

Burkholderia cepacia YK-2에서 페녹시계 제초제 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid에 의한 스트레스 충격 단백질 DnaK와 GroEL의 생성

조윤석·박상호¹·김치경¹·오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹충북대학교 자연과학대학 미생물학과

환경오염원으로서 페녹시계 제초제인 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)에 노출된 토양으로부터 분리된 세균인 *Burkholderia cepacia* YK-2에서 2,4-D에 의한 스트레스 충격 단백질의 생성을 조사하였다. 활발하게 생장을 하고 있는 *B. cepacia* YK-2의 배양은 다양한 농도의 2,4-D에 노출되어 스트레스 충격단백질을 생성하였다. 이 반응은 43 kDa의 DnaK와 41 kDa의 GroEL 단백질의 생성을 수반하였으며, 이 단백질들은 anti-DnaK 단일 항체와 anti-GroEL 단일 항체를 사용한 SDS-PAGE와 Western blot을 통하여 확인되었다. 생성된 총 스트레스 충격 단백질은 2-D PAGE에 의하여 분석되었다. 다양한 2,4-D 농도와 노출 시간에 따른 *B. cepacia* YK-2의 생존율을 분석한 결과, 이 세균의 생존율은 스트레스 충격 단백질의 생성과 비례하였다.

Key words □ *Burkholderia cepacia* YK-2, 2,4-D stress, stress-shock proteins, survival

오늘날 산업과 농업 활동을 통하여 방출되는 다양한 종류의 환경오염원들에 의하여 자연 생태계는 크게 오염되고 있으며, 이에 따라 자연 생태계를 구성하고 있는 생물체들은 생존에 커다란 영향을 받고 있다. 이들 환경오염원들은 대부분 난분해성의 인공화합물(xenobiotics)로서 구조적으로 안정하여 자연계에서 분해가 어려워 토양에 잔류하거나, 생물체내에 축적되는 생물농축(bioaccumulation) 현상이 수반된다. 환경오염원들이 미생물을 포함하는 생물체에 노출되면 생물체들은 유전자의 발현 변화를 일으켜 신속하고 일시적인 적응 능력을 나타내게 된다. 자연 생태계에서의 급격한 환경의 변화는 생물체에 대하여 스트레스로 작용하게 되는데, 이와 같이 환경으로부터 유래하는 다양한 형태의 스트레스에 대한 생물의 적응 능력은 생명력을 유지하기 위하여 진화되어온 반응 기작으로 알려져 있다(3, 4, 8, 13, 23, 36, 38)

생물체들은 여러 가지 종류의 환경 스트레스에 노출되었을 경우에 공통적이거나, 각기 다른 형태의 스트레스에 대하여 독특한 유전자 집단을 발현시키는데, 이때 생물체 내에서 스트레스에 대한 반응 기작으로 스트레스 충격 단백질(SSPs: stress shock proteins)이 생성되는 것으로 알려져 있다(5). 여러 가지 스트레스 충격 반응 중에서 가장 많은 연구가 이루어진 것은 열 충격(heat shock) 반응이다(7, 16). 미생물이 급격한 온도 상승에 의해 열 충격을 받으면, 진화과정에서 그 일차구조가 잘 보존되어온 여러 종류의 열 충격 단백질들(hsp: heat shock proteins)이 신속하고 일시적으로 유도 합성되어 손상된 단백질을

의 구조를 정상적인 구조로 회복시키는 역할을 한다(19, 20). 생명체에 영향을 미치는 환경 스트레스의 종류로는 열 이외에도 ethanol(17, 25), sodium dodecyl sulfate(1), bile salts(9), β -lactam antibiotics(32), viral infection(3), hydrogen peroxide(10) 등이 보고된 바 있으며, 최근에는 산업에서 널리 사용되는 phenol(15), 4-hydroxybenzoate(30), biphenyls(31)와 같은 화학물질이나 중금속 등에 의해서도 열 충격 단백질의 일부가 유도 합성되는 것으로 보고되었다.

2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), MCPA(4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid), 2,4,5-T(2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) 등은 1940년대 개발되어 전세계적으로 농업과 원예에서 생산성 증대와 조경을 위하여 널리 사용되어 온 대표적인 페녹시계 제초제들이다(35). 이들 페녹시계 제초제들은 식물 호르몬인 옥신(auxin)과 같은 기작을 갖는 호르몬 성질의 화학 제초제로서 식물의 잎, 줄기, 뿌리 등으로부터 흡수되며, 주로 활엽의 제초를 제거하는데 유용하게 사용되는 것으로 알려져 있다(18). 2,4,5-T는 생물체에 대한 맹독성이 입증되어 사용이 중지된 제초제이지만 다른 관련 제초제들은 여전히 무분별한 남용 및 오용으로 인해 인간의 건강과 환경에 커다란 영향을 미치고 있다(34). 페녹시계 제초제가 살포된 지역에서 제초제에 노출된 생물체의 손상과 방제 대상이 되지 않는 다른 많은 종류의 비표적 생물체(non-target organism)도 크게 위협받게 되며 대단위의 농토나 삼림지역에 이들 제초제가 살포되었을 경우 그 환경생태학적인 피해는 매우 커서 야생동물의 중독과 생산성 및 영양물질 순환과 같은 생태학적 기능의 파괴가 수반되는 것으로 보고되었다(11).

본 실험에서는 현재 농업에서 제초제로서 널리 사용하고 있

*To whom correspondence should be addressed
Tel: (0418) 530-1353, FAX: (0418) 530-1350
E-mail: kyeheon@asan.sch.ac.kr

는 2,4-D가 환경오염원으로서 자연계에 노출되었을 때 미생물이 받는 스트레스 충격 반응을 알아보기 위하여 실시되었다. 이를 위하여 2,4-D에 노출된 지역의 토양으로부터 세균을 분리하고 이 분리 세균에 대하여 스트레스 요인으로 농업과 원예에 널리 사용되고 있는 폐독성계 제초제인 2,4-D를 가하여 이와 관련된 토양 분리세균인 *B. cepacia* YK-2의 생존율과 충격단백질의 생성의 상호관계를 조사하였다.

재료 및 방법

2,4-D 분해세균의 능화 및 분리

충청남도 아산시 음봉면 소재 논밭 주변으로부터 토양을 채취하여 능화배양 기법으로 2,4-D를 분해하는 혼합배양을 확보하였다(27). 배양에 사용된 무기배지(mineral salts medium)는 증류수 1 l당 (NH₄)₂SO₄ 500 mg, K₂HPO₄ 500 mg, MgSO₄ · 7H₂O 500 mg, FeCl₃ · 6H₂O 10 mg, CaCl₂ · 2H₂O 10 mg, MnCl₂ 0.1 mg, ZnSO₄ 0.01 mg, ascorbic acid 150 mg을 포함하였으며, 유일 탄소원 및 에너지원으로 첨가된 2,4-D는 10~150 mg의 농도 범위에서 사용하였다. 준비된 배지는 1 N NaOH로 pH 7.0으로 조절한 후, 121°C에서 15분간 고압 멸균하였으며, 접종 후 30°C에서 분당 150회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하였다. 혼합배양으로부터 2,4-D를 포함하는 무기 한천 배지 상에 도말하여 6개의 단일 세균을 분리하였다. 각각 분리된 세균은 3회에 걸쳐 동일한 방법으로 재도말하여 순수배양으로 확보하였으며, 6개의 분리 세균 가운데 분해능이 가장 탁월한 세균을 선택하여 본 연구에 사용하였다.

분리세균의 동정

분리세균의 동정은 gas chromatography를 이용한 MIS(microbial identification system)로 세포막의 지방산 조성의 분석방법으로 실시되었다. Gas chromatography의 사용 조건은 Hewlett-Packard 6890 series II gas chromatography를 사용하였으며, 컬럼은 HP Ultra 2 fused-silica capillary column을 사용하였으며 carrier gas로는 수소를 사용하였다. 지방산의 조성은 TSBA version 3.9 (Standard library)를 이용하여 비교 분석하였다. 분석시료의 제작은 Laura 등(1996)의 방법에 의해 실시하였다(21).

2,4-D 분해 미생물의 분해능 측정

배지내의 2,4-D와 2,4-DCP의 분석은 Oh and Tuovinen (1991)의 방법에 의해 측정하였다(28, 29). HPLC 시스템은 SPD-10A UV/Vis detector가 부착된 Shimadzu 사의 LC-10AT 제품을 사용하였고, 컬럼(column)은 DuPont사의 ZORBAX reverse-phase ODS 컬럼 (250 mm×4.6 mm, C₁₈, 입자크기 10 μm)을 사용하였다. HPLC 작동조건은 chart speed 0.25, attenuate 128, wavelength 229 nm, mobile phase의 flow rate는 1.8 ml/min이었다. Mobile phase는 K₂HPO₄ 6 g과 진한 인산 3 ml를 volumetric flask에 넣고 용해시킨 뒤, HPLC용 증류수로 1 liter되게 하여 만든 phosphate buffer와 acetonitrile을 3:2의

비율로 혼합하여 0.2 μm nylon membrane filter로 여과하여 사용하였다.

2,4-D에 의한 *B. cepacia* YK-2의 생존율

LB 액체배지에 적지린 *B. cepacia* YK-2가 대수 생장기를 거치면서 파장 660 nm에서 optical density가 0.8일 때 원심 분리 튜브에 넣고 2,000×g에서 10분간 원심분리 하여 얻어진 균체에 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하였고, 0.5 mM부터 10 mM의 2,4-D를 포함하는 무기액체배지에 ml당 10⁷~10⁸개가 되도록 *B. cepacia* YK-2를 접종하였다. 접종한 *B. cepacia* YK-2는 30°C의 진탕 배양기에서 배양하였으며, 2시간 간격으로 LB 고체평판배지에 각각 100 μl 씩 평판 도말하고, 30°C에서 배양 후 형성된 집락을 계수하여 2,4-D 농도에 따른 세균의 생존율을 분석하였으며, LB 액체배지에서 배양된 *B. cepacia* YK-2가 초기 대수생장기에 접어드는 시점에 최종 농도가 2 mM이 되게 하여 2,4-D를 각각 첨가한 후, 정상적으로 배양되는 *B. cepacia* YK-2와의 생존율을 비교하였다.

SDS-PAGE

B. cepacia YK-2에 2,4-D 스트레스 충격 처리한 후 4°C를 유지하면서 5,000×g에서 10분간 원심 분리하여 얻어진 균체를 10 mM의 phosphate buffer (pH 7.0)로 세척하였다. 그리고 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 균체를 현탁하여 4°C를 유지하면서 50 W의 초음파분쇄기(Fisher M-300, Pennsylvania, U.S.A)로 20초간 40회 반복하면서 세포를 파쇄하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bollag 등(1996)의 방법에 따라 동일량을 SDS-PAGE 하였다(6). Separating gel은 12%의 acrylamide slab gel을 사용하였으며, stacking gel은 4%의 acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동은 stacking gel에서는 60 V에서 30분 동안 전기영동 하였고, separating gel에서는 100 V에서 2시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전개용매는 1×running buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 1% SDS)를 사용하였다. 전기영동 후, gel은 Coomassie 염색 용액 (0.1% Coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2시간 동안 염색하였고, 탈색용액 I (50% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 1시간 30분 동안 탈색하였으며, 탈색용액 II (5% methanol, 7% glacial acetic acid)로 10시간 동안 탈색을 실시하였다.

Western blot

2,4-D stress shock 처리를 한 후 스트레스 충격단백질의 분석을 위하여 Western blot을 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 실시하였다(33). SDS-PAGE로 단백질을 분자량 크기에 의해 분리한 후, gel에 있는 단백질을 semidry electroblotter (Owl separation systems, New Hampshire, U.S.A)을 사용하여 Hybond™-PVDF membrane (Amersham International plc., Buckinghamshire, England)으로 옮겼으며 (40 mA, 60분), 단백질이 옮겨진 Hybond™-PVDF membrane을 PBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄)로 15분씩 2회 세척

후, 30 ml의 PBS 용액에 0.3 g의 bovine serum albumin을 넣은 blocking 용액으로 1시간 30분간 실온에서 반응시켰으며, 반응 후 blocking 용액을 제거하고 PBS로 15분간 2회 세척하였다. 1차 항체는 anti-DnaK 단일항체와 anti-GroEL 단일항체 (Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, British Columbia, Canada)로 PBS-0.08% Tween 20에 희석(1 : 10,000)하여 1시간 30분간 실온에서 반응시켰으며, 반응이 끝난 후, PBS-0.08% Tween 20으로 각각 12분 2회, 15분 1회 세척하였다. 2차 항체는 anti-mouse IgG HRP conjugate (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.A)로 PBS-0.08% Tween 20에 희석 (1 : 10,000)하여 1시간 30분간 실온에서 반응시켰다. 반응 후, PBS-0.08% Tween 20으로 각각 12분 동안 2회, 15분 동안 1회 세척하였고, Western용 ECL kit (Amersham International plc., Buckinghamshire, England)를 사용하여 항원항체 복합체를 X-선 필름 (AGFA, Belgium)에 노출시켜 현상하여 분석하였다.

2D-PAGE

2D-PAGE는 O'Farrel 등(1975)과 Bollag 등(1996)의 방법에 따라 실시하였으며(6, 26), 단백질 표품은 SDS-PAGE에 사용한 동일한 표품을 사용하였다. 단백질 표품은 표품 buffer (9.5 M Urea, 2% Triton X-100, 5% β-mercaptoethanol, 1.6% Phamalyte pH 4.0-6.5, 0.4% Phamalyte pH 3.0-10.0)와 표품 overlay buffer (9 M urea, 0.8% Phamalyte pH 4.0-6.5, 0.2% Phamalyte pH 3.0-10.0, Bromophenol blue)를 동일 양을 섞어서 사용하였다.

Isoelectric focusing gel은 3 g Urea, 0.67 ml 30% acrylamide, 144 μl Phamalyte pH 4.0-6.7, 2.7 ml 증류수를 첨가하여 urea가 완전히 녹은 후, 25 μl 10% ammonium persulfate, 20 μl TEMED를 첨가하여 gel을 만들어서 사용하였다. 전기영동 buffer로는 upper buffer (0.02 M sodium hydroxide)와 lower buffer (0.01 M phosphoric acid)를 사용하였다. Gel은 200 V에서 10분, 300 V에서 15분, 400 V에서 15분 동안 pre-running하였다. 단백질 표품을 loading 한 후, 500 V에서 30분, 600 V에서 3시간 30분 동안 전기영동 하였으며, 전기영동 후, gel은 equilibration buffer (5% β-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol)에서 30분간 처리하였다. 2-D PAGE는 SDS-PAGE 방법에 따라 수행하였으며, gel 염색 또한 동일한 방법으로 실행하였다.

결과 및 고찰

2,4-D 분해 세균의 확보 및 동정

2,4-D에 오염된 논밭으로부터 토양 표본을 채취하여 2,4-D를 포함하는 액체 무기배지에서 농화시켜 미생물 혼합배양을 획득하였으며, 이 혼합배양으로부터 2,4-D의 분해능이 탁월한 단일 세균을 분리하였다. 분리된 세균은 2,4-D를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하였으며, 2,4-D의 노출량과 노출시간이 증가함에 따라 이 세균의 생존율과 스트레스 충격단백질의 생성에 대한 연구를 실시하였다.

2,4-D 분해세균의 세포막에 있는 지방산 조성을 gas chromatography로 분석하고, 그 결과를 MIS(microbial identification system)의 TSBA version 3.9 (Standard library)와 비교·동정하여 *Burkholderia cepacia* YK-2로 명명하였다.

B. cepacia YK-2의 성장과 2,4-D 분해

유일 탄소원으로 2,4-D를 포함하는 무기액체배지에서 *B.*

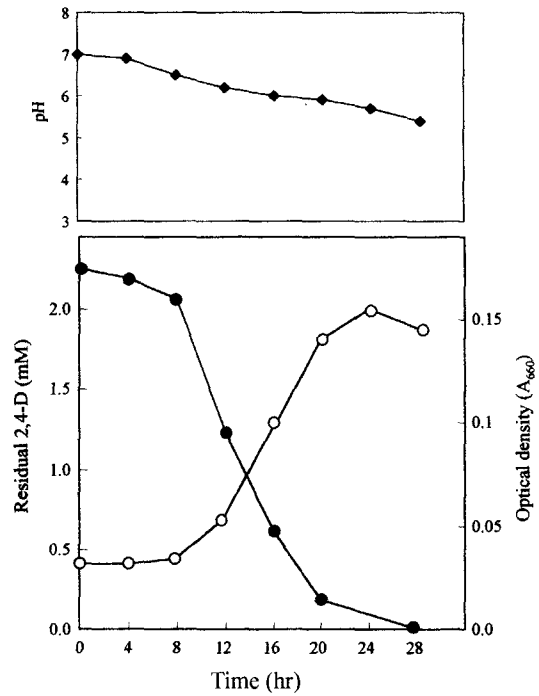


Fig. 1. Growth of test culture, *B. cepacia* YK-2, measured as cell density at 660 nm (○), associated with the degradation of 2.25 mM of 2,4-D (●) and pH (◆).

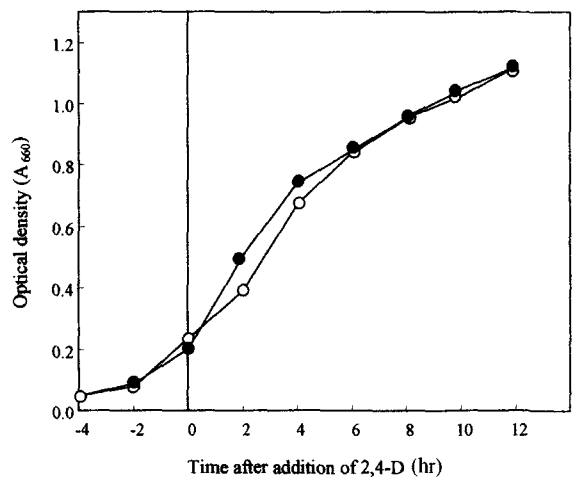


Fig. 2. Growth of *B. cepacia* YK-2 on LB media in the absence and in the presence of 2,4-D. Cells pre-grown overnight in LB medium were harvested, washed, and resuspended in LB medium without 2,4-D (●) or with 2 mM 2,4-D (○). 2,4-D was added at time zero, and growth was measured by optical density at 660 nm

cepacia YK-2의 성장과 2,4-D의 분해를 관찰하였다. 배지내의 2,4-D 농도는 2.25 mM이었으며, 초기 pH는 7.0으로 조절하였다. 배양 8시간에서 16시간 사이에 급격한 2,4-D의 감소를 나타내었고, 접종한 후 28시간만에 완전히 분해하였다 (Fig. 1). 배지내의 초기 pH는 7.0이었으며, 배양이 진행됨에 따라 서서히 감소하여 2,4-D가 완전히 분해된 28시간 후의 최종 pH는 5.4가 되었다.

2,4-D에 의한 *B. cepacia* YK-2의 생존율

LB 액체배지에 *B. cepacia* YK-2를 접종한 후, 초기 대수생장기에 2,4-D의 최종 농도가 2 mM이 되게 첨가한 후, 정상적인 LB 배지에서 자라는 *B. cepacia* YK-2의 성장곡선과 비교한 결과 2,4-D가 첨가된 *B. cepacia* YK-2의 생장은 정상적인 LB배지에서 성장하는 *B. cepacia* YK-2보다 6시간 동안 생장이 지연되는 것이 관찰되었다 (Fig. 2). 이 실험 결과 2,4-D가 *B.*

cepacia YK-2의 성장에 영향을 미치며, 이 결과를 토대로 다양한 2,4-D의 농도에서 *B. cepacia* YK-2의 생존율을 실험한 결과 Fig. 3처럼 2,4-D의 농도가 3 mM, 2시간 이상 처리하였을 때부터 생존율이 급격히 감소하였다.

2,4-D 스트레스 충격 단백질의 생성

B. cepacia YK-2를 다양한 농도의 2,4-D에 10분부터 360분까지 노출시킨 후 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 파쇄한 후, 그 상등액을 취하여 Lowry 방법(22)에 의해 단백질 정량을 하여 60 µg의 표품을 SDS-PAGE 하였다. 1 mM에서 10 mM의 2,4-D농도에 60분에서 360분까지 노출하였을 때 SDS-PAGE에서 여러 종류의 단백질이 생성, 소멸되는 것을 관찰하였으며 (Fig. 4A), 이와 동일한 방법으로 SDS-PAGE를 한 후 gel에 있는 단백질을 Hybond™-PVDF membrane으로 옮겼으며, 옮겨진 단백질 중에 anti-DnaK 단일항체와 anti-GroEL 단일항체에 특

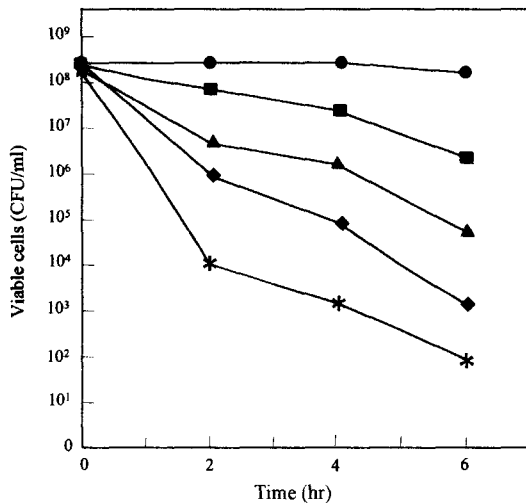


Fig. 3. Survival of *B. cepacia* YK-2 after 2,4-D shock. Cells were maintained at 2,4-D concentrations of 0 mM(●), 1 mM(■), 3 mM(▲), 5 mM(◆) and 7 mM(*), respectively. At intervals, the number of colony-forming unit per milliliter of the culture (CFU/ml) was measured.

Table 1. Production of SSPs *B. cepacia* YK-2 treated with different 2,4-D concentrations

Treatment Period (min)	Stress Shock Proteins	Production of SSPs by 2,4-D (mM)					
		0.5	1	3	5	7	10
10	DnaK	-	-	-	-	-	-
	GroEL	-	-	-	-	-	-
30	DnaK	-	-	-	-	-	-
	GroEL	+	+	+	+	+	-
50	DnaK	+	+	+	+	+	+
	GroEL	+	+	+	+	+	-
60	DnaK	+	+	+	+	+	+
	GroEL	+	+	+	+	+	-
180	DnaK	+	+	+	+	+	-
	GroEL	+	+	+	+	-	-
360	DnaK	+	+	+	+	-	-
	GroEL	+	+	+	+	-	-

+, production ; -, no production

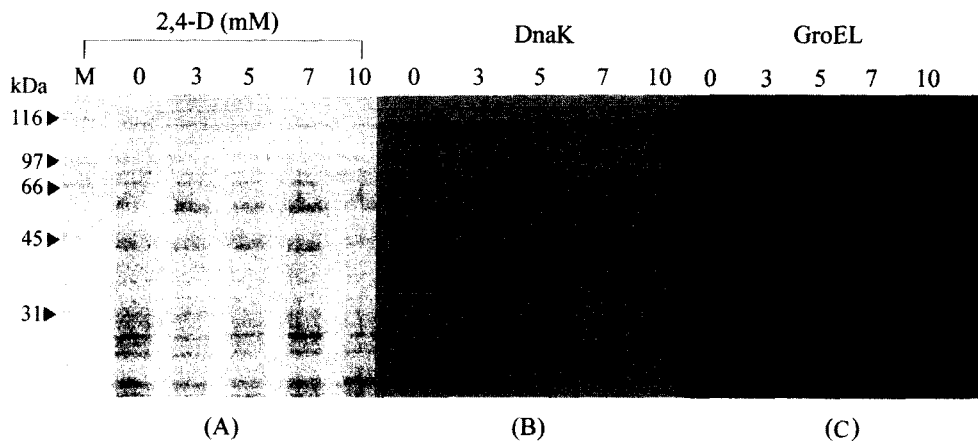


Fig. 4. Production of SSPs by *B. cepacia* YK-2 treated with different 2,4-D concentrations for 1 hr. The SSPs were analyzed by SDS-PAGE(A), Western blot with anti-DnaK(B) and anti-GroEL(C) monoclonal antibodies, respectively.

이적으로 반응하는 스트레스 충격 단백질(SSPs)의 반응 양상을 보았다. *B. cepacia* YK-2는 상이한 농도의 2,4-D에 노출 될 경우 3 mM 이상의 농도에서 SSPs가 증가하기 시작하였다 (Figs. 4B & 4C). 노출 시간과 농도에 따라 DnaK은 2,4-D 농도 0.5 mM에서 50분 노출되었을 때 생성되기 시작하였으며, 2,4-D 농도 7 mM, 노출시간이 180분 이상이면 생성되지 않았다. GroEL은 2,4-D 농도 0.5 mM에서 30분 노출되었을 때 생성이 시작되었으며, 2,4-D 농도 10 mM에서 60분간 처리 할 경우에는 생성이 되지 않았다. 이처럼 점차 노출시간이 늘어남에 따라 7 mM 이하의 2,4-D에서도 SSPs의 생성이 관찰되지 않음을 확인 할 수 있었으며, 그 결과는 Table 1에 요약되었다.

Fig. 5에 볼 수 있는 바와 같이 약 15 종의 충격 단백질 생성이 확인되었다. 2D-PAGE를 수행한 gel에 anti-DnaK 단일항체와 anti-GroEL 단일항체를 이용한 Western blot을 실시하여 2,4-D 처리에 의한 스트레스 충격 단백질인 DnaK와 GroEL이 생성됨을 알 수 있었으며, *B. cepacia* YK-2에 대하여 노출된 2,4-D의 농도가 증가함에 따라 몇몇 단백질들은 합성이 억제되어 소멸되는 것이 관찰되었다.

***B. cepacia* YK-2에서 열 충격에 의한 DnaK와 GroEL의 생성**

B. cepacia YK-2를 30°C LB 액체배지에서 배양하여 대수성장기의 중간 시점에서 배양온도를 급격히 42°C로 온도를 올려 주어 anti-DnaK 단일항체와 anti-GroEL 단일항체를 사용하여 열 충격 단백질인 DnaK와 GroEL의 생성여부를 관찰하였다. 얻어진 SDS-PAGE의 결과를 토대로 하여 Western blot을 실시한 결과 2,4-D가 스트레스 요인으로 작용하였을 때와 동일한 크기의 DnaK와 GroEL이 생성되었음이 확인되었다(Fig. 6). 일반적으로 anti-DnaK 단일항체와 anti-GroEL 단일항체 (Stressgen Biotechnologies Corp., Canada)는 *E. coli*에서 열 충격에 의해서 생성된 단백질로서, 열 충격시 열충격 단백질인 DnaK와 GroEL은 각각 70 kDa과 60 kDa에서 생성되는 것으로 보고되었다. 그러나 본 연구에서 분리되어 사용된 2,4-D 분해세균인 *B. cepacia* YK-2에서는 2,4-D 충격과 열 충격에서 모두 43 kDa의 DnaK와 41 kDa의 GroEL가 생성되었다는 사실은 흥미있는 결과라 하겠다. Varela 등 (1992)은 *Thiobacillus ferrooxidans*에서 유도 합성되는 DnaK 및 GroEL와 *E. coli*에서 생성되는 DnaK 및 GroEL의 유사성을 2D-PAGE를 이용한 N-terminal 아미노산 서열을 분석하여 비교한 결과 70%와 80%의 유사성을 보였으며, *E. coli*의 DnaK 경우 dimer로 존재한다고 보고하였다(37). 본 실험 결과 *B. cepacia* YK-2에서 생성된 43 kDa의 DnaK와

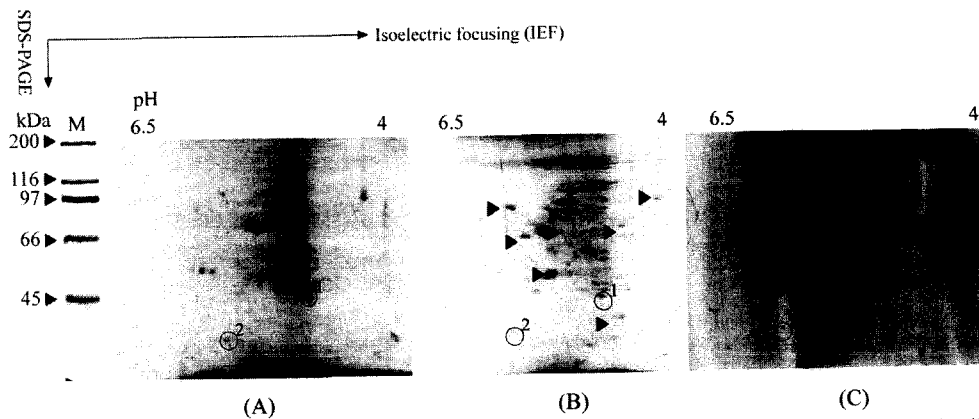


Fig. 5. Two-dimensional PAGE analysis of *B. cepacia* YK-2. Control(A). Cells treated with 3 mM 2,4-D for 1 hr(B), and cells treated with 7 mM 2,4-D for 1 hr(C). The circle spots indicate DnaK(1) and GroEL(2) proteins. Arrow heads and open rectangles indicate the proteins indicated positively by 2,4-D shock.

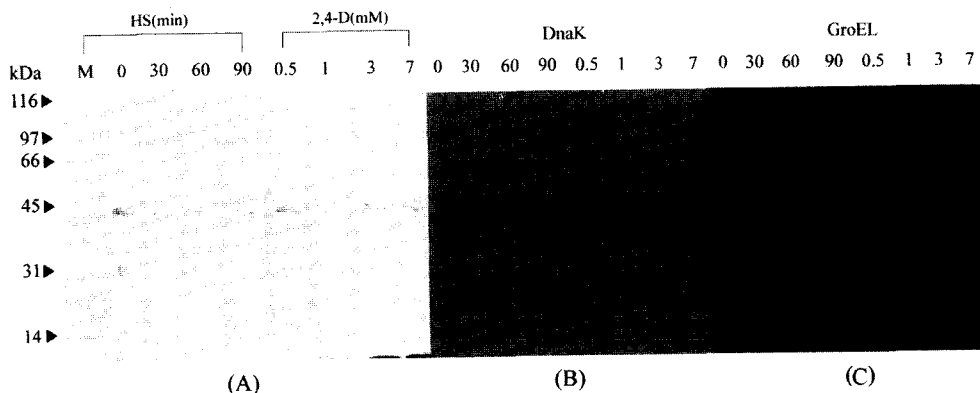


Fig. 6. Production of SSPs by *B. cepacia* YK-2 treated with heat shock at 42°C and 2,4-D as a stress shock. The SSPs were analyzed by SDS PAGE(A), Western blot with anti-DnaK(B) and anti-GroEL(C) monoclonal antibodies, respectively.

41 kDa의 GroEL은 *E. coli*에서 생성되는 DnaK 및 GroEL과의 유사성이 *Thiobacillus ferrooxidans*보다 떨어지는 것으로 나타났다.

따라서 본 연구를 통해서 토양으로부터 분리된 세균인 *B. cepacia* YK-2는 환경오염원으로서 2,4-D에 노출되었을 경우에 노출농도가 증가함에 따라 세균의 생존에 커다란 영향을 미쳤으며, 이러한 상태에서 세균은 생존하기 위하여 43 kDa DnaK와 41 kDa GroEL의 스트레스 충격 단백질을 생성하는 것이 확인되었다.

감사의 말

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제(1997-001-D00319)의 연구비에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Adamowicz, M., P.M. Kelley, and K.W. Nickerson. 1991. Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 229-233.
- Allan, B., M. Linesmen, L.A., MacDonald, J.S., Lam, and A.M. Kropinski. 1988. Heat shock response of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **170**, 3668-3674.
- Ang, D., G.N. Chandraskhar, M., Zylicz, and C. Georgopoulos. 1986. *Escherichia coli* *grpE* gene codes for heat shock protein B25.3, essential for both λ DNA replication at all temperatures and host growth at high temperature. *J. Bacteriol.* **167**, 25-29.
- Belkin, S., D.R. Smulski, A.C. Vollmer, T.K. van Dyk, and R.A. LaRossa. 1996. Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG*::*lux* fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2252-2256.
- Blom, A., W. Harder, and A. Matin. 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 331-334.
- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Protein methods, 2nd ed., Wiley-Liss, New York.
- Craig, E.A., B.D. Gambill, and R.J. Nelson. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**, 402-414.
- Engelman, S. and M. Hecker. 1996. Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* sigB mutants and the role of *katA* and *katE*. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 189-196.
- Flahaut, S., J. Frere, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1996. Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2416-2420.
- Flattery-O'Brien, J., L.P. Collinson, and I.W. Dawes. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 501-507.
- Freedman, B. 1999. Environmental ecology. Academic Press, San Diego, California.
- Gage, D.J. and F.C. Neidhardt. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2,4-dinitrophenol. *J. Bacteriol.* **175**, 7105-7108.
- Gomes, S.L., J.W. Goger, and L. Shapiro. 1990. Expression of *Caulobacter* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.* **172**, 3051-3059.
- Huh, N.E., N.S. Choi, Y.K. Seo, T.S. Yu, and H.S. Lee. 1994. Characterization of a cadmium-resistant yeast strain in response to cadmium or heat shock stress. *J. Microbiol. Biotech.* **4**, 30-35.
- Jeon, T.J. and K.J. Lee. 1998. Synthesis and requirement of *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and DnaK for survival under phenol stress conditions. *J. Microbiol.* **36**, 26-33.
- Kamemori, M., H. Mori, and T. Yura. 1994. Induction of heat shock proteins by abnormal proteins results from stabilization and not increased synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 5648-5653.
- Kim, C.K. and I.H. Ga. 1992. Ethanol tolerance of *Campylobacter jejuni* by ethanol shock. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 377-382.
- Kirwood, R.C. 1991. Target site for herbicide action. Plenum press, New York.
- Langer, T., C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M.K. Hayer, and F.U. Hartl. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ, and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683-689.
- LaRoss, R.A. and T.K. van Dyk. 1991. Physiological roles of the DnaK and GroE stress proteins: catalysts of protein folding or macromolecular sponges. *Mol. Microbiol.* **5**, 529-534.
- Laura, D., G. de Socio, R. Frassanito, and D. Rotilio. 1996. Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2644-2646.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Matin, A. 1991. The molecular basis of carbon starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 3-11.
- Meyer, U., S. Palola, F. Franco, and R. Ludger. 1995. Close correlation between heat shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic alcohols and phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 979-984.
- Michel, G.P.F. and J. Starke. 1986. Effect of ethanol and heat stresses on the pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **165**, 1040-1042.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Oh, K.H. and O.H. Tuovinen. 1990. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mixed cultures of bacteria. *J. Ind. Microbiol.* **6**, 275-278.
- Oh, K.H. and O.H. Tuovinen. 1991. Bacterial degradation of phenoxyherbicide mixtures 2,4-D and MCPP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 222-229.
- Oh, K.H., and O.H. Tuovinen. 1991. Detection and identification of substituted phenol as intermediates of concurrent bacterial degradation of the phenoxyherbicides MCPP and 2,4-D. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 141-146.
- Park, S.H., K.H. Oh, K.J. Lee, and C.K. Kim. 1998. Production of stress-shock proteins in *Pseudomonas* sp. DJ-12 treated with 4-hydroxybenzoate. *J. Microbiol.* **36**, 273-279.
- Park, S.H., Y.J. Ko, K.H. Oh, and C.K. Kim. 1998. Cellular

- responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to the stresses of several aromatic pollutants. *J. Microbiol.* **36**, 93-98.
32. **Powell, J.K. and K.D. Young.** 1991. Lysis of *Escherichia coli* by β -lactams which bind penicillin binding proteins 1a and 1b: inhibition by heat shock proteins. *J. Bacteriol.* **173**, 4021-4026.
33. **Sambrook, J.K., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, New York.
34. **Sandmann, E.R.I.C., M.A. Loos, and L.P. van Dyk.** 1988. The Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **101**, 1-53.
35. **Sinton, G.L., L.T. Fan, L.E. Erickson, and S. M. Lee.** 1986. Biodegradation of 2,4-D and related xenobiotics compounds. *Enz. Microb. Technol.* **8**, 395-403.
36. **Spector, M.P., Z. Aliabadi, T. Gonzalez, and J.W. Foster.** 1986. Global control in *Salmonella typhimurium*: two-dimensional electrophoresis analysis of starvation-, anaerobiosis-, and heat shock-inducible proteins. *J. Bacteriol.* **168**, 420-424.
37. **Varela, P. and C.A. Jerez.** 1992. Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**, 149-154.
38. **Walker, G.** 1984. Mutagenesis and inducible response to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**, 60-93.

(Received November 23, 1999/Accepted December 6, 1999)

ABSTRACT: Production of Stress Shock Proteins DnaK and GroEL in *Burkholderia cepacia* YK-2 by Phenoxyherbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid as an Environmental Contaminant

Yun-Seok Cho, Sang-Ho Park¹, Chy-Kyung Kim¹, and Kye-Heon Oh* (Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. BOX 97, Asan, Chung-Nam 336-600; ¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Production of stress shock proteins in *Burkholderia cepacia* YK-2 in response to the phenoxyherbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an environmental contaminant was investigated. The stress shock proteins were synthesized at different 2,4-D concentrations in exponentially growing cultures of *B. cepacia* YK-2. This response involved the production of 43 kDa and 41 kDa GroEL proteins. The proteins were characterized by SDS-PAGE and Western blot using the anti-DnaK and anti-GroEL monoclonal antibodies. Total stress shock proteins were analyzed by 2-D PAGE. Survival of *B. cepacia* YK-2 with time in the presence of different concentrations of 2,4-D was monitored, and viable counts paralleled the production of the stress shock proteins in this bacterium.