

Bacillus sp. N32 균주가 생산하는 항균 단백질 특성

이미혜 · 박인철 · 여윤수 · 김수진 · 윤상홍 · 이석찬¹ · 정태영¹ · 구본성*

농촌진흥청 농업생명공학연구원 미생물유전과, ¹성균관대학교 유전공학과

요약 : 작물 근권 토양으로부터 분리한 5,000여 길항 균주로부터 *Erwinia* 및 *Pseudomonas* 등의 세균과 *Trichoderma*, *Colletotrichum* 등 곰팡이의 성장을 동시에 억제하는 *Bacillus* sp. N 32 균주를 선발 동정 하였다. 특히 *Bacillus* sp. N32 균주는 고추 탄저병균인 *Colletotrichum gloeosporioides*에 대하여 열에 저항성이 있는 단백질과 열에 민감한 단백질의 2종류의 항균 단백질을 동시에 생산함을 단백질 침전과 활성 검정을 통하여 확인하였다. 이 항균 단백질들을 FPLC를 이용한 gel filtration chromatography 방법으로 분리한 후 SDS-PAGE와 bioautography로 항균력을 확인하였다. 또한 이 항균 단백질의 유전자들을 선발하기 위하여 기존의 알려진 그람양성 세균의 대표적인 열 저항성 항균 펩타이드 생합성 유전자 서열을 primer로 이용한 PCR 방법으로 fengycin의 생합성 유전자 단편을 분리하고 이 PCR 산물을 이용하여 *Bacillus* sp. N32 균주의 cosmid library로부터 fengycin의 생합성 유전자 cluster 중 일부를 분리하여 염기서열을 분석 하였다. 또한 열에 민감한 항균 단백질 생산 유전자는 이 항균 단백질을 SDS-PAGE 및 electroblotting으로 분리한 뒤 N-terminal 부위의 15개의 아미노산 서열을 분석하고 이를 DNA 염기배열로 치환한 다음 probe로 이용하여 λ -ZAP library로부터 항균 단백질 생산 유전자가 포함된 다수의 clone을 선발 하였다.(2005년 10월 25일 접수, 2006년 3월 20일 수리)

색인어 : 고추 탄저병균, 아미노산 서열, 항균 펩타이드, 포화도, fengycin 생합성 유전자, cosmid library, *Rhizobacteria*, λ -ZAP library.

서 론

우리나라에서 농작물의 병, 해충을 방제하기 위하여 현재 가장 많이 사용되는 방법은 화학적 방제방법이다. 화학적 방제는 병원균이나 해충을 직접 죽이는 효과가 빨리 나타나고 사용하기 쉬운 반면에 약제 저항성을 유발시키고 토양 및 수질오염을 야기 시키는 등 여러 가지 환경오염도 유발한다. 따라서 환경 친화적이며 약제 저항성을 유발할 염려가 없는 병해충 방제에 효과적인 새로운 개념의 항생 물질 또는 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Handelman *et al.*, 1998).

이러한 연구는 다양한 기능을 가진 미생물을 이용하여 1900년대 이후부터 본격적으로 연구되기 시작하였으며(Alison *et al.*, 1991 ; Whitman *et al.*, 1998 ; Alexandra *et al.*, 2004) 우리나라에서도 지금까지 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 길항 미생물을 이용한 최초의 생물학적 방제제로 상품화된 *Agrobacterium tumefaciens* 균주는 현재까지도 과수 근두암증병의 방

제제로 세계적으로 널리 사용이 되고 있다(Kerr, 1980). 이와 같은 환경 친화적인 식물병 방제법의 또 다른 연구방향은 항균작용의 범위가 매우 넓으며 산, 알칼리 및 열처리 등에 거의 영향을 받지 않는 등 장점이 많은 저분자 항균 peptide에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Kleinkauf *et al.*, 1996).

일반적으로 항균작용을 하는 저분자 항균 펩타이드는 그 생합성 기작에 따라 ribosomal peptide antibiotics와 nonribosomal peptide antibiotics의 두 종류로 구분이 되는데 90% 이상이 nonribosomal peptide antibiotics로 multienzyme complex에 의해 생합성이 된다고 알려져 있다(Maget *et al.*, 1994 ; Valentina *et al.*, 1997).

본 연구에서는 작물 근권 토양에서 분리 동정한 *Bacillus* sp. N32 균주가 고추 탄저병균인 *C. gloeosporioides*의 성장을 강하게 억제하는 열에 저항성인 항균 단백질과 열에 민감한 항균 단백질을 동시에 생산함을 확인하고 이 항균 단백질을 분리하여 그 항균역가를 검정하고 항균 단백질 생산에 관련된 유전자를 유전자은행으로부터 분리하고 몇 가지 결과를 얻었기에 보고 하고자 한다.

*연락처자

재료 및 방법

균주선발 및 사용배지

본 실험에 사용된 *Bacillus* sp. N32 균주는 경남북 및 전남북 농업기술센터 포장의 작물 근권 토양으로부터 분리한 5,000여 균주 중 고추 탄저병원균 *C. gloeosporioides* KACC 4077에 강력한 항균력을 지닌 길항균주를 1차 선발한 후 4일까지 배양 일수별로 각각 배양한 배양액을 4°C 냉장고에 보관 하였다가 함께 항균력을 검정하여 항균물질을 꾸준히 지속적으로 분비하는 균주를 공시균주로 선발 하였으며 이 균의 증식은 Trytic Soy Broth(TSB; Pancreatic Digest of Cassein 17 g, Papaic Digest of Soybean Meal 3 g, Sodium Chloride 5 g, Dipotassium Phosphate 2.5 g, Dextrose 2.5 g, Distilled water 1L) 배지에서 28°C, 24 시간 동안 배양하여 사용하였고 곰팡이인 고추 탄저병원균은 Potato Dextrose Agar(PDA, Difco) 배지에서 25°C의 조건으로 증식시켜 사용하였다.

길항력 검정

작물의 근권 토양으로부터 분리한 균주들을 96 well의 multiblock (Qiagen)에 TSB 액체배지 2 mL을 분주한 후 접종하여 28°C에서 16~24 시간 배양하였다. 배양된 균주들을 96 pin replica를 이용하여 TSB agar배지에 배양한 다음 *C. gloeosporioides*의 포자가 10^3 /mL 농도로 첨가된 0.7% PDA top agar를 7 mL가량 증충하여 28°C에서 24시간 배양한 후 저지원의 생장 여부를 관찰하여 항균력을 검정하였다.

공시균주의 동정

공시균주를 동정하기 위하여 먼저 Biolog System을 이용하여 지방산 조성을 검정하였다, TSA 배지에 접종한 공시균주를 28°C에서 24시간 배양한 후 50-100 mg의 균체를 15 mL tube에 모았다. 여기에 1 mL의 용액 I (NaOH 45, MeOH 150 mL, deionized water 150 mL)을 첨가하여 saponification 시키고 2 mL의 용액 II (6N HCl 325 mL, MeOH 275 mL)을 첨가하여 methylation 시킨 다음 1.25 mL의 용액III (Hexane/Methyl tert-Butyl Ether(1/1))을 첨가하여 10분간 잘 혼합한 후 상층액에 추출된 fatty acid methyl ester를 제외한 하층액을 조심스럽게 제거하고 3 mL의 용액 IV (NaOH 10.8 g, deionized water 900 mL)을 첨가한 후 5분간 혼합하여 상층액 만을 Gas Chromatography (GC)분석에 사용하였으며 공시균주의 16S rDNA region은 fd1

(5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')과 rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용하여 증폭한 후 PCR 산물의 염기서열을 직접 분석하여 GenBank의 data와 비교 분석하여 분류 동정하였다. 또한 API20 NE Kit(bioMerieux Inc.)를 이용하여 공시균주의 생화학적 특성을 조사하였다.

항균 조 단백질의 분리

공시균주를 TSB 배지에 접종하고 28°C에서 3일간 배양하여 원심분리 한 후 0.8 포화도의 Ammonium sulfate를 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 원심분리 하여 항균 조 단백질을 침전시켰다. 침전된 조단백질은 1000 x g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물만 수거하여 pH 7.0인 phosphate 완충액에 녹여 사용하였으며 동일한 방법으로 Ammonium sulfate 포화도 별로 항균 조 단백질을 분리하여 길항력을 검정하였다. 또한 Ammonium sulfate로 침전시킨 조 단백질을 FPLC(Applied Biosystem Co.)를 이용한 gel filtration chromatography로 항균 단백질을 분리하였다.

Bio-autography

조 단백질의 항균력을 확인하기 위해 10 ~ 20% polyacrylamid gel에 시료를 10 uL와 100 uL씩 두 번 복으로 전기영동을 실시한 후 10 uL씩 전기영동 한 gel을 coomassie blue에 염색한 후 탈색하였고 100 uL씩 전기영동 한 gel은 triton X -100과 PDB에 20분간 세척하였다. 세척이 끝난 한쪽 gel을 150 x 150mm 사각 petri-dish 상에 기포 없이 수평으로 놓고 UV로 살균 후 48°C PDA top agar에 고추 탄저병원균 포자를 10^3 /mL 농도로 잘 혼합한 후 polyacrylamide gel위에 고르게 부어 굳힌 다음 28°C에서 배양하여 *C. gloeosporioides*에 대하여 생육을 억제 시키는 단백질 밴드를 염색액에 염색한 gel과 비교하여 확인하였다. 항균 단백질의 아미노말단 아미노산 서열 분석

Amino acid sequencing을 하기 위하여 분리 정제된 항균 단백질을 SDS 전기영동 한 후 acrylamide gel을 분리하여 100 mL의 electroblotting buffer (10 mM CAPS in 10% methanol)에 5분간 침지시켜 두고 Millipore사 제품의 Immobilon-P Transfer Membrane을 100% methanol에 수초 동안만 완전히 적셨다가 CAPS buffer에 옮겨 놓은 다음 sponge, filterpaper, transfer membrane, gel, filter paper, sponge순으로 카세트에 장착하여 electroblotting buffer에서 50 voltage로 30분간

전기영동 하였다.

Electroblotting이 끝난 transfer membrane을 3차 증류수로 짧게 씻어준 후 100% methanol에 수초 동안 침지하였다가 staining solution에 1분간 염색하였다. 염색된 transfer membrane은 destaining solution과 3차 증류수로 충분히 씻어준 뒤 3MM paper위에 놓고 물기를 완전히 말린 다음 항균력을 확인한 단백질 밴드만을 깨끗한 면도날을 이용하여 절단하였으며 이를 기초과학 지원센터에 의뢰하여 amino acid sequencing을 실시하였다.

Primer 제작 및 Polymerase Chain Reaction

열에 저항성인 항균 단백질 생합성 유전자를 분리하기 위하여 사용된 primer는 1998년도에 Lee등이 개발하여 보고한 core 1 sequence (5'- TTT AAR GCR GGC GGI TAT GTG CGG ATY GAY CC-3')와 core 2 sequence (5'- ATI TAY ACI TCY GGI ACI ACA GGI AAG CCA AAA GG-3')를 인공합성 하여 이용하였다. PCR 반응은 genomic DNA를 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 30°C에서 1분30초, 72°C에서 2분간 34 cycle로 PCR을 수행하였으며 증폭된 PCR 단편은 pGEM- T easy vector (Promega)에 cloning하여 사용하였다.

Library 제작

DNA 분리 및 유전자 은행제작은 Molecular Cloning (Cold Spring Harbor)에 수록된 방법으로 실시하였으며 (Sambrook et al., 1989) 분리한 genomic DNA를 제한 효소 *Sau3AI*를 이용한 부분절단 방법으로 절단하여 30 kb 이상의 DNA 조각은 Supercos vector(Stratagene Co.)를 이용하여 cosmid library를 제작하였고 12 kb이하의 DNA 조각은 λ -ZAP vector(Stratagene Co.)를 이용하여 phage library 제작에 이용하였다. 재조합된 유전자 확인은 IPTG를 첨가한 LB 평판 배지에서 흰색 콜로니의 형성으로 확인하였다

항균 유전자 선발 및 분석

제작된 cosmid library와 λ -ZAP library로부터 항균 단백질 생산 유전자를 선발하기 위한 colony hybridization 및 plaque hybridization 방법은 molecular cloning 방법에 준하여 실시하였다.

Hybridization 조건은 membrane을 prehybridization solution (6x SSC, 50x Denharts, 50 mM Tris-HCL, pH 8.0, 0.1% SDS, Carrier DNA)에 침지하여 65°C에서 2

시간 반응시킨 후 P^{32} 동위원소로 표지된 probe를 첨가하고, 다시 65°C에서 18시간 이상 hybridization 시켰다. Hybridization 된 membrane은 5x SSC, 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 30분, 1x SSC, 0.1% SDS 용액으로 30분, 0.5x SSC, 0.1% SDS 용액으로 30분간 washing 한 후 x-ray film에 24시간 노출시켜 동위원소에 강하게 감광되는 colony와 plaque들을 선발 하였다. 선발된 colony 및 plaque들의 DNA를 분리한 후 제한효소를 처리하여 삽입된 단편들을 전기영동으로 확인하고 삽입 DNA 염기서열을 결정하여 항균 유전자를 분석하였다.

결과 및 고찰

공시균주 선발

작물 근권 토양에서 분리한 5,000여 균주 중 고추 탄저병균 *C. gloeosporioides*에 길항력을 지닌 900여 길항균주를 1차로 선발하고 이 길항균주들 중 항균물질을 배양액 속으로 분비하는 8 균주를 2차로 선발하였다. 이 균주들이 항균물질을 지속적으로 분비하는지를 확인하기 위해 각각의 균주를 1일부터 4일까지 배양한 후 길항력을 측정된 결과 8균주 모두 3일 배양한 배양액에서 강한 길항력을 보였지만 42번 균주 경우는 배양일수에 따라 항균력이 줄어들거나 불규칙하였고 기타 6개 균주는 3일이 지나야만 길항력이 나타났으나 32번 균주는 3일까지 배양일수가 증가함에 따라 항균력이 더욱 강해지며 3일 이후에도 일정한 항균력을 지속적으로 유지함으로 N32번 균주를 최종 공시균주로 선발하였다 (그림 1).

균주의 동정

N 32번 공시 균주의 동정은 재료 및 방법에서 서술한 것처럼 MIDI system을 이용한 지방산 조성을 분석한 결과는 15:0 ISO (25.54%), 15:0 ANTEISO (37.74%), ISO 17:1 w10c (2.36%), 17:0 ANTEISO (8.67%)로 구성되었으며 data base를 조사한 결과 *B. amyloliquefaciens*와 0.699로 유사성이 가장 높았다.

또한 16S rDNA region 일부를 PCR 방법으로 cloning하여 염기서열을 분석한 결과 그림 2에서 보는바와 같이 *B. subtilis*, *B. atrophaeus* 및 *B. amyloliquefaciens* 등과 같은 그룹으로 분류가 되어 *Bacillus species group*으로 확인이 되었으나 부분적인 rDNA 염기서열만으로는 종 까지 정확히 구분하기에는 신뢰도가 떨어지므로 본 공시균주를 *Bacillus sp.* N32로 명명하였

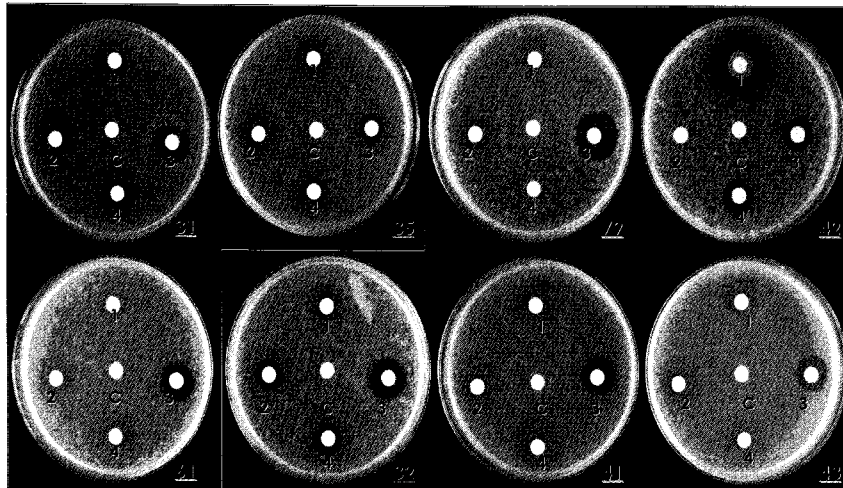


Fig. 1. Antifungal activity of rhizobacteria against *Colletotrichum gloeosporioides*. 1 : one day culture, 2 : two days culture, 3 : three days culture, 4 : four days culture

다. 본 공시균주가 가진 생화학적 특성 및 당 이용성은 table 1과 같다.

조 단백질의 항균력 검정

Bacillus sp. N32번 균주가 생산하는 조 단백질을 침전하여 회수한 후 항균력을 조사한 결과는 그림 3A

와 같다.

그림에서 보는 바와 같이 Ammonium sulfate 0.4 포화도로 침전시켰을 때가 단백질의 양이 가장 많았고 그 다음으로는 0.6, 0.2, 0.8 포화도 순으로 단백질량이 많았다. 그러나 항균력을 측정된 결과는 그림 3B에서 보는 것처럼 0.4 포화도에서 침전된 단백질에서

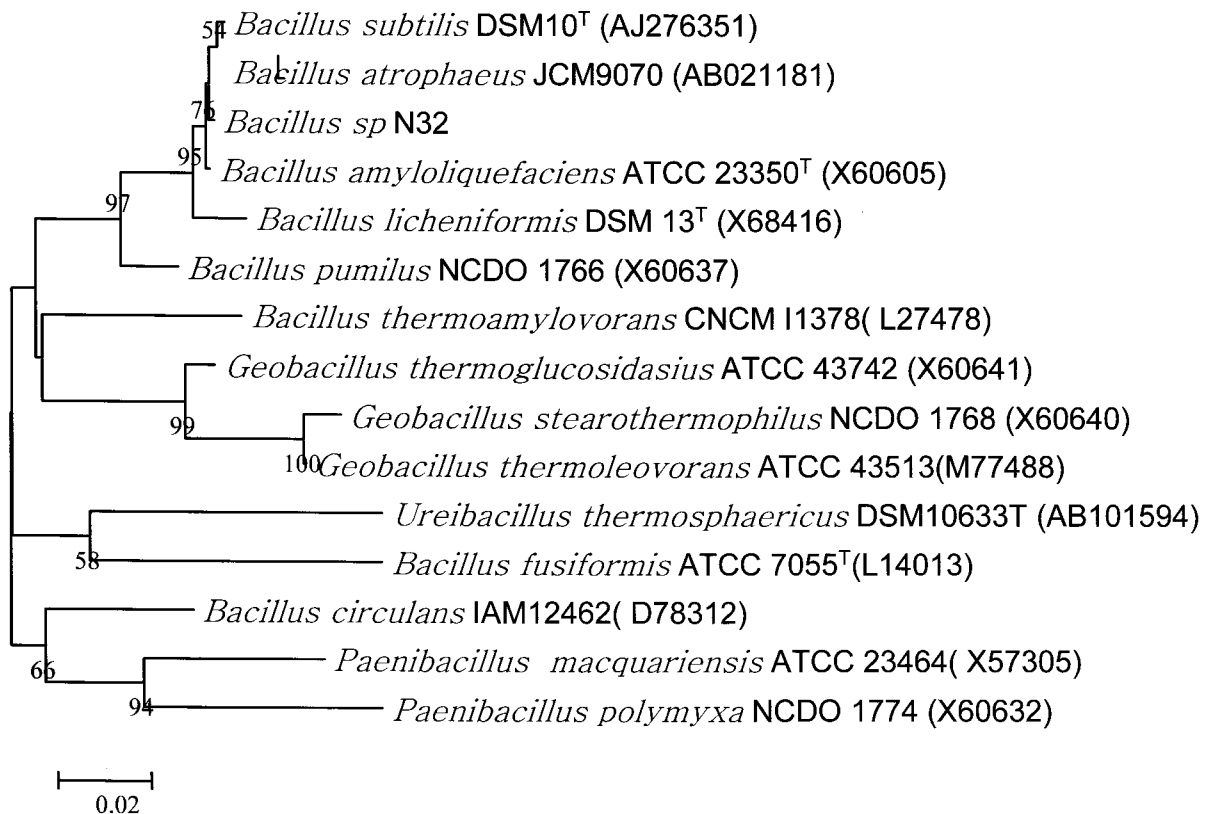


Fig. 2. Phylogenetic position of strain N32 analyzed by 16S rRNA gene. The scale indicates 0.02 change per nucleotide.

Table 1. Phenotypic characteristics of strain N32

Characteristics	Strain N32
Nitrate reduction	-
Indole production	-
Glucose fermentaton	-
Arginine dihydrolase	-
Urease	+
Aseculin hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
β -Galactosidase	+
Assimilation	
D-Glucose	+
L-Arabinose	+
D-Mannose	+
D-Mannitol	+
N-Acetyl-glucosamine	+
D-Maltose	+
Potassium gluconate	+
Capric acid	-
Adipic acid	+
Malic acid	+
Trisodium citrate	+
Penylacetic acid	-

대부분의 항균력이 나타났으며 그 다음으로 단백질량이 많았던 0.6 포화도에서는 항균력이 없는 반면에 단백질량이 적었던 0.2 포화도에서는 약하게나마 항균력이 나타남을 확인할 수 있었다. 이결과로 미루어 보아 본 공시균주가 생산하는 항균단백질은 Ammonium sulfate 0.4 포화도로 고추탄저병균에 항균력을 나타내는 대부분 단백질 균들을 분리할 수가 있음을 알 수 있었다.

항균 조 단백질의 열 안정성 검증

Bacillus sp. N32 균주의 항균 단백질을 Ammonium sulfate 0.4 포화도에서 회수하여 끓는 물에 10분간 열처리 한 후 길항력을 검정한 결과는 특이하게도 고추탄저병균인 *C. gloeosporioides* 에 대해서만 항균력이 12시간 정도 늦게 나타나며 항균력도 조금 감소함을 확인할 수 있었다(그림 4). 이와 같은 결과는 *Bacillus* sp. N32 균주가 생산하는 항균물질 속에는 열에 저항성이 있는 단백질 이외에 고추 탄저병원균에만 특이적으로 작용하는 열에 민감한 항균 단백질이 함께 존재하는 것으로 추정 할 수 있었다.

항균 단백질의 분리

Ammonium sulfate 0.4 포화도로 침전시켜 투석한

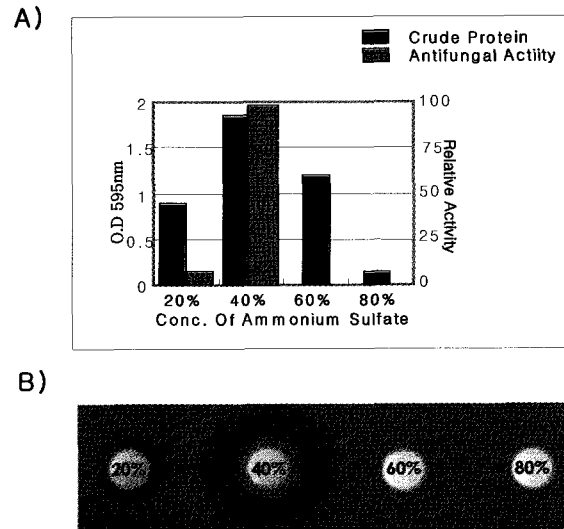


Fig. 3. A : Yield of crude protein precipitated with different Ammonium sulfate saturation. B : Antifungal activity of crude protein.

항균 단백질을 열처리 한 단백질과 열처리하지 않은 단백질을 동일한 조건으로 FPLC(Applied Biosystem Co.)를 이용하여 gel filtration한 결과는 그림 5A 에서 보는 것처럼 열처리를 한 단백질은 열처리하지 않은 단백질에 비하여 첫 번째 peak가 거의 없어지는 뚜렷한 차이 외에는 두 번째 피크가 조금 감소되고 세 번째 피크는 조금 증가하는 정도의 양상을 보여주었다. 그러나 변화를 보인 첫 번째 피크 부분의 단백질이 열에 민감한 단백질일 것으로 추정하고 항균력을 검정하였으나 이 부분은 항균력과 관계가 없었으며 두 번째 피크의 뒷부분에서 항균력이 나타났다. 이결과를 종합해 보면 열에 민감한 단백질은 두 번째 피크 부분에 열에 저항성인 단백질과 같이 미량으로 존재하며 이 결과 열을 가하면 두 번째 피크가 조금 줄어드는 현상을 보여 주는 것으로 판단할 수 있었다. 이와 같은 결과는 두 번째 피크에서 받은 각각의 단백질 분획에 대한 항균력을 측정한 그림 5B 에서도 확인할 수가 있었다.

그림에서 보는 것처럼 열에 강한 주 분획의 항균력도 조금 줄어들었지만 화살표 한 분획의 항균력이 약해졌음을 알 수 있어 이 분획의 단백질이 열에 민감한 주 단백질일 것으로 추정되었다.

SDS-PAGE 및 Bioautography

열에 강한 단백질과 열에 약한 단백질을 각각 SDS-PAGE로 전기영동하고 bioautography로 항균력을

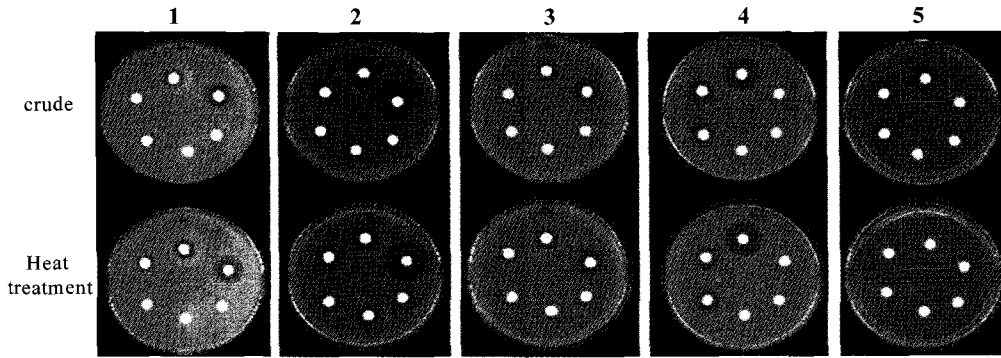


Fig. 4. Photographs of antimicrobial activity against plant pathogens.

1: *Bacillus* 6633, 2 : *Erwinia*, 3 : *Pseudomonas*, 4 : *Trichodelma*, 5 : *Colletotrichum*
 Square box indicates antifungal activity of heat sensitive protein against *Colletotrichum*.

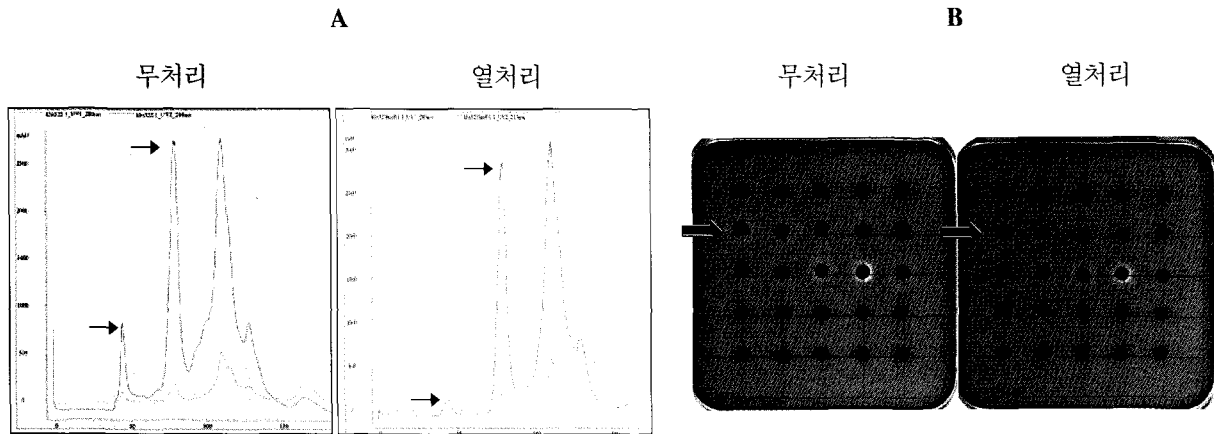


Fig. 5. A. Chromatogram of antifungal protein by FPLC. B. Antifungal activities of gel filtration fractions.

확인한 결과는 그림 6A와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 열에 강한 단백질은 전형적인 단백질 형태와는 다른 형태의 밴드가 확인되었으며 bioautography로 항균력을 조사한 결과 이 단백질 군에서 강력한 항균력을 보임을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 형태의 단백질 밴드가 형성되는 이유는 SDS-PAGE 전기영동시에 작은 분자량의 peptide들이 SDS, tracking dye 등과 뭉쳐서 전형적인 단백질의 밴드와는 다른 형태를 띠게 된다고 알려져 있다. 그러나 열에 민감한 단백질은 열처리를 하지 않고 SDS-PAGE를 수행한 후 bioautography로 항균력을 확인한 결과 그림 6B에서 보는 바와 같이 전형적인 단백질 형태의 밴드를 보여주었고 열에 저항성인 단백질 군에 비하여 많이 약하지만 역시 항균력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

이 결과를 미루어 보아 본 공시 균주가 생산하는 항균 단백질은 열에 저항성인 펩타이드성 단백질과 열에 민감한 단백질의 두 가지 단백질을 동시에 생산하는 것을 확인 할 수 있었고 SDS-PAGE 상에서 그

분자량도 비슷한 것으로 나타났다. 그 이유는 열에 안정한 펩타이드성 단백질은 보통 β-병풍구조를 띄고 있어서 그림6의 A와 같이 뭉쳐서 나타나며 실제 Tris-tricine 방법으로 전기영동을 하게 되면 subunit별로 잘라져 작은 밴드가 형성된다고 보고된 바 있어 (Koo *et al.*, 1998) 열에 안정한 단백질의 실제 분자량은 이보다 더 작을 것으로 추정된다.

항균 유전자 선발 및 분석

Bacillus sp. N32 균주가 생산하는 열에 저항성인 펩타이드성 단백질의 생합성 유전자를 분리하기 위하여 Lee 등이 그림 7에서와 같은 방법으로 PCR을 수행하여 그람 양성세균의 항균 펩타이드 생합성 유전자를 선발하는데 유용하게 사용된 바 있는 core 1, core 2 primer sequence를 이용하였다.

PCR을 수행한 결과 200 bp 와 800 bp 의 2개의 DNA band가 형성되었고 이 PCR product를 각각 pGEM-T easy vector에 cloning한 후 염기서열을 분석한 결과 800 bp 단편의 염기서열이 이미 알려진 항균

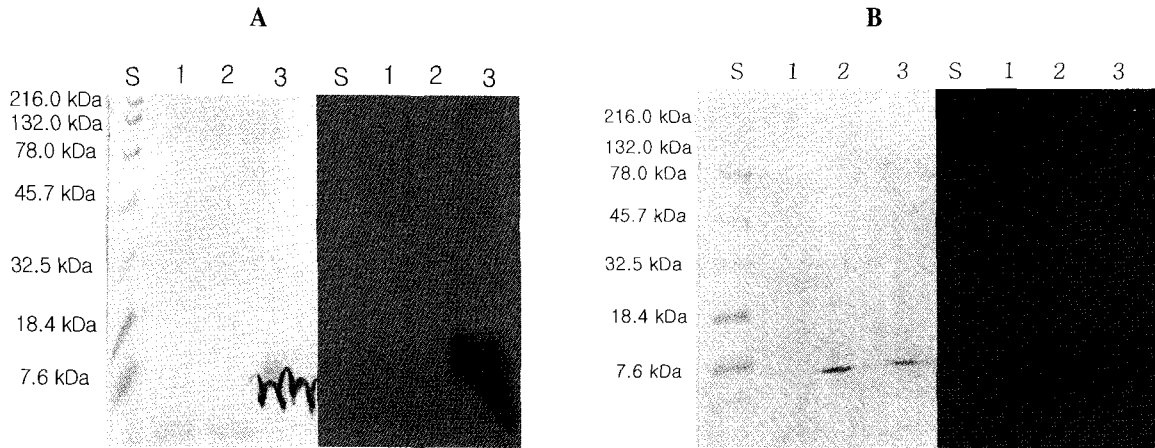


Fig. 6. SDS-PAGE and bioautography of antifungal protein

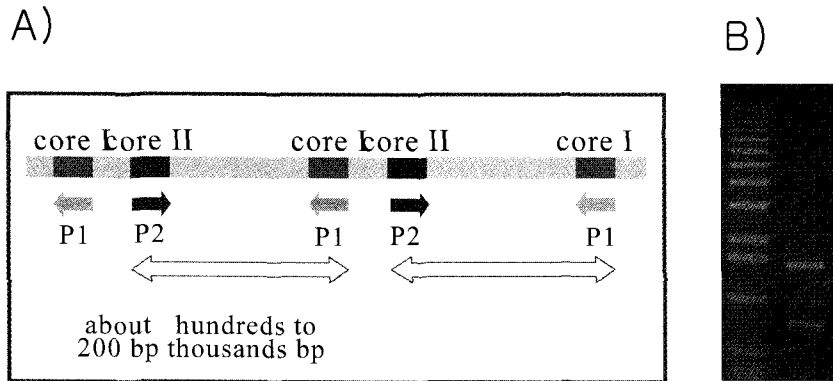


Fig. 7. A : Strategy of PCR cloning of the antifungal protein gene by using core-1 and core-2 primers. B : Electrophoresis of PCR products.

펩타이드인 fengycin 생합성 유전자중 하나인 *fenE* 유전자의 염기서열과 82% 상동성을 나타내었다. 이 PCR product를 probe로 사용하여 강한 시그널을 나타내는 10여개의 cosmid clone을 선발하였고 이 cosmid clone의 DNA를 추출하여 membrane에 전이 시키고 동일한 probe를 이용하여 Southern hybridization을 수행한 결과 10개 clone 중에 8개 clone이 probe와 상동성이 있는 단편이 존재하는 것이 확인되었다 (그림 8).

이 결과는 *Bacillus* sp. N32 균주가 생산하는 열에 저항성이 있는 항균단백질이 cyclic lipopeptide의 일종으로 보고된 fengycin일 가능성이 많음을 의미하며 선발된 8개의 cosmid clone들도 fengycin생합성 유전자를 일부 혹은 상당부분 포함하고 있음을 알 수 있었다. 이 cosmid clone들로부터 fengycin 생합성 유전자가 포함된 23 kb *Bam*HI 단편을 포함하고 있는 clone을 hybridization으로 확인 한 후 염기서열을 결정하여 ORF 분석을 해 본 결과 그림 9에서 보는 것처럼 두 개의 완전한 ORF를 가지고 있었으며 이 ORF는 이미

보고된 *B. amyloliquefaciens* FZB42의 fengycin 생합성 유전자 중 *fenB* 및 *fenC*와 96%의 상동성이 있었고 상동성은 낮지만 *fenD*와 *fenA*의 일부 염기서열도 가지고 있는 것으로 확인되었다.

Fengycin은 1986년 Nongnuch 등에 의해 nonribosomal peptide antibiotics의 일종인 lipopeptide antibiotics임이 처음으로 보고되었는데 특히 고추 풋마름병의 원인인 *Rhizoctonia solani* 와 *Paecilomyces varioti* 에 대하여 강한 항균력을 나타내는 것으로 보고되었다. Fengycin 생합성 유전자는 *fenA*, *fenB*, *fenC*, *fenD*, *fenE*의 다섯 개의 유전자가 cluster로 구성되어 있고 배양 단계마다 각각의 operon이 관여하며 특히 5개의 유전자 중 *fenC* 유전자에 2,560개의 아미노산으로 구성된 287 kDa의 fengycin synthetase 유전자가 암호화되어 있는 것으로 알려져 있다(Tseuy et al., 1999). 또한 이 단백질은 L-glutamic acid 와 L-ornithine 을 활성화시키는 FenC1과 FenC2, 2개의 아미노산 활성화 module과 adenylation에 관계된 10개의 core sequence를 가지고 있다고 보고되어 있는 바 본 연

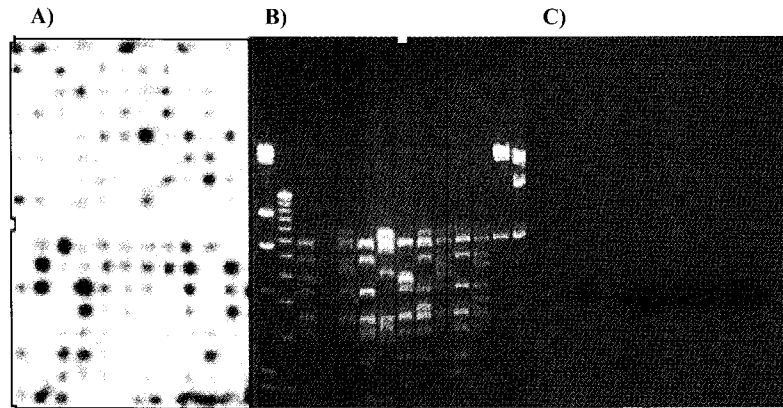


Fig. 8. Hybridization with p³²-labeled PCR product as a probe. A : Colony hybridization of cosmid library. B : Agarose gel electrophoresis of cosmid clone digested with *EcoRI*. C : Southern hybridization of *EcoRI* digested cosmid clone with p³²-labeled PCR product.

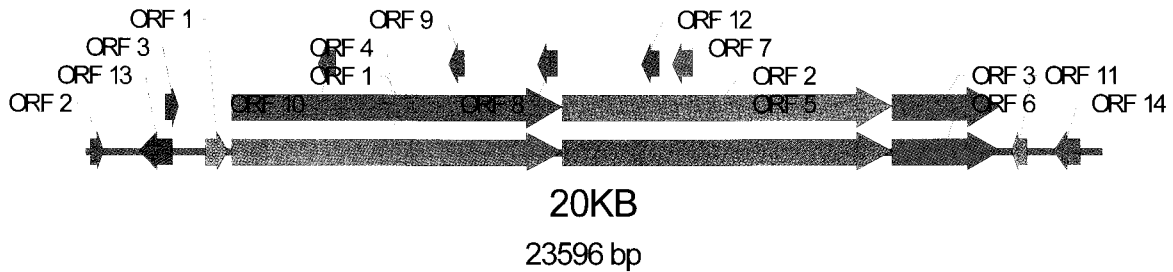


Fig. 9. Comparison of pmFen23 gene with *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 fengycin synthetase.

구에서 분리한 *fenC* 유전자도 peptide synthetase 유전자가 통상적으로 가지고 있는 10개의 adenylation domain을 가지고 있었으나 A3 sequence만 한 종류이고 다른 core sequence는 모두 2종류씩 가지고 있었다. 이와 같은 결과는 Lin 등이 보고한 *B. subtilis*의 *fenC* 유전자 구조와 유사 하였으나 *B. subtilis*의 *fenC* 유전자는 본 연구의 결과 한 종류의 sequence뿐이었던 A3 sequence를 포함한 adenylation domain의 10개의 conserved된 sequence가 모두 2종류씩 존재하였다. 이외에 thiolation domain은 유사한 conserved sequence가 2종류였으나 epimerization domain 및 condensation domain의 conserved된 sequence는 peptide synthetase의 conserved sequence와 같이 한 종류의 sequence만 가지고 있었다.

또한 1998년 Lin 등이 보고한 *B. subtilis* 균주의 *fenB* 유전자는 L-isoleucine을 활성화시키는 유전자를 코드하고 있으며 6개의 conserved된 core sequence를 가지고 있는 것으로 보고되어 있는데 본 연구에서 분리한 *fenB* 유전자도 6개의 conserved sequences를 가지

고 있었으나 peptide synthetase 유전자와는 다르게 ATP binding에 관여하는 sequence는 2종류가 존재 하였으며 ATPase기능에 관여하는 sequences가 2군데에 중복되어 존재하고 있었다.

그러나 *Bacillus* sp. N32 균주가 생산하는 열에 민감한 항균 단백질 관련 유전자는 primer를 이용한 PCR 방법으로는 분리할 수가 없었다.

따라서 열에 민감한 항균단백질의 유전자를 cloning 하기 위하여 gel filtration chromatography로 분리한 단백질을 SDS 전기영동 및 electroblotting으로 열에 민감한 단백질의 밴드만을 잘라낸 후 기초과학연구센터에 의뢰하여 N-terminal 부분의 아미노산을 분석하였다.

Glu(E), THR(T), Leu(L), Pro(P), Gly(G), Leu(L), Ile(I), TRP(W), Val(V), Met(M), Asp(D), Lys(k), Tyr(Y), Thr(T), Asp(D) 등 15개의 아미노산 서열을 결정하여 protein data base와 비교하였으나 기능이 검정되지 않은 hypothetical protein들과만 유사성이 있는 것으로 나타났다. 그래서 분석된 15개의 N-terminal 아미노산 서열을 DNA 염기서열로 치환, 45mer의

oligonucleotide probe를 합성한 후 합성한 DNA를 probe로 이용하여 λ -ZAP library로부터 1, 2차 screening을 통하여 14개의 positive 클론을 선발하였다(그림 10)

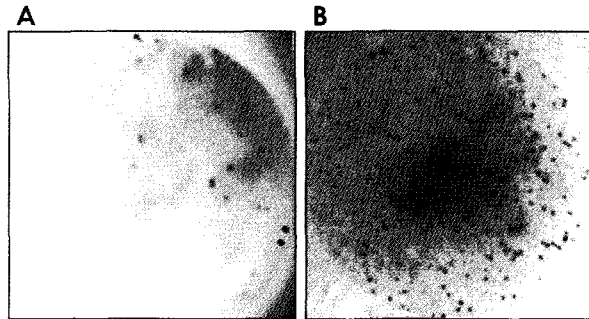


Fig. 10. Plaque hybridization of λ -ZAP library by oligonucleotide probe.

A : 1st screening, B : 2nd screening

그러나 이 phage 클론들의 삽입 DNA를 excision하여 확인한 결과 그림 11에서 보는 것처럼 다양한 크기의 DNA가 삽입이 되어 현재 그 DNA를 분리, 염기서열을 결정하여 분석하고 있어 곧 열에 민감한 단백질 유전자를 선발할 수 있으리라 생각된다.

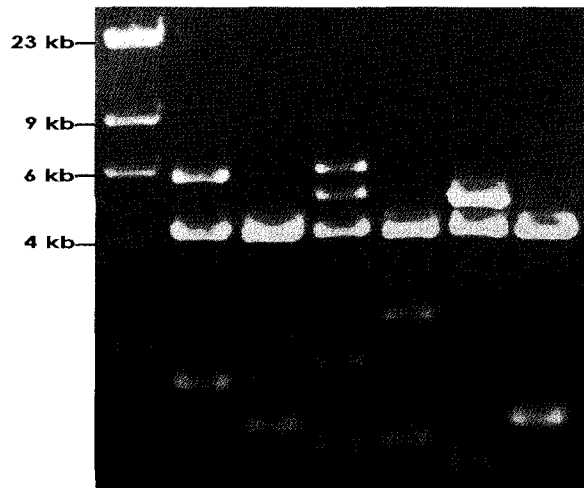


Fig. 11. Restriction fragment patterns of excision clones.

이상의 결과를 종합해보면 작물 근권 토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. N32 균주는 고추탄저병균의 성장을 억제하는 열에 저항성인 펩타이드성 단백질과 열에 민감한 항균 단백질의 두 가지 항균 단백질을 생산하는 것을 확인 하였으며 주 항균 단백질은 기존의 알려진 항균 펩타이드인 fengycin과 같거나 유사한 단백질로 밝혀졌다. 그러나 *Bacillus* sp. N32 균주는 항균력은 약하고 열에 민감하지만 기존에 알려지지 않

은 새로운 항균 단백질을 생산하므로 이 균주 자체를 미생물 제제로 사용하거나 열에 민감한 단백질 유전자를 선발하여 기능을 규명하면 탄저병 저항성 고추 개발 등 식물형질전환에 유용하게 사용할 수 있으리라 생각된다.

인용문헌

- Alexandra K. and X. H. Chen (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 184:1084~1096.
- Alison J. V., W. R. and C. P. Selityemnikoff(1991) A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:315~323.
- Guang H. L., C. L. Chen, J. S. M. Tschen, S. S. Tsay, Y. S. Chang and S. T. Liu.(1998) Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene *fenB* from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180:1338~1341.
- Handelsman, J., M., R. Rondon, S. P. Brady, J. Clady, and R. M. Goodman. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbe : a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5:245~249.
- Kenji, T., A. Takashi, H. Mitsuyo, N. Yoshiyuki and S. Makoto (1999) The Genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8(sfp)* are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2183~2192.
- Kerr, A. (1980) Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 64:25~30.
- Kleinkauf, A. and V. Dohren (1996) A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 236:335~351.
- Koo B. S., S. B. Lee, S. H. Yoon, G. K. Song, D. S. Chung, M. O. Byun and J. C. Ryu(1998) Characterization of a heat resistant antimicrobial peptide secreted by *Bacillus subtilis* A 405. *Kor. J. Pest. Sci.* 2(3):28~35.
- Lee, S. Y. and S. K. Rhee (1998) Rapid and efficient isolation of gene for biosynthesis of peptide antibiotics from gram-positive bacterial Strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8(4):310~317.

- Lee, J. W. (1995) Isolation and characterization of peptide antibiotics synthetase from *Bacillus subtilis* isolated from Korea soil. Master Thesis. Department of Biological Science, Myongji University, Korea
- Maget D. R. (1994) Itruin, a special class of pore-forming lipopeptides : biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87:151~174.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) Bacteriophage vectors and Cosmid vectors, *Molecular cloning*, pp. 2.2~3.58, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Tsuey P. L., C. L. Chen, H. C. Fu, C. H. Lin, G. H. Lin, S. H. Huang, L. K. Chang and S. T. Liu. (2005) Functional analyses of a fengycin synthetase fenD. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1730:159~164.
- Tsuey P. L., C. L. Chen, L. K. Chang, J. S. M. Tschen and S. T. Liu. (1999) Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, fenC, from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:5060~5067.
- Valentina T. and M. Alessandra (1997) Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*. 143:3443~3450.
- Vanittanakom, N., W. Loeffler, U. Koch and G. Jung (1986) Fengycin, A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiotics*. 7:888~901.
- Varsha K. and L. D. Barnes (1970) Effect of zwitterionic buffer of small masses of protein with bicinichoninic acid. *Anal. Biochem.* 157:291~294.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman and W. J. Wiebe (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6578~6583.
- Zuber, P., M. M. Nakano and M. A. Marahiel (1993) Peptide antibiotics. In *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria : Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. pp.897~916 American Society for Microbiology. Washington DC, USA

Characterization of antimicrobial proteins produced by *Bacillus* sp. N32

Mi-Hye Lee, In-Cheol Park, Yun-Soo Yeo, Soo-Jin Kim, Sang-Hong Yoon, Suk-Chan Lee¹, Tae-Young Chung¹, Bon-Sung Koo* (*Microbial Genetics Division, National Institute of Agricultural Biotechnology (NIAB), Suwon 441-707, Korea*, ¹*Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University*)

Abstract : An antagonistic bacterial isolate, that inhibits the growth of plant pathogens, was selected and identified from 5,000 isolates screened from the rhizosphere of various crop plants. An isolate *Bacillus* sp. N32, tested against *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease in hot pepper, produced both a heat resistant antifungal protein and a heat sensitive antifungal protein. The heat resistant protein was partially purified by Ammonium sulfate fractionation and gel filtration chromatography. The bioautography showed that the proteins possessed high antifungal activity. The biosynthetic gene cluster responsible for the heat resistant antifungal protein was cloned from cosmid library using DNA probe obtained from PCR product with the primers targeting the conserved nucleotide sequence of the synthetic genes reported earlier. Most of the clones obtained showed higher homology to fengycin antibiotic synthetic gene family reported earlier. On the other hand, the heat sensitive protein was isolated from SDS-PAGE and electroblotting to determine the N-terminal amino acid sequences. The heat sensitive antifungal protein gene was cloned from the λ -ZAP libraries using a DNA probe based on the N-terminal amino acid sequences of the heat sensitive protein. We are contemplating to clone and sequence the whole gene cluster encoding the heat sensitive protein for further analysis.

Key words : antifungal peptide, anthracnose disease, biosynthetic gene, *Colletotrichum gloeosporioides*, cosmid library, fengycin, *Rhizobacteria*

*Corresponding author (Fax : +82-31-299-1752, bskoo@rda.go.kr)