

Bacillus lentimorbus WJ5의 분비 전용 Srb Homologue 발현과 항진균 활성

장유신 · 이영근* · 김재성 · 조규성 · 장병일

한국원자력연구소 방사선이용연구부

Bacillus sp.는 다량의 효소와 기능성 펩타이드들을 세포외로 분비하는 것으로 알려져 있다. Signal recognition particle (SRP)과 SRP receptor는 세포외 분비 단백질의 이동에 있어서 중심적 역할을 담당한다. *B. lentimorbus* WJ5의 DNA microarray 결과, 감마선 조사로 유도된 항진균 활성 결핍 돌연변이체인 WJ5m12에서 *B. subtilis* srb homologue (*srbL*)의 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. SRP receptor와 항진균 활성 사이의 연관성을 고찰하기 위하여 *B. lentimorbus* WJ5의 *srbL*을 PCR로 증폭하여 pQE30 vector에 클로닝하였으며, *B. lentimorbus* WJ5m12에 형질전환 시켰다. 형질전환된 *B. lentimorbus* WJ5m12::*srbL*은 항진균 활성이 복원되었다. 이차원 전기영동 결과, 수종의 세포외 분비 단백질의 전구체들이 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주에서 축적되었고 *B. lentimorbus* WJ5m12::*srbL*에서는 야생형 균주의 단백질 수준까지 감소되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 *B. lentimorbus* WJ5의 항진균 활성 관련 물질의 이동에 있어서 *srbL*이 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다.

Key words □ antifungal activity, *Bacillus lentimorbus* WJ5, protein secretion, Srb

Pseudomonas, *Streptomyces*, 그리고 *Bacillus*와 같은 항생물질을 생산하는 세균들은 식물병 억제에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(1-3). 이러한 세균들은 cellulase, chitinase, glucanase 등의 곰팡이 세포벽 분해효소, 펩타이드성 항진균 활성 물질 및 이차 대사산물을 분비하여 식물 병원성 곰팡이를 제어한다고 한다(4-6). 일반적으로 항진균 활성 펩타이드는 높은 친화도로 곰팡이 세포막에 결합하여 세포막의 기능을 손상시키는 Shai-Matsuzaki-Huang 모델에 따라 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(7-9).

이러한 항진균 활성 펩타이드는 translation 후 proteolytic processing, glycosylation, carboxy-terminal amidation, amino-acid isomerization 그리고 halogenation 등과 같은 post-translational modification을 거치는 것으로 알려져 있다(6, 10). 또한, post-translational modification 외에도 *Bacillus subtilis*의 Sec pathway 의존 단백질 분비 관련 구성 요소들의 연구도 진행하고 있다(10).

Chaperone은 단백질의 translocation factor로서 전단백질(preprotein)에 결합하여 접힘(folding)과 응집(agggregation)을 방지하는 역할을 한다. 이들 중 일부는 단백질분비 전용 chaperone으로서 단백질이 translocase로 targeting되는 것을 도와 준다. *B. subtilis*의 경우, 분비 전용 chaperone인 Ffh 단백질(fifty-four homologue)은 진핵세포 signal recognition particle 54 kDa

subunit (Srp54)과 상동성이 있는 것으로 알려져 있다(11). Ffh와 같이 분비 전용 chaperone으로 알려진 signal recognition particle (docking protein) Srb는 포유류의 SR α , *E. coli*의 FtsY, archaeobacteria의 DP α 와 유사한 기능을 하는 것으로 전단백질을 translocase로 targeting하는 데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(12). 그리고, *B. subtilis*에서는 포자 형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(13).

일반 chaperone으로 알려진 10 kDa의 GroES는 진핵생물과 여러 속의 세균에서 발견되는 보존성 heat shock protein의 일종으로 일반적으로 단백질의 folding과 assembly를 촉진하는 후-전이 조절자로 알려져 있다(10). *Mycobacterium avium*과 *Mycobacterium paratuberculosis*에서 대량으로 분비된 GroES는 immunodominant antigen으로 보고된 바 있다(14). 또한, Lee 등(15)은 *Streptomyces* sp. SAR01과 식물 병원성 곰팡이들간의 길항시험 결과 GroES가 항진균 활성에 관여하는 것으로 보고한 바 있다. 하지만, 지금까지 *Bacillus* sp.의 분비 전용 chaperone의 항진균 활성 관여에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

DNA microarray를 이용한 항진균 활성 균주 *Bacillus lentimorbus* WJ5와 감마선(⁶⁰Co) 유도 항진균 활성 결핍 돌연변이체들 사이의 유전자 발현 연구를 통하여 분비 전용 chaperone srb homologue (*srbL*)가 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주에서는 거의 발현되지 않으나 항진균 활성 균주에서는 발현이 증가하는 것으로 나타났다(16). 본 연구에서는 *srbL*을 클로닝하고 돌연변이 균주 *B. lentimorbus* WJ5m12에 형질전환시켜 단백질의 발현 패턴 및 항진균 활성을 시험함으로써 *srbL*의 항진균 활성 관련 역할에 대하여 고찰하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-868-8056, Fax: 042-862-6980
E-mail: yklee@kaeri.re.kr

재료 및 방법

항진균 활성 균주 및 방사선 유도 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주

항진균 활성 균주는 울진 해안의 토양으로부터 분리한 *B. lentimorbus* WJ5를 사용하였다. 야생형 균주에 방사선을 조사한 후(^{60}Co irradiator, AECL, dose rate: 920 Gy/hr, LD₉₅: 13.5 kGy) 식물 병원성 진균에 대하여 항진균 활성이 소실된 균주를 방사선 유도 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주로 분리하고, 이들 중 *B. lentimorbus* WJ5m12 균주를 형질전환 및 항진균 활성시험에 이용하였다(17, 18). *B. lentimorbus* WJ5는 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터(KACC)로부터 기증 받은 식물병원성 진균 *Alternaria alternata* KACC 40020, *Alternaria solani* KACC 40570, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Colletotrichum higginsianum* KACC 40193, *Fusarium oxysporum* KACC 40239, *Phytophthora capsici* KACC 40475, *Phytophthora melonis* KACC 40807, *Pythium ultimum* KACC 40705, 그리고 *Rhizoctonia solani* KACC 40124 모두에 대하여 항진균 활성을 나타내며, *B. lentimorbus* WJ5m12는 *P. melonis* KACC 40807에만 활성이 있고, 나머지 진균에 대해서는 항진균 활성이 결핍된 방사선 유도 돌연변이 균주이다(16).

srbL 클로닝 및 형질전환

염기 서열 분석은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems)로 하였으며, NCBI (The National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)로 상동성을 조사하였다. 확인된 염기 서열을 바탕으로 primer (K868-(5): 5'-CGG GAT CCA TGA GCT TCT TCA AGA AGT TAA A-3', K868-(3): 5'-GGG GTA CCT CTT AAT CGT CGG CTT TTT C-3')를 합성하였다. 클로닝을 용이하게 수행하고자 primer에 제한효소 인식 염기서열(*Bam*HI, *Kpn*I)을 5'-말단에 부착하였다(19). PCR 후 *Bam*HI 및 *Kpn*I 제한효소로 절단하여 pQE30 vector (Qiagen, Hilden, Germany)에 클로닝하였다.

E. coli XL1-Blue와 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주 *B. lentimorbus* WJ5m12를 각각 Luria-Bertani media (LB, Difco)와 nutrient broth (NB, Difco)에서 배양한 후 10% glycerol과 potassium electroporation buffer (PEB; 272 mM sucrose, 1 mM MgCl₂, 7 mM KH₂PO₄)로 3회 세척하고, 10% glycerol과 PEB에 분주하여 electro-competent cell로 사용하였다. 1 µg의 클로닝된 vector를 각각 90 µl electro-competent cell과 섞어 electroporation (*E. coli*: 25 µF, 200 Ω, 25 kV/cm; *B. lentimorbus*: 25 µF, 200 Ω, 10 kV/cm)하였다(20). 각각 900 µl의 LB와 NB를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 배양하여 50 µg/ml의 ampicillin이 첨가된 배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다.

단백질 분리 및 이차원 전기영동

세포내 단백질과 세포외 분비 단백질을 분리하기 위하여 각

균주를 500 ml NB에 8시간 액체배양 후, 최종 농도 3 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)를 첨가하고 9,000 × g로 20 분간 원심분리(Centrifuge MF-80, Hanil Science Industrial)하여 각각 균체 및 상등액을 회수하였다. 세포내외 단백질 추출은 세포 포쇄 및 acetone 추출 방법으로 수행하였다(21).

추출한 단백질 200 µg을 sample lysis buffer (9.5 M urea, 2.4% NP-40, 3% ampholyte, 0.1 M DTT)에 녹여 1차 전기영동으로 IEF (isoelectric focusing)를 실시하였다(21). IEF gel은 9.5 M urea, 2% NP-40, 4.5% acrylamide, 2.5% ampholyte로 조성하였으며, ampholyte는 pH 3-10:pH 4-6:pH 5-7:pH 6-8:pH 7-9의 비를 1:2.5:2:1:0.5로 조성하였다. Cathode buffer는 20 mM NaOH, anode buffer는 10 mM H₃PO₄로 하여 250, 300, 400 V에서 각각 30분간 전기영동하고, 이를 다시 600과 800 V에서 각각 16시간과 3시간 동안 전개하였다. IEF gel을 5 ml equilibration buffer (2.5% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8))에 넣어 30분간 교반한 후 2차로 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였다(22). 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, USA)를 이용하여 70 V에서 18시간 동안 전개하였다. 이차전기영동 후, 고정액 (50% methanol, 10% acetic acid)으로 고정하고 silver staining을 하였다(21).

결과 및 고찰

srbL 클로닝 및 형질전환

DNA microarray를 이용한 항진균 활성 균주 *Bacillus lentimorbus* WJ5와 감마선(^{60}Co) 유도 항진균 활성 결핍 돌연변이체들 사이의 유전자 발현 연구 결과, DNA chip ID K868이 항진균 활성 균주와 돌연변이 균주 사이에서 서로 다르게 발현 되는 것을 확인하였다(Fig. 1)(16). Fig. 1에서 보는 바와 같이 Chip ID K868은 항진균 활성 균주에서 발현 되는 반면 7개의 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주에서는 야생형 균주보다 발현이 감소하였으며, 식물 병원성 진균인 *C. gloeosporioides*와 동시배양한 야생형균주(WJ5WC1)에서는 발현이 증가되었다. *B. lentimorbus* WJ5에서만 발현이 증가된 K868은 항진균 활성과

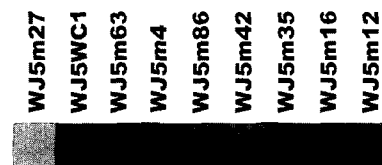


Fig. 1. *B. subtilis* *srb* homologue (DNA chip ID K868, *srbL*) expression profiles between antifungal bacterium of *B. lentimorbus* WJ5 and antifungal activity deficient mutants induced by gamma radiation (^{60}Co) (WJ5-m4, -m12, -m16, -m27, -m35, -m42, -m63, and -m86), and between *B. lentimorbus* WJ5 and *B. lentimorbus* WJ5 cultured with plant pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides* (WJ5WC1).



Fig. 2. Homology of *B. lentimorbus* WJ5 *srbL* (K868) to *B. subtilis* *srb* (gi:1237017). Identical bases are shown as black against a white background.

Table 1. Components of Sec-dependent protein export machineries of *Bacillus subtilis* (10)

Components	<i>B. subtilis</i>
Secretion-dedicated chaperones	Ffh, FtsY (Srb), scRNA CsaA
General chaperonins	GroEL, GroES DnaK, DnaJ, GrpE Trigger factor
Translocation motor	SecA
Translocation channel	SecY SecE SecZ
SPases	SecDF, YrbF SipS/T/U/V/P SipW LspA
SPPases	SppA TepA
Foldases (<i>trans-action</i> g)	PrsA BdbA/B/C

관련이 있을 것으로 추정되었다.

K868의 유전자 클로닝을 위하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과, *B. subtilis*의 *srb*와 80% (415/515) 상동성을 보였으며(Fig. 2), 단백질은 96% (165/171) 상동성을 보였다. Table 1에 나타난

1 2 3

Fig. 3. PCR amplification of β -lactamase (*bla*) (lane 1: pSRBL, lane 2: genomic DNA of *B. lentimorbus* WJ5m12, and lane 3: genomic DNA of *B. lentimorbus* WJ5m12::*srbL*).

바와 같이, Srb는 분비 전용 chaperone으로 알려져 있으며, ribosome에서 합성된 단백질 전구체와 SRP가 결합하여 형성된 복합체에 결합한 후 이들을 translocase로 targeting하는 데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(12). 또한, *Streptomyces* sp. SAR01의 경우 일반 chaperone인 GroES가 항진균 활성에 관여하는 것으로 알려져 있어(15), 분비 전용 chaperone인 *srb*도 *B. lentimorbus* WJ5에서 항진균 활성에 깊은 관련성이 있을 것으로 생각된다. *B. subtilis* *srb* 염기서열로부터 설계한 K868-(5)와 K868-(3) primer를 사용하여 *B. lentimorbus* WJ5의 *srb* 상동유전자인 *srbL*을 증폭하여 pQE30 vector에 클로닝하였다(pSRBL). 이를 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주 *B. lentimorbus* WJ5m12에 형질전환하여, genomic DNA에 integration된 *B. lentimorbus* WJ5m12::*srbL*을 얻었다(Fig. 3).

pSRBL을 *B. lentimorbus* WJ5m12에 형질전환하여 발현시킨 단백질을 이차원전기영동 분석한 결과 분자량과 pI가 각각 36.0 kDa과 5.3 부근에서 SrbL을 확인할 수 있었다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이, SrbL은 항진균 활성 균주 *B. lentimorbus* WJ5와 형질전환체 *B. lentimorbus* WJ5m12::*srbL*에서 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주 *B. lentimorbus* WJ5m12에서보다 발현이

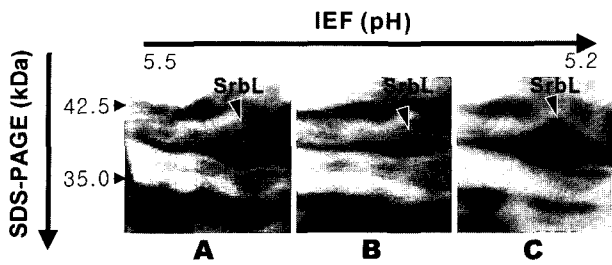


Fig. 4. Expression of SrblL in *B. lentimorbus* WJ5 (A), WJ5m12 (B), and WJ5m12::srbL (C).

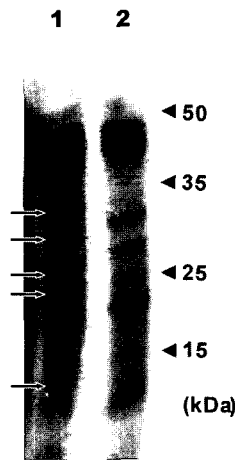


Fig. 5. Extracellular proteins of *B. lentimorbus* WJ5 (lane 1) and WJ5m12 (lane 2) profiled on a SDS-PAGE.

증가되었다. 이는 SrblL이 항진균 활성과 직접적으로 관련되어 있음을 시사해 준다.

세포내/외 단백질의 누적 및 분비

Bacillus sp.는 protease, lipase, carbohydrase, DNase, RNase 등과 같은 천연 고분자를 가수분해시키기 위한 효소, 세포의 밀도를 감지하고 조절하기 위한 PhrA-K, 그리고 펩타이드 항진균 활성물질 등 이차 대사산물을 분비하여 식물 병원성 곰팡이를 제어하는 것으로 보고되고 있다(4-6). 이러한 펩타이드 및 단백질 분자는 세포 내에서 합성되어 외부로 배출되어진다. Tjalsma 등 (10)의 보고에 따르면, 단백질의 분비와 관련된 유전자는 Table 1에 나타낸 바와 같이 *csaA*, *ffh*, *secA* 등의 유전자가 더 관여하는 것으로 알려져 있다. *srb*를 포함하는 단백질 분비 chaperone의 기능에 의해 세포내/외의 단백질 패턴의 변화가 있을 것으로 판단되어, 단백질 발현 패턴을 분석하였다.

B. lentimorbus WJ5와 이의 항진균 활성 소실 돌연변이체인 *B. lentimorbus* WJ5m12를 대상으로 세포의 분비 단백질(extracellular protein)을 추출하여 SDS-PAGE를 수행하여 외부로 분비되는 단백질의 종류와 양의 변화를 고찰하였다. Fig. 5는 *B. lentimorbus* WJ5와 WJ5m12의 세포의 분비 단백질의 발현 패턴을 SDS-PAGE로 관찰한 결과이다. Lane 1과 2는 각각 항진균

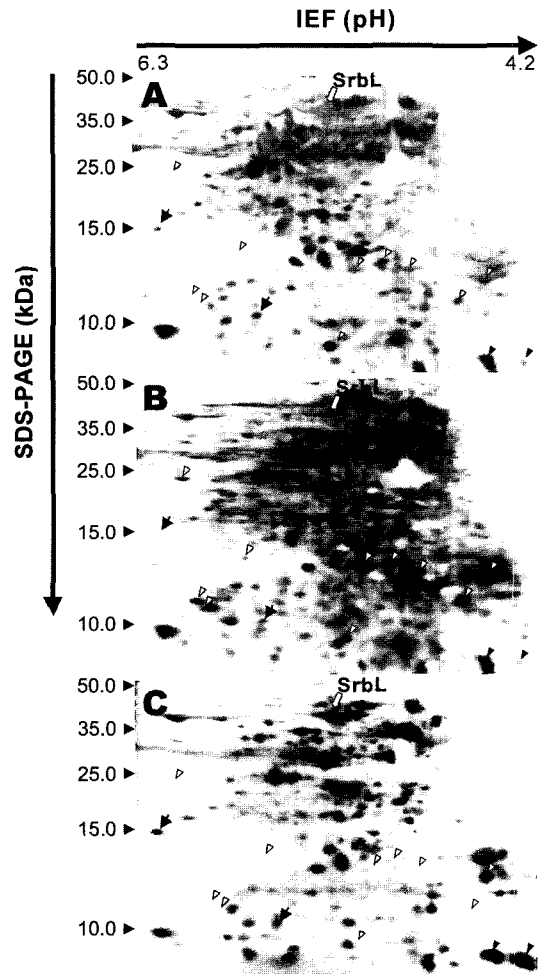


Fig. 6. 2D profiles of intracellular proteins from *B. lentimorbus* WJ5 (A), WJ5m12 (B), and WJ5m12::srbL (C). Intracellular proteins were separated and stained with silver nitrate (✓ : increased expression in *B. lentimorbus* WJ5 and WJ5m12::srbL, ▼ : increased expression in *B. lentimorbus* WJ5m12::srbL, ▽ : accumulated in *B. lentimorbus* WJ5m12 and decreased to be wild type levels in WJ5m12::srbL).

활성 균주 *B. lentimorbus* WJ5와 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주 *B. lentimorbus* WJ5m12가 균체로부터 배양매지로 분비한 단백질들이다. 항진균 활성 균주와 돌연변이 균주의 단백질 밴드를 비교해 볼 때, 돌연변이 균주에서 보다 항진균 활성 균주에서 더 많은 단백질이 관찰되었다. 이는 *B. lentimorbus* WJ5m12 균주의 *srbL*이 방사선을 이용한 돌연변이 유도 과정에서 손상되어 항진균 관련 단백질을 포함한 여러 단백질들의 분비가 원활하지 못함으로써 항진균 활성이 소실된 것으로 사료된다.

세포내에서도 단백질의 분비와 관련된 차이가 있는 지 고찰하기 위하여 세포를 파쇄하여 세포내 단백질을 추출하였으며, 단백질 발현 패턴을 분석하였다. Fig. 6은 *B. lentimorbus* WJ5, WJ5m12, 그리고 WJ5m12::srbL 균주의 세포내 단백질의 발현 패턴을 이차원 전기영동으로 관찰한 결과이다. A, B, C는 각각 *B. lentimorbus* WJ5, WJ5m12, 그리고 WJ5m12::srbL의 세포내 단백질 발현 패턴을 보여 준다. *B. lentimorbus* WJ5, WJ5m12,

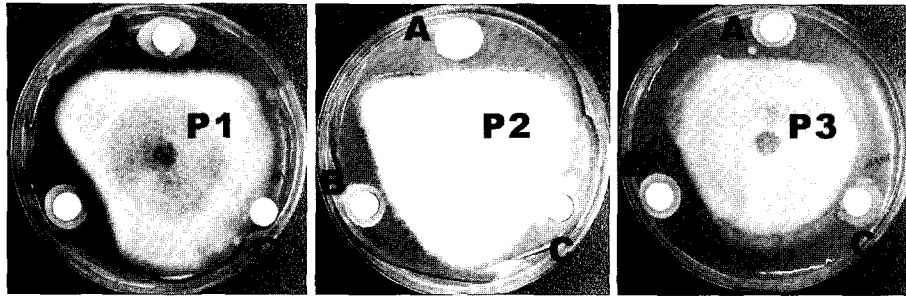


Fig. 7. Antifungal activity of transformant *B. lentimorbus* WJ5m12::srbL against three plant pathogenic fungi. P1: *Alternaria solani* KACC 40570, P2: *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, P3: *Colletotrichum higginsianum* KACC 40193, A: *B. lentimorbus* WJ5, B: WJ5m12::srbL, and C: WJ5m12.

그리고 WJ5m12::srbL에서 차이나게 발현된 SrbL (m.w.: 36.0 kDa, pI 5.3)을 관찰할 수 있으며, 전체적으로 방사선유도 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주 *B. lentimorbus* WJ5m12에서 일부 단백질이 세포외로 분비되지 않고 세포내에 누적되는 현상이 관찰되었다.

B. lentimorbus WJ5 또는 WJ5m12::srbL에서만 발현되거나 발현이 증가되는 단백질(화살표 및 검은 삼각형)은 4개가 관찰되었으며, 이들 중 *B. lentimorbus* WJ5m12::srbL에서만 발현이 증가되는 단백질(검은 삼각형)은 2개였다. *B. lentimorbus* WJ5m12에서 뚜렷한 차이를 나타내면서 세포 내에 누적되는 것으로 예상되는 단백질(흰 삼각형)은 10개가 관찰되었으며 이들은 형질 전환 후(Fig. 6C), 세포 외부로 대부분 분비되어 세포 내에서 농도가 낮아지는 것으로 관찰되었다. Fig. 6의 A와 B의 패턴을 비교해 볼 때, 세포내에서 뚜렷한 누적현상은 보이지 않지만 세포 내에 누적되는 단백질들도 일부 존재하는 것으로 생각된다. 이는 *B. subtilis*의 세포외 분비 단백질을 이차원전기영동 분석한 Hirose 등(23)의 보고와 유사한 결과이다. 이들은 *B. subtilis* 분비 전용 chaperone인 Ffh의 conditional mutant를 이용한 연구에서 IPTG로 Ffh의 발현을 유도하였을 경우 세포 외부로 분비되는 단백질이 20개가 관찰되었으나, Ffh의 발현을 유도하지 않은 조건에서는 이 단백질들이 이차원전기영동에서 모두 사라진 것으로 보고하였다. SRP/Sec 단백질 분비 기구에 의존하여 분비되는 것으로 알려진 *B. subtilis* 단백질은 spore-coat associated protein, murcin hydrolase, penicillinase, endo-1,4- β -xylanase, anion binding protein 등이 알려져 있다(10,23). SRP/Sec 단백질 분비 기구는 ribosome에서 합성된 단백질 전구체의 signal 서열에 SRP가 결합하게 되고, Srb는 이 ribosome-SRP 복합체에 결합하여 전단백질을 Sec로 유도하게 되므로 Srb 결핍 돌연변이체는 단백질의 세포외 분비를 감소시킬 수 있다.

***B. lentimorbus* WJ5m12::srbL의 항진균 활성 회복**

Fig. 7은 *B. lentimorbus* WJ5m12::srbL의 *A. solani* (P1), *C. gloeosporioides* (P2), *C. higginsianum* (P3)에 대한 항진균 활성 측정 결과이다. *B. lentimorbus* WJ5 (A)는 식물 병원균 모두에 대한 활성을 보이는 반면 *B. lentimorbus* WJ5m12 (C)는 전혀 활성을 나타내지 않는 것으로 관찰되었다. 항진균 활성이 없어진

B. lentimorbus WJ5m12에 pSRBL를 형질 전환시킨 *B. lentimorbus* WJ5m12::srbL (B)는 세 종류의 식물 병원균에 대한 항진균 활성이 회복되었다. *B. lentimorbus* WJ5m12::srbL (B)는 *A. solani* (P1)와 *C. higginsianum* (P3)에 대해 야생형 균주와 비슷한 항진균 활성을 보였으며, *C. gloeosporioides* (P2)에 대해서는 야생형 균주보다 활성이 감소한 것으로 관찰되었다. 이는 단백질 분비 전용 chaperone인 srbL이 *B. lentimorbus* WJ5의 항진균 활성에 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 따라서, *Streptomyces* sp. SAR01과 식물 병원성 곰팡이들간의 길항시험 결과 일반 chaperone인 GroES가 항진균 활성에 관여한다고도 하였던 바(15), 분비 전용 및 일반 chaperone 단백질들의 항진균 활성 관련 상호작용에 대한 연구가 필요하다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

1. Pauliz, T.C. and J.E. Lopper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phytophthora damping-off* of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* 81, 930-935.
2. Cook, R.J., L.S. Thomashow, D.M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Bangera, and D.-S. Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4197-4201.
3. Eppelmann, K., S. Doekel, and M.A. Marahiel. 2001. Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 276, 34824-34831.
4. 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.
5. Hoffmann, J.A., F.C. Kafatos, C.A. Janeway, and R.A. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
6. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
7. Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabili-

- zation of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 55-70.
8. Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplepsins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1-10.
 9. Yang, L., T.M. Weiss, R.I. Lehrer, and H.W. Huang. 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 79, 2002-2009.
 10. Tjalsma, H., A. Bolhuis, J.D.H. Jongbloed, S. Bron, and J.M. van Dijk. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 515-547.
 11. Honda, K., K. Nakamura, M. Nishiguchi, and K. Yamane. 1993. Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *J. Bacteriol.* 175, 4885-4894.
 12. Jerry, E. and M. Ralf. 2001. The signal recognition particle of *Archaea*. *Trends Microbiol.* 9, 130-136.
 13. Hiroshi, K., T. Hiromu, A. Reiko, N. Kouji, W. Kazuhito, and Y. Kunio. 2001. Effect of depletion of FtsY on spore morphology and the protein composition of the spore coat layer in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 41-46.
 14. Cobb, A.J. and R. Frothingham. 1999. The GroES antigens of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vert. Microbiol.* 67, 31-35.
 15. Lee, Y.-K., J.-S. Kim, K.S. Cho, B.I. Jang, and C.H. Choo. 2002. GroES expression related to antifungal activity of *Streptomyces* sp. SAR01. *Kor. J. Microbiol.* 38, 162-167.
 16. Lee, Y.-K., J.-S. Kim, Y.S. Jang, K.S. Cho, and H.-H. Chang. 2003. DNA microarray analysis of gene expression in antifungal bacterium of *Bacillus lentimorbus* WJ5. *Kor. J. Microbiol.* (submitted).
 17. 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.
 18. Chang, H.-H., Y.-K. Lee, J.-S. Kim, K.-S. Lee, and K.S. Cho. 2003. Mutation spectrum of manganese (II) peroxidase gene in *Pleurotus ostreatus* mutants induced by gamma radiation. *J. Microbiol.* 41, 52-57.
 19. 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. USA* 91, 5695-5699.
 20. Xue, G.P., J.S. Johnson, and B.P. Dalrymple. 1999. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. Microbiol. Methods* 34, 183-191.
 21. 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.
 22. O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
 23. Hirose, I., K. Sano, I. Shioda, M. Kumano, K. Nakamura, and K. Yamane. 2000. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology* 146, 65-75.

(Received July 28, 2003/Accepted September 8, 2003)

ABSTRACT : Expression of Secretion-dedicated *Srb* Homologue and Antifungal Activity of *Bacillus lentimorbus* WJ5

Yu-Sin Jang, Young-Keun Lee*, Jae-Sung Kim, Kyu Seong Cho, and Byung Il Jang (Radiation Application Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Yusong, Taejeon 305-353, Korea)

Bacillus sp. secretes high levels of extracellular enzymes into the culture medium. The signal recognition particle (SRP) and the SRP receptor play a central role in targeting presecretory proteins to the translocase. By the analysis of the DNA microarray of *B. lentimorbus* WJ5, it was detected that WJ5m12, antifungal activity deficient mutant induced by gamma radiation, had a down-regulated expression of the SRP receptor gene (*B. subtilis srb* homologue, *srbL*). To determine the relationship of SRP receptor to antifungal activity, *srbL* of *B. lentimorbus* WJ5 was amplified by PCR and ligated into pQE30 vector, and then transferred into WJ5m12. The transformant, WJ5m12::*srbL*, recovered the antifungal activity. From the 2-DE analysis, the several presecretory proteins accumulated in the mutant cell and decreased to a level of the wild type in WJ5m12::*srbL*. It seems that the *srbL* could play an important role in the secretion of the antifungal activity related proteins of *B. lentimorbus* WJ5.