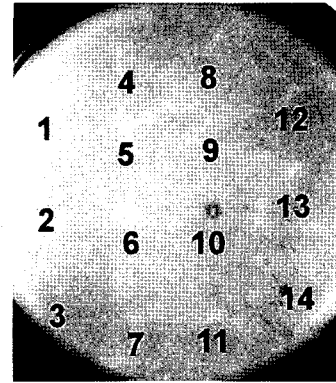


Fig. 1. Antifungal activity of isolated bacteria from seaweed against *C. albicans* Strain of No. 10 showed antifungal activity against *C. albicans* lawn.

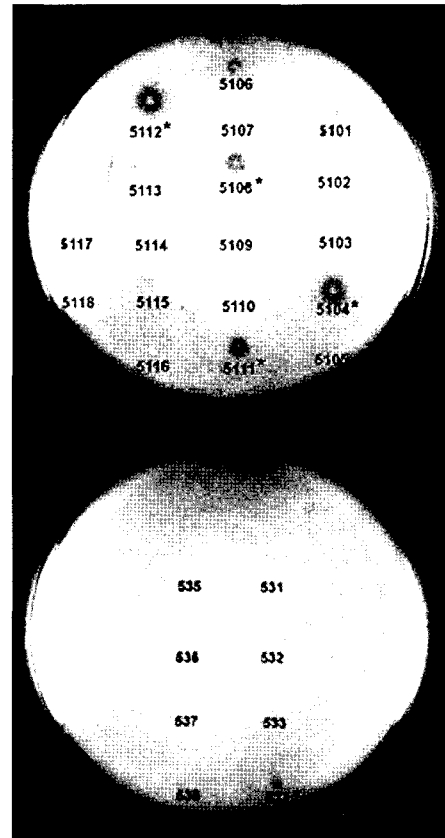


Fig. 2. Antifungal activity deficient mutants of SAR01 against *C. albicans* by radiation (⁶⁰Co). * : mutant that still have antifungal activity.

SAR01 균주를 petri dish상에 도말하여 방사선을 조사한 결과, 5 kGy의 방사선 조사선량 이하에서만 생존하였다. 생존한 26개의 colony를 대상으로 *C. albicans*에 대

Table 1. Antifungal spectra of SAR01 and its radiation induced mutants against several plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Antifungal activities							
	SAR01	SAR534	SAR535	SAR536	SAR5108	SAR5112	SAR5113	SAR5118
<i>P. grisea</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. gloeosporioides</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. solani</i>	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cinerea</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>A. alternata</i>	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>P. capsici</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>P. ultimum</i>	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>M. melonis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. dothidea</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>S. sclerotiorum</i>	+	+	-	+	-	+	+	-

+ : positive, - : negative

한 항진균 활성을 확인한 결과, 21개의 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주를 얻을 수 있었다(Fig. 2).

이들 21종의 돌연변이 균주 중 7종의 돌연변이 균주에 대해서 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성 스펙트럼을 조사한 결과, Table 1과 같이 나타났다. 야생형인 SAR01 균주는 7종의 식물병원성 진균에 대한 성장 억제 능력이 있으나, 방사선에 의해 유도된 7종의 돌연변이 균주 중, SAR535와 SAR5108의 두 돌연변이 균주는 야생형에 비해 5종의 진균에 대한 성장억제 활성을 상실하였으며, SAR536 돌연변이 균주는 야생형에 비하여 항진균 활성 스펙트럼의 크기는 달라지지 않았다. *Pyricularia grisea*와 *Colletotrichum gloeosporioides* 두 진균에 대해서는 SAR5118 돌연변이 균주만 항진균 활성을 나타내지 않았다. 이와 반대로 SAR5113 돌연변이 균주와 SAR534 돌연변이 균주는 야생형 균주에 비하여 2종의 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성을 새로이 나타내었다. 이러한 결과는 방사선조사가 기능적으로 다양한 항진균성 돌연변이를 유도할 수 있음을 보여준다.

3. SAR01 야생형과 돌연변이체의 세포내 단백질의 항진균 활성

감마선 조사로 유도된 돌연변이 균주의 단백질 변화 양상을 분석하기 위하여 8개의 돌연변이 균주의 세포내 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 이용하여 야생형인 SAR01 균주와 비교 분석하였다(Fig. 3). 그 결과, 항진균 활성이 있는 균주에서만 46.5, 25, 22.3 kDa의 분자량을 갖는 protein band가 존재했으며, 또한 전체적으로 75 kDa >, 22.7~16.0 kDa, 10.5 kDa <에서 단백질의 분포 차이가 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 이들 돌연변이체들은 감마선 조사에 의해 항진균 활성이 변하였으며, 단

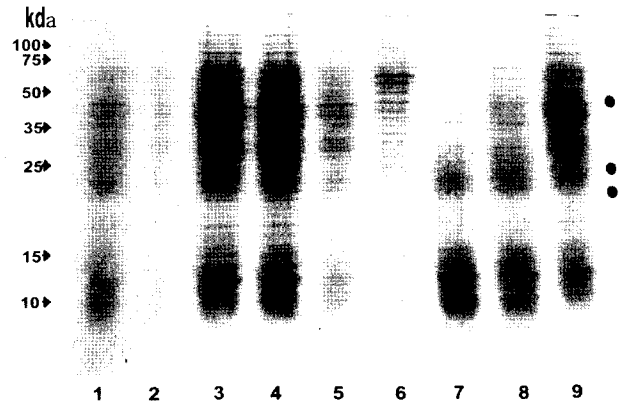


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of radiation-induced SAR01 mutants and SAR01.

Nine lanes (1: SAR01, 2: SAR534, 3: SAR536, 4: SAR5112, 5: SAR5113, 6: SAR5118, 7: SAR535, 8: SAR5108, 9: SAR5110)

• : These are protein bands only found at antifungal strain.

백질 분포의 차이가 나타나는 부분에 항진균 활성과 관련된 단백질이 존재할 것으로 사료된다.

SAR01, SAR534, SAR535 그리고 SAR536의 세포내 단백질을 물에 녹여 *C. albicans*에 대한 항진균 활성 검정 결과, SAR01 야생형 균주 및 SAR534 돌연변이 균주만이 항진균 활성을 나타냈다(Fig. 4-A). 이 결과는 앞서 *C. albicans*에 대한 항진균 활성 검정 결과와 일치하는 것이며, 또한 SAR01의 항진균성 물질의 전체 또는 일부가 단백질임을 시사한다.

SAR01의 항진균 활성 단백질의 분자량을 알아보기 위해 분자량별로 분획하여 *C. albicans*에 대한 항진균 활성 검정 결과, 50~100 kDa 사이의 단백질 분획에서는

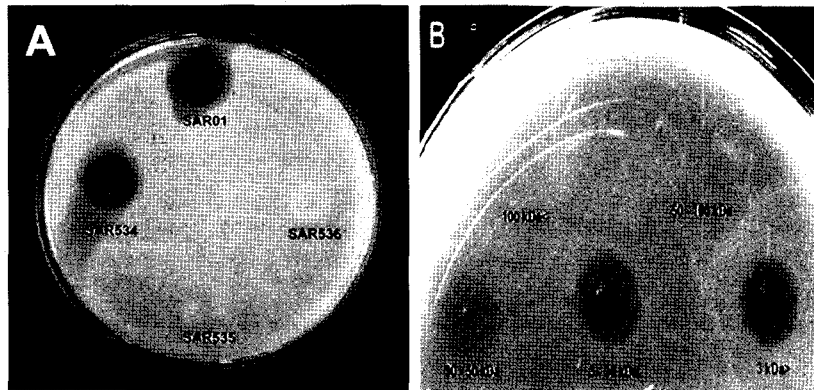


Fig. 4. Antifungal activities of intracellular proteins against *C. albicans*.
 A: Crude proteins from SAR01, SAR534, SAR535 and SAR536. B: Fractionated proteins with different molecular weight from SAR01.

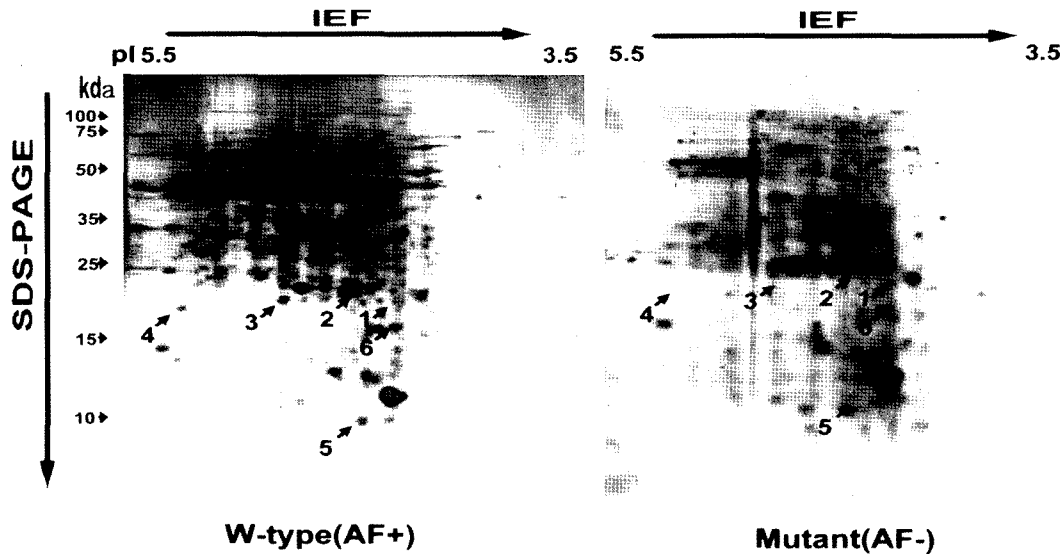


Fig. 5. Comparison of 2-D electrophoresis patterns of intracellular proteins between SAR01 (AF+) and SAR535 (AF-).

항진균 활성이 없었으며, 3~30 kDa 사이의 단백질 분획에서 강한 활성을 나타냈다(Fig. 4-B). 이를 통해 SAR01의 항진균 활성 단백질은 3~30 kDa 사이에서 가장 많이 존재할 것으로 사료된다.

이상의 결과로 볼 때 SAR01 균주의 항진균 활성 관련 단백질은 주로 25 kDa 이하의 분자량을 가진 것으로 사료된다.

4. 항진균 활성 단백질의 분리 및 동정

SAR01과 항진균 활성 스펙트럼에 큰 변화를 보인 SAR535 돌연변이 균주의 세포내 단백질의 변화양상을

비교하였다. 이차원 전기영동 결과, 6개의 차이는 spot을 확인하였다(Fig. 5). 이들 6종 단백질들은 pI 값에 따라 넓게 분포되어 있으나 그중 4종은 pI 4.33~pI 4.83 부근에서 주로 존재하였으며, SAR01의 5종 단백질 spot들은 15~20 kDa의 분자량 범위에 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 위의 *C. albicans*에 대한 단백질의 항진균 활성 결과와 유사하며(Fig. 4-B), SAR01 균주에서만 나타나는 spot들이 항진균 활성에 관련되어 있음을 시사한다.

야생형인 SAR01 균주에 존재하는 6종의 단백질을 회수하여 아미노산 서열을 분석한 결과, 5종은 *Streptomyces coelicolor*로부터 유래한 단백질인 heat shock pro-

Table 2. N-Terminal sequence of proteins only found in wild type strain fraction (SAR01)

Polypeptides (Spot No.)	N-Terminal sequence	Size (kDa)	pI	BLAST X search	% Similarity
1	AKILFMFQLTGLPPAXGGVXQDX	19.78	4.33	HSP70	75
2	NS	20.65	4.50	-	-
3	ALYTLPELPYDYAALLPVIIXEEIXL	20.22	4.83	FeSOD II	93
4	MIETLLEAEKMEKAVLVAKEDFAAIRTGRAHPA	18.91	5.33	RRF	100
5	TTTSSKVAIKPLEDRIVVSPDLAEQTTA	10.00	4.50	GroES	96
6	MEFDVXIEIPKG	16.31	4.33	PPase	83

HSP70 : heat shock protein 70, FeSODII : Fe-containing superoxide dismutase II, RRF : ribosome recycling factor, PPase : inorganic pyrophosphatase, NS : not sequenced.

tein 70 (HSP70), Fe-containing superoxide dismutase II (Fe-SODII), ribosome recycling factor (RRF), 10 kD chaperonin (GroES) 및 inorganic pyrophosphatase (PPase)와 각각 75%, 93%, 100%, 96% 및 83%의 유사성을 보였다 (Table 2).

Spot 1의 HSP70 단백질은 heat shock과 같은 stress 자극에 의해 유도되어지는 것으로 잘 알려져 있으며 체내에 농축이 되면 세포괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Ikeyama *et al.* 2001). HSP70 계열의 chaperon은 folding되지 않았거나 일부 folding된 단백질에 결합하여 misfolding이나 뭉치는 것을 방지한다. 또한 multi protein structure의 구조를 만들거나 해제하여 막을 통한 단백질의 이동에 필수적인 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Han and Christensen 2001; Jaattela 1999; Minowada and Welch 1995). Spot 3의 Fe-SODII는 superoxide radical을 H₂O₂와 산소분자로 촉매작용하여 모든 호기성 생물의 산소독성에 대한 방어 기능을 제공한다 (Chung *et al.* 1999; Fridovich 1995). Fe-containing superoxide dismutase는 세균과 미토콘드리아에서 발견되나, 주로 원핵생물의 세포질이나 원시 진핵생물과 일부 녹색식물에서 발견된다 (Kang *et al.* 1998; Fridovich 1978). Spot 4의 ribosome recycling factor (RRF)는 단백질 합성시, elongation factor와 함께 단백질 folding을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Janosi *et al.* 1998; Ryoji *et al.* 1981). Spot 5의 10 kDa의 chaperonin인 GroES는 진핵생물과 여러 속의 세균에서 발견되는 진화적으로 보존적인 heat shock 단백질의 일원으로서 주로 단백질의 folding과 assembly를 촉진하며, *Mycobacterium tuberculosis*에서의 실험결과에서 전사 조절자로서 작용하는 예도 보고되고 있다 (Legnema *et al.* 1996). 또한 GroES는 mycobacteria에 의해 대량으로 분비되며 immunodominant antigen으로 보고 되었다 (Cobb *et al.* 1999). Spot 6의 PPase는 이인산에서 일인산으로의 가수분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 촉매

시, 2가 금속이온을 필요로 하며 Mg²⁺이온과는 매우 높은 활성을 갖는다. 식물이나 일부 세균에는 수용성의 PPase와 막결합성의 PPase가 존재하며 양방향의 양성 자펌프 기능이 작동되는 것으로 알려져 있다 (Sivua *et al.* 1999; Shintani *et al.* 1998; Shimizu *et al.* 1997).

본 연구에서 분석된 5종의 단백질 중, HSP70, RRF 그리고 GroES 3종의 단백질이 folding에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에, *Streptomyces sp.* SAR01의 항진균 활성은 이들에 의한 단백질 folding과 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

적 요

항진균 활성 관련 단백질을 탐색하기 위해 미역류로부터 식물병원성 곰팡이의 성장을 저해하는 SAR01 균주를 분리하였고, FAME (fatty acid methyl ester) 분석 결과, *Streptomyces sp.*로 동정되었다. 방사선 조사 (⁶⁰Co)를 실시한 결과, *Botrytis cinerea*를 포함한 5종의 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성을 소실한 SAR535 균주 외 6종의 돌연변이 균주가 유도되었다. SAR01 야생형 균주와 SAR535 돌연변이 균주의 세포내 단백질의 이차원 전기영동 분석결과, 6종의 단백질이 야생형 균주인 SAR01 균주의 세포내에만 존재하였다. 이들 6종의 단백질 중, 5종은 heat shock protein 70 (HSP70), Fe-containing superoxide dismutase II (Fe-SODII), ribosome recycling factor (RRF), 10 kD chaperonin (GroES) 및 inorganic pyrophosphatase (PPase)와 각각 75%, 93%, 100%, 96% 및 83%의 유사성을 보였다. 이들 6종의 단백질들은 *Streptomyces sp.* SAR01 균주의 항진균 활성과 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환

으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Chet I, R Shapira, A Ordentlich and AB Oppenheim. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant Soil* 129:85-92.
- Cobb AJ and R Frothingham. 1999. The GroES antigens of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vert. Microbiol.* 67:31-35.
- Chung H-J, E-J Kim, B Suh, J-H Choi and J-H Rol. 1999. Duplicate genes for Fe-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Gene* 230: 87-93.
- Dempsey DMA, H Silva and DF Klessig. 1998. Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends Microbiol.* 6:54-61.
- Dives BJ. 1964. Disc electrophoresis-II: method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121:404-427.
- Franklin TJ, GA Snow, KJ Barrett-Bee and RD Nolan. 1989. Antifungal, antiprotozoal and antiviral agents. pp.137-161. *In Biochemistry of Antimicrobial Action.* 4th ed. Chapman & Hall Ltd., New York.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 20:875-880.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.
- 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 Letters* 497:55-58.
- 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 HJ Gross. 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- 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.
- Janosi L, S Motagui-Tabar, LA Isaksson, Y Sekine, E Ohtsubo, S Zhang, Scarlett Goon, Sarah Nelken, Masahiro Shuda and Akira Kaji. 1998. Evidence for in vivo ribosome recycling, the fourth step in protein biosynthesis. *The EMBO J.* 17:1141-1151.
- Jaattela M. 1999. Heat shock proteins as cellular life-guards. *Ann Med.* 31:261-271.
- Jiang CL and LH Xu. 1996. Diversity of aquatic *Actinomycetes* in lakes of the middle plateau, Yunna, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:249-253.
- Kang SK, YJ Jung, CH Kim and KY Song. 1998. Extracellular and cytosolic iron superoxide dismutase from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Diagnos. Lab. Immun.* 784-789.
- Kim BS, JY Lee and BK Hwang. 1998. Diversity of *Actinomycetes* antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. *J. Microbiol.* 36:86-92.
- Kim ST, KS Cho, YS Jang and KY Kang. 2001. Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 22:2103-2109.
- Kondoh K, T Koshiba, A Hiraoka and M Sato. 1998. γ -Irradiation damage to the tonoplast in cultured spinach cells. *Environ. Exp. Bot.* 39:97-104.
- Lechevalier MP. 1988. *Actinomycetes* in agriculture and forestry. pp.327-358. *In Actinomycetes in Biotechnology.* M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski (ed), Academic Press Inc., New York.
- Lee YK, HH Chang, JS Kim and KS Lee. 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. *Radiat. Phy. 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.
- Minowada G and WJ Welch. 1995. Clinical implications of the stress response. *J. Clin. Invest.* 95:3-12.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- Ouhdouh Y, M Barakate and C Finance. 2001. *Actinomycetes* of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 37:69-74.
- Ryoji M, JW Karpen and A Kaji. 1981. Further characterization of ribosome releasing factor and evidence that it prevents ribosome from reading through a termination codon. *J. Biol. Chem.* 256:5798-5810.
- Shimizu T, I. Mizuhiro, S Araki, K Kishida, Y Treasawa, and A Hachimori. 1997. Some properties of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:303-310.
- Sintani T, T Uchiumi, T Yonezawa, A Salminen, AA Baykov, Reijo Lahti and Akira Hachimori. 1998. Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes. *FEBS Letters* 439:263-266.

- Sivua T, A Salminen, AN Parfenyev, P Pohjanjoki, A Goldman, BS Cooperman, AA Baykov and R Lahti. 1999. Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters* 454:75-80.
- Tanaka YT and S Omura. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:57-87.
- Weller DM. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
- Yun DJ, RA Bressan and PM Hasegawa. 1997. Plant antifungal proteins. pp.39-88. *In Plant breeding rev.* 14. Wiley, New York.

(Received 15 July 2002, accepted 5 August 2002)