

DNA microarray를 이용한 항진균 활성세균 *Bacillus lentimorbus* WJ5의 유전자 발현 분석

이영근* · 김재성 · 장유신 · 조규성 · 장화형

한국원자력연구소 방사선이용연구부

여러 항진균 활성 관련 유전자들의 발현 수준을 동시에 연구하기 위하여 DNA microarray를 이용하여 유전자들의 발현 패턴을 비교 분석하였다. 본 연구에서는 항진균 활성을 가지는 *Bacillus lentimorbus* WJ5의 genomic DNA를 무작위하게 제한효소로 절단하여 2,000개의 DNA 단편을 microarray하였으며, 감마선(^{60}Co) 조사로 유도된 7종의 항진균 활성 결핍 돌연변이체와 발현양상을 정량적으로 비교하였다. Gene Cluster (Michael Eisen, Stanford Univ.)를 이용한 DNA microarray의 분석 결과, 총 408개의 DNA 단편이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 이들 중 20개의 DNA 단편이 항진균 활성 결핍 돌연변이체에서 발현이 억제되는 것으로 나타났다. 특히, *pbuX* (xanthine permease, K222), *ywbA* (phosphotransferase system enzyme II, K393), *ptsG* (PTS glucose specific enzyme II ABC component, K877), *yufO* (ABC transporter(ATP-binding protein), K1301), 그리고 *ftsY* (signal recognition particle (docking protein), K868)는 모든 돌연변이체에서 동시에 발현되는 down-regulation된 유전자들로서 물질 이동과 관련된 것으로 보고되어 있으며, 항진균 활성 관련 신호 및 물질의 이동에 관여할 것으로 사료되어진다.

Key words □ antifungal activity, *Bacillus lentimorbus* WJ5, DNA microarray, gamma radiation, mutant

Bacillus 속 균주들은 내생 포자를 가지고 있는 Gram 양성 세균으로, 많은 물질들을 세포 외부로 분비하는 것으로 보고되어 있어 각종 효소나 유용 화합물의 산업적 생산을 위한 숙주균으로 활발히 이용되고 있으며, 최근에는 iturin계 물질을 생산하여 항진균 활성을 나타내는 균주도 보고된 바 있다(1, 2). 항진균 활성 균주의 식물병원성 진균에 대한 작용 기작으로는 진균 외막 가수분해 효소를 이용한 용균작용, 항진균성 항생물질에 의한 항생작용(antibiosis), 그리고 siderophore에 의한 경쟁적 길항작용(competitive antagonism) 등이 알려져 있다(3). 이러한 항진균 활성 기작은 수 많은 유전자들에 의해서 조절되어지며, 최근 항진균 기작과 관련된 물질을 합성하는 유전자들도 일부 보고되고 있다(4).

한편, 생물들은 이온화방사선에 노출되면 세포내 DNA에서 다양한 돌연변이가 야기되는 것으로 알려져 있다(5). 방사선화학에 사용되는 선원은 크게 천연방사성동위원소(라듐, 라돈 등)와 인공방사성동위원소(코발트-60, 세슘-137, 스트론튬-90 등)로 분류할 수 있으며, 이들은 α , β , 그리고 γ -선원으로 대별된다. 인공방사성동위원소인 코발트-60의 경우는 γ -선원으로 가장 많이 사용되고 있으며 1.33 및 1.17 MeV의 광자를 방출한다. 이러한 γ -선은 α 또는 β -선과는 달리 전하를 띠지 않기 때문에 생물체를 구성하는 전자와 작용이 쉽게 일어나지 않아 투과력이 매우 높으며, 세포내의 전자와 한번 충돌하면 대부분의 에너지를 잃어

버려 소멸되는 것으로 알려져 있다(6). 1927년 이온화 방사선이 돌연변이원으로 알려진 이래 DNA 손상에 의한 돌연변이 기작의 일부가 연구되어졌으며, 돌연변이체 유도에 유용한 물리적 방법으로 보고되고 있다(7-10). 방사선으로 유도된 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주는 항진균 활성 관련 유전자 연구에서 야생형 균주에 대한 비교 대상으로서 그 중요성이 매우 크며, Lee 등(9)은 *Streptomyces* sp. SAR01 균주와 γ -선 조사하여 유도된 항진균 결핍 돌연변이 균주 사이에서 발현되는 단백질 패턴을 분석하여 GroES가 항진균 활성에도 관련된 단백질임을 보고한 바 있다.

항진균 활성 야생형과 돌연변이 균주의 유전자 발현 패턴을 비교연구하는 방법으로는 differential display PCR(DD-PCR)(11), serial analysis gene express(SAGE)(12), expressed sequence tags (EST) database comparison(13) 등이 있다. 반면, Schena 등(14)이 개발한 DNA microarray는 상기의 방법들이 가지지 못하는 특정 세포에서 발현되는 유전자의 발현 양상을 동시 다발적으로 분석할 수 있는 장점을 지닌 기술로서 특이적으로 발현되는 유전자들을 database와 연결하여 특성을 알아 볼 수 있다는 특징을 가지고 있다.

항진균 활성 기작은 수 많은 유전자들에 의하여 조절되어지기 때문에 DNA chip을 이용하여 게놈 차원에서 항진균 활성 관련 기능 유전자의 발현 변화를 비교 분석하는 것은 단지 유전자를 검색하고 확보하는 측면뿐만 아니라 항진균 기작을 연구하는데 있어서 매우 중요하나, 아직 이러한 연구는 거의 진행된 바가 없다.

본 연구에서는 항진균 활성 균주인 *B. lentimorbus* WJ5와 방사선 조사로 유기된 항진균 활성 결핍 돌연변이체들 사이에서 차이

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

나게 발현되는 유전자를 DNA microarray로 동시 다발적으로 탐색하여 항진균 활성 관련 유전자들의 상호 관계를 고찰하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 방사선 돌연변이체 유도

항진균 활성 균주의 분리를 위하여 강원도 울진에서 채취한 토양 1 g을 0.8% 식염수 20 ml에 넣고 30분간 교반한 후, 상등액 100 μ l을 NA (nutrient agar, Difco, USA) 배지에 도말하였으며, 37°C에서 16시간 배양 후 특징적인 콜로니를 항진균 활성세균 후보군으로 이용하였다. 일차적으로 *Candida albicans*를 대상으로 항진균 활성을 측정한 뒤, 최종 선별된 항진균 활성 세균을 대상으로 *Rhizoctonia solani*를 포함한 식물병원성 진균류 8종에 대한 길항실험을 수행하여 항진균 활성 세균을 최종 선별하였다.

항진균 활성 세균은 Gram stain을 시행한 후(Gram+), API 50CHB kit를 이용하여 생화학적 특성을 분석하고(*Bacillus subtilis* 61%) fatty acid pattern 분석(MIDI system)(*Bacillus lentimorbus* 75.3%)과 16S rDNA 염기서열 분석(*Bacillus lentimorbus* 99.9%)을 연계하여 동정하였다.

전 배양한 균주를 방사선 조사하고(^{60}Co irradiator, AECL, dose rate: 920 Gy/hr, LD₉₅: 13.5 kGy) *P. capsici*가 접종된 PDA 배지에 접종하여 3일 배양 후, 항진균 활성에 변화를 보이는 균주를 돌연변이체 후보 균주로 선정하였다. 선별된 후보 균주의 각 세균 배양액 50 μ l를 paper disc에 접종하여 37°C에서 3일 동안 배양한 후, 야생형 균주와 비교하여 항진균 활성이 소실된 균주를 방사선 조사에 의해 유도된 돌연변이체로 최종 선별하였다.

DNA Microarray의 제작 및 분석

2,000개의 DNA 단편을 microarray하기 위하여 항진균 활성 균주 *B. lentimorbus* WJ5의 genomic DNA를 *EcoRI*과 *Sau3AI* 제한효소로 절단하였다. 이들을 agarose gel에 전기영동하여 500-1,000 bp 크기의 genomic DNA 단편을 회수하였으며, 이미 *EcoRI*과 *BamHI* 제한효소로 절단해 놓은 pSK(+) vector에 클로닝하였다. Genomic DNA 단편이 cloning된 pSK(+) vector DNA를 *E. coli* XL1-Blue host cell에 electroporation하여 암피시린 배지에서 푸른색의 colony를 형성하는 것을 선택하였다. T7 및 T3 primer를 이용하여 colony PCR하여 product가 500-1,000 bp임을 확인하는 방법으로 2,000개의 genomic DNA 단편을 얻어 정제하였다. Microarray는 Schena 등(14)의 방법을 응용하여 Telechem Stealth SMP3 (Telechem International Inc.)를 이용하여 정제된 2,000개의 PCR product를 pin 방식으로 제작하였다.

항진균 활성 균주 *B. lentimorbus* WJ5 및 이들의 항진균 활성 소실 돌연변이체인 *B. lentimorbus* WJ5-m4, -m12, -m16, -m35, -m42, -m63, 그리고 -m86 균주를 각각 NB배지를 이용하여 8시간 동안 37°C에서 배양한 후 harvesting하여 RNeasy (QIAGEN)를 이용하여 column법으로 total RNA를 분리하였으며, 식물 병원성 미생물과 동시 배양한 균주인 *B. lentimorbus* WJ5WC1의 total RNA도 분리하였다. RNA의 정량은 500배 희석하여 UV/

vis 분광 광도계를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, OD_{260/280} 값으로부터 순도를 확인하였으며 probe 제작 전까지 -70°C에서 보관하였다. 형광 표지된 cDNA probe는 역전사 반응을 통하여 준비하였다. 100 μ g의 total RNA, 5 μ g random 6-mer primer (Amersham Pharmacia)를 이용하여 65°C에서 10분간, 얼음에서 1분 정도 방치한 후 1 μ l dNTPs (25 mM; dA, C, GTP), 3 μ l 0.1 M DTT, 6 μ l 5 \times first-stand buffer, 3 μ l씩의 Cy3-dUTP (NEN, 1 mM)와 Cy5-dUTP (NEN, 1 mM)을 각각 Cy3 reaction tube(항진균 활성 균주)와 Cy5 reaction tube(돌연변이 균주)에 넣고, 2 μ l Superscript II (Gibo-BRL, 200 u/ μ l) enzyme으로 42°C에서 2시간 동안 반응시켜 reverse transcription 과정에서 Cy3-dUTP와 Cy5-dUTP가 incorporation되도록 하였다. 15 μ l 0.1 N NaOH를 넣고 65-70°C에서 30분동안 반응시켜 RNA를 제거하고 15 μ l 0.1 N HCl로 중화시켰으며, 에탄올 침전 후 20 μ l의 3차 멸균 증류수에 녹여서 hybridization 반응에 사용하였다.

Array 위에 준비된 prehybridization buffer 15 μ l를 놓고 cover glass로 덮어 50 ml tube에 2 \times saline sodium citrate buffer (2 \times SSC) 500 μ l를 넣어 상온에서 2시간 방치하였다. 그리고, 2 \times SSC에서 2분동안 씻어주고, 0.2 \times SSC에서 2분간 세정하였다.

Probe를 95°C에 2분간 끓인 후 곧바로 얼음에 놓고, 15,000 \times g에서 8분동안 원심 분리하여 준비된 15 μ l probe를 놓고 cover glass를 덮었다. 이를 2 \times SSC 1 ml정도 뿌려 놓은 50 ml 튜브에 넣어 62°C hybridization incubator에서 12시간 동안 hybridization 시켰다. 2 \times SSC/0.2% sodium dodecyl sulfate(SDS)로 58°C에서 30분 동안 2번 씻어주고, 0.05 \times SSC로 5분간 상온에서 세정하였다.

Microarray scanner를 이용하여 GenePix Pro 3.0으로 slide를 red와 green 파장에서 스캔하여 각각의 이미지를 저장하고 유전자들의 발현 양상을 분석하였다(15-17). Microarray의 결과는 RT-PCR(30 cycle)로 재확인하였다.

결과 및 고찰

감마선(^{60}Co)을 이용한 항진균 활성 결핍 돌연변이체 유도

B. lentimorbus WJ5를 LD₉₅인 13.5 kGy에서 감마선(^{60}Co)을 조사하였다. *P. capsici*가 접종된 PDA배지에 접종하여 3일 배양 후, 항진균 활성에 변화를 보이는 90균주를 돌연변이체로 선정하였다. 각 세균 배양액 50 μ l를 paper disc에 접종하여 37°C에서 3일 동안 배양한 후, 야생형 균주와 비교하여 항진균 활성이 변화된 7균주를 방사선 조사에 의해 유도된 돌연변이체로 선택하였다. 항진균 활성이 소실된 돌연변이 균주는 각각 *B. lentimorbus* WJ5-m4, -m12, -m16, -m35, -m42, -m63, 그리고 -m86로 명명하였다.

항진균 활성 스펙트럼

Table 1은 항진균 활성 균주인 *B. lentimorbus* WJ5와 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주들의 식물 병원성 진균에 대한 항진균 활성 spectra를 나타낸 것이다. 7종의 돌연변이체들은 9종의 식물

Table 1. Antifungal spectra of *Bacillus lentimorbus* WJ5 and mutants against several plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Antifungal activities of WJ5 and mutants							
	WJ5	WJ5m4	WJ5m12	WJ5m16	WJ5m35	WJ5m42	WJ5m63	WJ5m86
<i>Alternaria alternata</i>	+	–	–	NT	NT	–	NT	NT
<i>Alternaria solani</i>	+	–	–	NT	NT	–	NT	NT
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	–	–	NT	NT	–	NT	NT
<i>Phytophthora capsici</i>	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Phytophthora melonis</i>	+	+	+	NT	NT	+	NT	NT
<i>Pythium ultimum</i>	+	–	–	NT	NT	–	NT	NT
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	–	–	NT	NT	–	NT	NT

NT; not tested

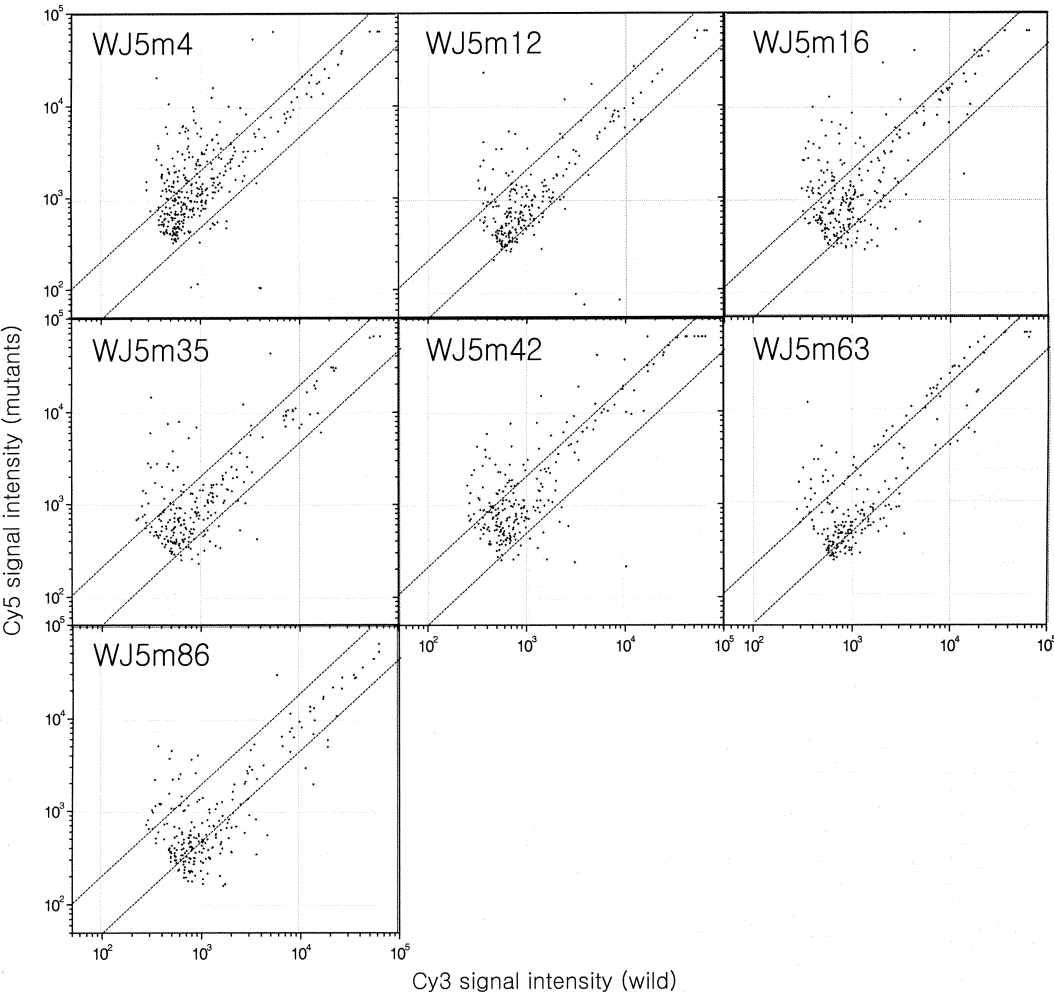


Fig. 1. Comparison of gene expression profiles between antifungal bacterium of *B. lentimorbus* WJ5 and antifungal activity deficient mutants induced by gamma radiation (^{60}Co).

병원성 진균 중 *Phytophthora melonis*에 대해서만 항진균 활성을 유지하고 있었으며, 나머지 식물 병원성 진균에 대해서는 활성이 소실되었다. 항진균 활성이 소실된 돌연변이 균주들은 항진균 활

성을 나타내지 못할 뿐만 아니라 식물 병원성 곰팡이의 포자형성을 유도하지도 않는 것으로 나타났다. 이는 식물병원성 곰팡이의 생육을 저해할 수 있는 충분한 화합물이나 펩타이드성 물질

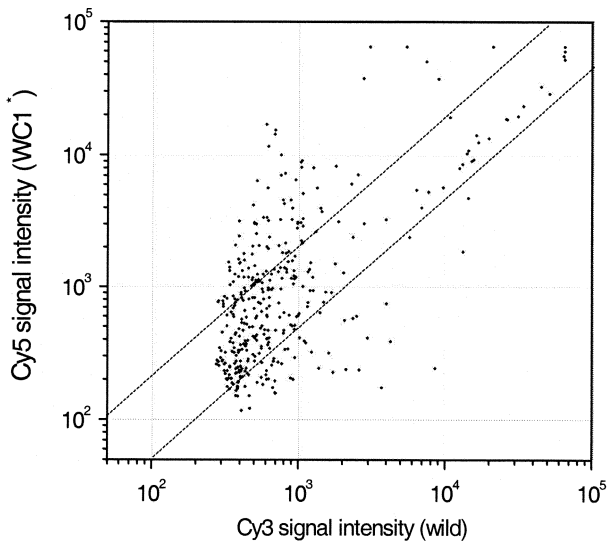


Fig. 2. Comparison of gene expression profiles between antifungal bacterium of *B. lentimorbus* WJ5 and *B. lentimorbus* WJ5WC1.

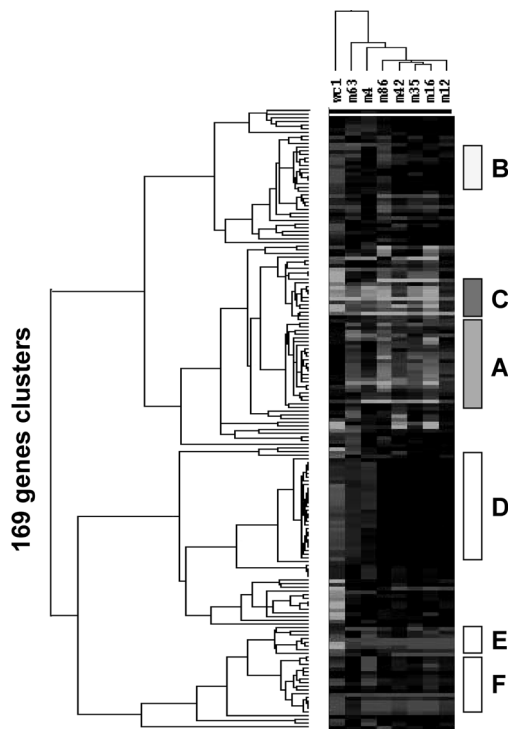


Fig. 3. Hierarchical clustering of gene expression data between antifungal bacterium of *B. lentimorbus* WJ5 and antifungal activity deficient mutants induced by gamma radiation (^{60}Co).

의 신호를 내지 못하기 때문인 것으로 생각된다.

항진균 활성 관련 유전자 발현 분석

DNA microarray를 microarray scanner를 이용하여 슬라이드를 532 nm(Cy3)와 635 nm(Cy5)에서 각각 스캔한 결과 각 돌연변이

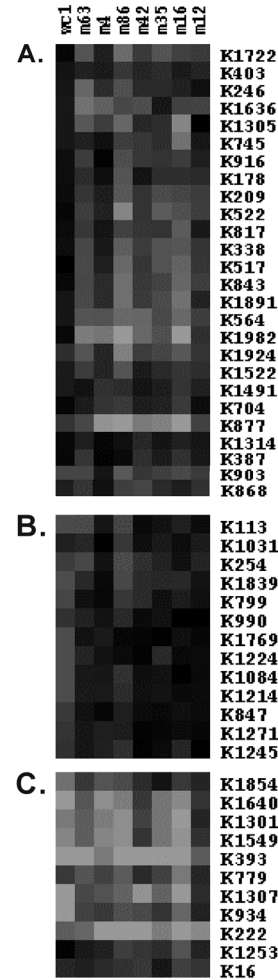


Fig. 4. Characterized genes suppressed in mutants: (A) genes largely dependent on antifungal activity in response to plant pathogen, (B) genes partially dependent on antifungal activity in response to plant pathogen, (C) genes dependent on antifungal activity not in response to plant pathogen.

체 시료마다 408여개의 발현된 spot들을 확인 할 수 있었다. 두 형광 검출 파장에 있어서 형광 신호(signal)의 중간값의 합(sum of median)이 300이하인 spot은 무효로 판단하여 그들을 제외한 유효 signal의 전체값과 중간값을 맞추어 보정 계수를 산출하는 global normalization법(15-17)을 이용하여 각 signal의 spot 강도를 보정하였다.

Figs. 1과 2는 각 spot의 강도를 보정한 후 Cy3와 Cy5 형광 signal 값을 scatter plot으로 나타낸 것이다. Fig. 1은 야생형 균주(x-축)와 돌연변이 균주(y-축)들의 발현을 비교한 것이고, Fig. 2는 야생형 균주(x-축)와 식물 병원균 *C. gloeosporioides*에 의해서 자극되어진 야생형 균주(y-축)의 유전자 발현 패턴을 비교한 것이다. Figs. 1과 2의 점선은 Cy3와 Cy5의 signal 비가 1:5(또는 5:1)인 경우의 이론값을 나타낸다. 항진균 활성 균주와 결핍 돌연변이주간에 각 유전자의 발현량 차이를 조사해 본 결과, 항진균 활성 균주인 *B. lentimorbus* WJ5에서 5배 이상의 발현 상

승을 나타낸 유전자는 각 돌연변이 균주에 대하여 12에서 60개 까지 차이를 나타내었으며, 5배 이상의 발현 감소를 나타낸 유전자도 21에서 83개까지 돌연변이에서 약간씩의 차이를 보였다. 이러한 결과는 방사선에 의한 DNA 돌연변이가 유전자의 발현 양상에 변화를 초래한 것으로 판단되며, 이로 인하여 돌연변이 균주에서 항진균 활성이 소실된 것으로 생각되어진다. 야생형 균주를 식물 병원균 *C. gloeosporioides*와 동시배양을 통하여 항진균 활성을 자극한 *B. lentimorbus* WJ5WC1에서는 87개 up-

regulation과 47개의 down-regulation이 5배 이상 발현차이를 보였다. 특히, 돌연변이 균주들과 비교하여 *B. lentimorbus* WJ5와 *B. lentimorbus* WJ5WC1에 동시에 5배 이상 up-regulation되는 유전자들은 항진균 활성과 보다 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

Fig. 3은 169 DNA microarray를 클러스터링하여 나타낸 것이다. Group A(Fig. 4A)의 경우는 식물 병원성 곰팡이와 동시배양한 *B. lentimorbus* WJ5WC1에서 강하게 발현되고 mutants에서는

Table 2. List of genes differentially expressed between antifungal bacterium of *B. lentimorbus* WJ5 and antifungal activity deficient mutants induced by gamma radiation (^{60}Co)

Functional class*	Spot ID	Gene	Function	Group clustered
I-1	K903	<i>yqfZ</i>	Peptidoglycan acetylase	A
	K1224	<i>gcaD</i>	UDP, N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	B
I-2	K222	<i>pbuX</i>	Xanthine permease	C
	K393	<i>ywbA</i>	Phosphotransferase system enzyme II	C
	K877	<i>ptsG</i>	PTS glucose specific enzyme II ABC component	A
	K1301	<i>yufO</i>	ABC transporter (ATP-binding protein)	C
	K868	<i>ftsY, srb</i>	Signal recognition particle (docking protein)	A
II-1	K1214	<i>citG</i>	Fumarate hydratase	B
	K1769	<i>tkt</i>	Transketolase, pentose phosphate	B
II-2	K1924	<i>tdk</i>	Thymidine kinase	A
III-1	K1522	<i>ypvA</i>	ATP-dependent helicase	A
III-2	K517	<i>recN</i>	RecN, recombination protein and sporulation protein	A
III-3	K338	<i>spo0A</i>	Central role in the initiation of sporulation	A
III-4	K564	<i>rncS</i>	Ribonuclease III	A
III-5	K462	<i>rplP</i>	Ribosomal protein L16	B
	K990	<i>yloP</i>	Protein kinase	B
	K1031	<i>prfB</i>	Peptide chain release factor 2	B
III-6	K740	<i>yloP</i>	Protein kinase	B
	K843	<i>yabC</i>	Unknown	A
	K847	<i>yabO</i>	Hypothetical proteins	B
	K934	<i>ytrI</i>	Unknown	C
	K1245	<i>yphP</i>	Hypothetical protein	B
	K1549	<i>yufP</i>	Unknown	C
IV	K1640	<i>yufP</i>	Unknown	C
	K209		No similarity	A
	K854		No similarity	A
	K1271		No similarity	B
	K1636		No similarity	A
	K1722		No similarity	A
	K1737		No similarity	B
	K1891		No similarity	A
V	K1982		No similarity	A

*I-1: cell wall, I-2: transport/binding proteins and lipoproteins, I-3: protein secretion, II-1: metabolism of carbohydrates and related molecules, II-2: metabolism of nucleotides and nucleic acids, III-1: DNA restriction/modification and repair, III-2: DNA recombination, III-3: RNA synthesis, III-4: RNA modification, III-5: protein synthesis, III-6: protein modification, IV: similar to unknown protein, and V: no similarity.

거의 발현되지 않는 유전자로 구성되어 있다. Group B (Fig. 4B)는 식물 병원성 곰팡이와 동시배양에서는 강하게 발현되면서 야생형 균주와 돌연변이 균주에서 비슷하게 발현되는 유전자들을, Group C (Fig. 4C)는 wild에서만 발현되는 유전자로서 식물 병원성 곰팡이와 동시배양에 의해 자극되지 않는 유전자들로 클러스터링된 것이다. 그리고, Group D, E, F는 항진균 활성과 밀접한 관계를 가지지는 않을 것으로 생각되는 유전자들의 집합이다. RT-PCR을 함으로써 DNA microarray의 분석을 검증한 결과 이중 Group A의 유전자 3개에 대한 동일한 발현 양상을 보임을 확인하였다(Fig. 5).

항진균 활성과 관련이 있을 것으로 생각되는 Group A, B, C 클러스터의 염기서열을 각각 분석하였다(ABI PRISM 3700 DNA Analyzer, Applied Biosystems). 기능성에 따라 5개의 class로 대별할 수 있었다(Table 2). Table 2에서 보는 바와 같이, 32개의 유전자 중 K209, K854 등을 포함하는 8개(Table 2, functional class V)는 아직까지 보고된 바가 없는 상동성이 없는 유전자였으며, K843, K847 등을 포함하는 6개(Table 2, functional class IV)는 기능이 밝혀지지 않은 유전자로 나타났다. 나머지 상동성이 높은 18개의 유전자는 기능별로 분류하여 항진균 활성과의 연관성을 고찰해 보았다. Functional class I은 세포 벽과 cellular processes에 관련된 유전자들이며, II와 III은 각각 intermediary metabolism과 information pathways에 관련된 유전자들로 구성되어 있다. 이는 특정 소수의 유전자를 knockout 시키는 등의 통상 방법에 비해 방사선을 조사함으로써 기능적으로 서로 연관된 수종의 유전자들의 탐색이 가능함을 시사해 준다.

Functional class I-2와 I-3은 수송이나 분비 기능과 관련이 있는 유전자들로서 항진균 활성 균주에서 강하게 발현되는 부류이다. *pbuX* (xanthine permease, K222)(18), *ywbA* (phosphotransferase system enzyme II, K393)(19, 20), *ptsG* (PTS glucose specific enzyme II ABC component, K877)(19, 20), 그리고 *yufO* (ABC transporter (ATP-binding protein), K1301)(21)는 수송 관련 단백질(functional class I-2)로 알려져 있으며, *ftsY* (signal recognition particle (docking protein), K868)(21)는 단백질 분비(functional class I-3) 기능을 하는 것으로 보고되어 있다.

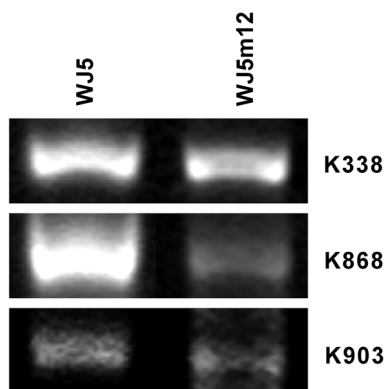


Fig. 5. RT-PCR analysis of mRNA expression. The PCR reactions were sampled at 30 cycles.

약 26개의 family가 알려져 있는 xanthine permease는 구조적으로 잘 동정되어 있지 못하고 다른 기질들을 수송할 수도 있을 것으로 보고되고 있으며(18), 이는 항진균 활성 펩타이드 및 화합물의 이동 채널로서의 이용 가능성을 시사해준다.

*PtsG*는 탄화수소를 인산화탄화수소로 전환시키는 촉매역할을 하며, 동시에 기질을 cytoplasmic binding site에 까지 수송하는 것으로 알려져 있고(19, 20), 리보솜에서 합성되는 펩타이드 항생 물질은 세포막을 통한 tranlocation을 위한 signal peptide를 가지고 있어서 전용 ABC transporter에 의해서 traslocation되는 것으로 알려져 있다(23).

Signal recognition particle (docking protein)은 protein 분비와 관련된 단백질로 알려져 있으며, *B. subtilis*에서의 *srb*는 포자 형태의 변화에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(24).

이 유전자들은 돌연변이 균주에서만 down-regulation되었고 *B. lentimorbus* WJ5WC1에서는 반대로 up-regulation되었다는 점에서 항진균 활성물질 관련 수송 및 분비에 깊이 관여할 것으로 기대된다. 또한, 감마선 조사로 유도된 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주를 대부분은 단백질 및 물질 이동과 분비에 관련된 유전자가 돌연변이를 일으킴으로써 그 활성이 소실된 것으로 생각된다. 항진균 활성 결핍 돌연변이 균주에서 발현되지 않았으나 기능이 밝혀지지 않은 유전자들(functional class IV, V)이 상당수 있는 것으로 보아 항진균 활성 관련 유전자들의 조절 기작을 밝히기 위해서는 이들에 대한 보충 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

1. Yu, G.Y., J.B. Sinclair, G.L. Hartman, and B.L. Bertagnolli. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34, 955-963.
2. Syuntaro, H., Y. Shigenobu, S. Hajime, Y. Hiroshi, and F. Yoshiharu. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochem.* 61, 693-698.
3. 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.
4. 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.
5. Becker, D. and M. Sevilla. 1993. The chemical consequences of radiation damage to DNA. *Adv. Radiat. Biol.* 17, 121-180.
6. Sauer, Jr., M.C., I.A. Shkrob, and A.D. Trifunac. 2001. Radiation chemistry of organic liquids: saturated hydrocarbons, p. 175-221. In C.D. Jonah and B.S.M. Rao (eds.), *Radiation chemistry: present status and future prospects*. Elsevier, Amsterdam.
7. Lee, Y.-K., H.-H. Chang, J.-S. Kim and K.-S. Lee. 2000. Ligno-

- cellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. *Radiat. Phys. Chem.* 57, 145-150.
8. Lee, Y.-K., J.-S. Kim, I.-G. Song, H.-Y. Chung, and H.-H. Chang. 2001. Characteristics of antifungal bacterium, *Bacillus subtilis* YS1 and its mutant induced by gamma radiation. *Kor. J. Microbiol.* 37, 305-311.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Liang, P. and A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 258, 967-971.
 12. Velculesu, V.E., L. Zhang, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.
 13. Vasmatazis, G., M. Essand, U. Brinkmann, B. Lee, and L. Pastan. 1998. Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 300-304.
 14. Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis, and P.O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
 15. Chen, Y.J., R. Kodell, F. Sistare, K.L. Thompson, S. Morris, and J.J. Chen. 2003. Normalization methods for analysis of microarray gene-expression data. *Biopharm. Stat.* 13, 57-74.
 16. Colantuoni, C., G. Henry, S. Zeger, and J. Pevsner. 2002. SNO-MAD (Standardization and Normalization of MicroArray Data): web-accessible gene expression data analysis. *Bioinformatics* 18, 1540-1541.
 17. Colantuoni, C., G. Henry, S. Zeger, and J. Pevsner. 2002. Local mean normalization of microarray element signal intensities across an array surface: quality control and correction of spatially systematic artifacts. *Biotechniques* 32, 1316-1320.
 18. Saier, Jr., M.H., H.E. Brian, F. Sharouz, G. Joy, A.H. David, J.H. William, L.J. Donald, C.L. Eric, J.L. Howard, P.N. David, M.O. Asad, S.P. Stephanie, T.P. Ian, A.Q. John, S. Marek, T.T. Tseng, W. Shinichiro, and B.Y. Gregory. 1999. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *BBA-Rev. Biomembr.* 1422, 1-56.
 19. Robillard, G.T. and J. Broos. 1999. Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *BBA-Rev. Biomembr.* 1422, 73-104.
 20. Pavel, K., I. Masayuki, and Y. Hildeki. 2001. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate and control of carbon metabolism uptake. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 502-517.
 21. 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.
 22. Duitman, E.H., L.W. Hamoen, W. Rembold, G. Venema, H. Seitz, W. Saenger, F. Bernhard, R. Reinhardt, M. Schmidt, C. Ullrich, T. Stein, F. Leenders, and J. Vater. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13294-13299.
 23. Havarstein, L.S., D.B. Diep, and I.F. Nes. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16, 229-240.
 24. 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.

(Received June 2, 2003/Accepted September 8, 2003)

ABSTRACT: DNA Microarray Analysis of Gene Expression in Antifungal Bacterium of *Bacillus lentimorbus* WJ5

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

The simultaneous expression levels of antifungal activity related genes was analyzed by DNA microarray. We constructed DNA chips contained 2,000 randomly digested genome spots of the antifungal bacterium of *Bacillus lentimorbus* WJ5 and compared its quantitative aspect with 7 antifungal activity deficient mutants induced by gamma radiation (^{60}Co). From the analysis of microarray hybridization by the Gene Cluster (Michael Eisen, Stanford Univ.), totally 408 genes were expressed and 20 genes among them were significantly suppressed in mutants. *pbuX* (xanthine permease, K222), *ywbA* (phosphotransferase system enzyme II, K393), *ptsG* (PTS glucose specific enzyme II ABC component, K877), *yufO* (ABC transporter (ATP-binding protein), K1301), and *fisY* (signal recognition particle (docking protein), K868) were simultaneously down-regulated in all mutants. It suggested that they were supposed to be related to the antifungal activity of *B. lentimorbus* WJ5.