

Methanol 자화 방선균으로부터 Aminoglycoside 내성 저해물질의 정제 및 특성

김현수* · 신재욱¹

계명대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹일양약품 중앙연구소

Purification and Characterization of Aminoglycoside-Resistant Inhibitor from Methylophilic Actinomycetes. Kim, Hyun-Soo* and Jae-Ouk Shin¹. Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea, ¹Biotechnology Lab., Il Yang Pharm. Co., Ltd., Kyunggi 449-900, Korea-Methylophilic actinomycetes No. 155 produces an aminoglycoside antibiotics (AG)-resistant inhibitor. We have previously reported that the inhibitor shows strong inhibition to sisomicin-resistant strain. In order to understand the functions of inhibitor and sisomicin-resistance, characterizations and purification of inhibitor were investigated. Strain No. 155 was tentatively identified as *Nocardiothrips* sp. based on morphological and some physiological characteristics. In the antimicrobial activity test, the addition of inhibitor to sisomicin showed a reduction effect of MIC on the test strains such as Gram(+), Gram(-) bacteria and yeasts. The combination of the inhibitor and various antibiotics revealed synergistic against *E. coli* K-12 and *B. subtilis* PCI 219. The induced intracellular proteins from sisomicin-resistant strain exhibited the sisomicin inactivation by *in vitro* test. And the induced intracellular proteins were inactivated by addition of the inhibitor. The inhibitor compound was purified by anion exchange chromatography (Dowex-1) and HPLC using Asahipak ES-502C column. The purified inhibitor compound was detected in a single peak (above 98.5% purity) through the HPLC analysis.

Key Words: aminoglycoside antibiotics, sisomicin, methylophilic actinomycetes, sisomicin-resistant inhibitor

Penicillin 발견 이후, β -lactam계 항생물질을 비롯하여 aminoglycoside (AG)계 등 수많은 항생물질의 개발과 실용화는 현대 의학 및 건강향상에 크게 기여해 왔으며, 1970년대까지도 수많은 항생물질의 사용으로 병원세균에 의한 감염증의 문제가 해결되었다고 생각하게 되었다. 그러나 항생제의 사용에 따라 주요한 병원균들이 항생제 내성을 가지게 되었으며, 새로운 감염 질병의 위협과 함께 감염 질병에 약한 고령인구와 어린이의 증가, AIDS와 암, 장기이식 등으로 면역력이 저하된 환자가 증가하고 있어 이러한 문제는 더욱 심각해지고 있다. 따라서, 이러한 항생제 내성균의 출현으로 인하여 새로운 항생제의 개발을 비롯하여 내성기구 해석등의 수많은 연구가 수행되어 왔다. 그 예로 β -lactam계 항생제의 경우, 내성균의 대다수가 β -lactamase를 생산하며 [8, 10] 이에 대한 대처수단으로서 불활성화되지 않는 새로운 항생물질이 요구되어 methicillin, oxacillin, cephamycin 등의 다양하고 광범위한 반합성 항생제가 개발되었다. 그러나, 최근 이들 항생제에 대해서도 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) [27]를 비롯한 내성균의 출현으로 내성균의 문제가 심각히 대두되고 있다 [19].

이들 내성균과 관련하여, β -lactamase의 활성을 직접 저해할 수 있는 β -lactamase inhibitor의 연구가 Hata 등 [18]의 연구를 시작으로 활발히 수행되어 왔다. 그 예로서 새로운 β -lactam 구조를 가진 clavulanic acid [6], carbapenem 계열의 thienamycin, oliv-anic acid [21], nocardicin [2], boronic acid [11] 등 다수가 보고되고 있다. 1985년 이후 이들 저해제의 임상적 응용이 주목을 받기 시작하여 augmentin (clavulanic acid와 amoxi-cillin의 혼합), unasin (sulbactam과 ampicillin의 혼합), tim-entin (clavulanic acid와 icarcillin의 혼합), borobactam과 ampicillin의 혼합 등 [1, 9, 22, 30]의 사용효과가 입증되었으며, 최근 이들 inhibitor의 혼합제인 augmentin에 있어서도 내성을 나타내는 β -lactamase (SHV-10)가 *E. coli* CL55주에서 분리되어 [14] 지속적인 연구가 수행되고 있다. 그 외 vancomycin 내성균의 출현에 따른 내성 유전자의 분리 [25, 26], 임상분리주인 *Streptococcus pneumoniae*로부터 sulfonamide 내성기구에 관한 연구 [23] 등 다양한 항생물질 내성균에 대한 연구가 수행되고 있다.

본 연구와 관련한 AG계 항생물질의 경우 작용기구로서 세포내에서 30S ribosome subunit에 강하게 결합하여 protein 합성을 저해하는 기능을 가지며 주로 호기성, 통성 혐기성 Gram(-)세균과 일부 Gram(+)세균에 유효하다. AG 내성균의 출현과 함께 내성균의 내성기구가 연구되기 시작하여 plasmid

*Corresponding author

Tel. 82-53-580-5284; FAX. 82-53-580-5164

E-mail: hskim@kmucc.keimyung.ac.kr

유래의 aminoglycoside 수식효소임을 발견한 이후[3] 내성 기구에 대한 수많은 연구가 수행되어 있다. 그 예로 plasmid 유래의 수식효소로서 phosphotransferase(APH), acetyltransferase(AAC), nucleotidyltransferase(adenyltransferase, ANT) [12, 31]를 비롯하여 streptomycin, spectinomycin에 높은 내성을 보이는 ribosome protein(*rpsL*, *rpsD*, *rpsE*)[13, 20] 및 16S rRNA(*rrs*)[15]의 변화에 따른 ribosome의 내성화, LPS (lipopolysaccharide)의 변화에 따른 AG 수송 system의 변화 또는 결여에 의한 AG의 세포막 투과성 저하 등[29]이 알려져 있으며, 이중 AG 수식효소의 경우 AG 분자층의 작용부위, 기질특이성에 의해 세분화되어 약 21종류가 알려져 있다. 이들 내성균의 대처방안으로 AG 수식효소의 작용을 받지 않는 유도체가 합성되어 gentamicin, dibekacin, tobra-mycin, sisomicin, fortimicin 등이 사용되고 있으나, 최근 gentamicin, tobramycin 등에 대한 내성균의 출현이 증가하고 있으며[16], 따라서 AG계 항생제의 사용량 증가가 문제시되고 있다. 그러나, AG계 내성균의 대다수가 1종류 이상의 AG 수식효소를 소유하고 있다는 점으로 미루어 볼 때, AGs 내성균에 관한 저해제의 연구는 미흡한 실정이다. 최근 본 연구실에서는 AGs 내성균에 대한 대처방안의 일환으로 자연으로부터 streptomycin(Sm), sisomicin(So), gentamicin(Gm), kanamycin(Km) 등 내성균을 분리하여 이들 내성균에 대해 내성을 저해하는 inhibitor를 본 연구실에서 분리한 methanol자화 방선균을 이용하여 탐색하였다[24]. 그 결과 분리 방선균(No. 155)에서 특히 So내성균의 So내성을 저해하는 inhibitor의 생산이 확인되어 생산조건 및 특성으로 So내성저해제를 비롯하여 So감수성균에 So와 inhibitor의 첨가에 의해 So의 MIC(minimal inhibitory concentration)감소 효과가 입증되었다. 그러나, AG계 내성균의 대다수가 1가지 이상의 다양한 특이성의 AG 수식효소를 소유하고 있는 점에서 β -lactamase inhibitor와 달리 AG 내성균에 관한 inhibitor 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 So내성균의 내성기구 및 inhibitor의 내성저해기능 등을 비롯한 inhibitor의 특성 및 분리정제를 수행한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 공시균주는 김 등[24]이 분리한 methanol자화 방선균(No. 155)을 사용하였으며 So내성 저해물질의 생산을 위한 전배양배지로서 GS배지[bacto-soytone (Difco Co.) 1%, glucose 1%, NaCl 0.5%, CaCO₃ 0.1%, pH 7.0], 본배양배지로서는 IP배지[corn steep liquor(Sigma Co.) 1%, NaCl 0.5%, CaCO₃ 0.1%, sodium acetate 1%, pH 7.0]를 사용하였고, So내성균 생육배지로는 So를 LB액체배지(peptone 1.0%, sodium chloride 0.5%, yeast extract 0.5%, pH7.0)에

실험의 종류에 따라 적의 첨가하여 사용하였다. So내성 저해물질의 생산은 전배양배지 25 ml(100 ml Erlenmyer flask 사용)에 M배지[24]에서 생육시킨 slant로부터 2백금이 접종하여 5일간 배양한 후, 배양액 중에 생산된 inhibitor를 사용하였다.

분리균주의 동정

분리 방선균의 속의 동정을 위하여 방선균의 동정 실험법[17] 및 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[29]에 따라 배양학적 특성, 형태학적 특성, 생리적 특성을 조사하였다. 선별균주의 배양학적 특성은 ISP No. 1(tryptone-yeast agar), 2(yeast-malt extract agar), 4(inorganic salt-starch agar), 5(glycerol-asparagine agar), 7(tyrosine agar) 배지에 접종한 후 28 °C에서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면 색깔, 배지 색깔, 생육정도, 가용성색소 생성유무를 관찰하였다. 분리균주의 형태는 slide culture를 통하여 기균사가 충분히 형성된 후 광학 현미경으로 관찰하였으며, 정밀한 외형을 관찰하기 위해 진공건조후 gold coating하여 주사현미경인 SEM JSM 5410(GEOL Co.)으로 포자의 사슬 형태, 표면상태를 관찰하였다. 생리적 특성 중 당 이용성은 carbon utilization 배지에 arabinose, fructose, glucose, inositol, mannitol, raffinose, rhamnose, sucrose, xylose를 첨가하여 2주일간 배양하여 생육상태를 조사하였으며, gelatin액화력, milk응고력, 전분 분해력, cellulose분해력, 멜라닌 색소 생성유무는 방선균의 동정 실험법[19]에 따라 행하였다.

Inhibitor의 '활성 측정

Inhibitor의 활성은 김 등[24]의 방법에 따라 So내성균이 함유된 plate위에 So 20 μ l(1 mg/ml)와 공시균의 배양상등액 20 μ l를 첨가 및 미첨가(미첨가의 경우 멸균수를 첨가)한 paper disc(8 mm, Advantec Co.)를 얹고 1~2일간 배양한 다음, paper disc 주위에 clear zone 생성유무로서 확인하였다. 또한, 배양 상등액중 항균성 물질의 생성유무를 확인하기 위해 대조군으로서 배양 상등액 20 μ l를 단독으로 첨가하여 확인하였다.

Inhibitor 첨가에 따른 각종 항생제의 항균효과

Inhibitor 첨가에 따른 각종 항생제의 항균효과를 검토하기 위해 inhibitor 생산배지에서 5일간 배양한 배양상등액(inhibitor 용액) 20 μ l에 농도별로 제조한 각종 항생제(Sigma Co., U.S.A) 20 μ l를 첨가하여 항균활성을 검토하였다. 항균력의 효과는 항생제 감수성균인 *E. coli* K-12와 *B. subtilis* PCI 219를 시험균으로 사용하였으며 agar diffusion법을 사용하여 MIC로서 확인하였다.

Inhibitor 첨가에 따른 sisomicin의 항균효과

Inhibitor 첨가에 따른 각종 미생물의 항균효과를 검토하

기 위해 20 μ l의 inhibitor 용액(배양 상등액)에 So를 농도별로 첨가하여 항균활성을 검토하였다. 항균활성에 이용한 시험균주는 Gram(+)세균 4균주, Gram(-)세균 6균주 및 yeast 3균주를 대상으로 확인하였다.

Sisomicin 첨가농도에 따른 단백질 생산검토

So내성균의 균체내외의 단백질 생산량을 검토하기 위해 So를 각각 20, 40, 60, 80 μ g/ml씩 첨가한 LB배지에 So내성균을 접종(1×10^6 CFU/ml)한 다음, 120 rpm, 37 °C에서 7일간 배양하였다. 배양액을 4°C에서 원심분리(10,000 \times g, 5분)한 후 균체를 멸균수에 현탁하여 sonicator(Lab-line Instrument No. 9100)로 0°C에서 2분간 파쇄후 원심상등액(15,000 \times g, 20분)을 균체내 생산된 단백질 용액으로 사용하였다. 배양액 및 균체내 생산된 단백질은 80% 포화 ammonium sulfate(Sigma Co., U.S.A)로 단백질을 침전시킨후 침전된 조단백질은 멸균수로 투석하여 Bradford법[5]을 이용한 protein assay kit(Bio-Rad Co., U.S.A)로 단백질을 정량하여 So농도에 따른 단백질 생성량을 확인하였다.

Sisomicin 내성균이 생산한 단백질의 sisomicin내성효과

So내성균이 생산한 배양액 및 균체내 단백질의 So에 대한 내성효과를 검토하기 위하여 So 20 μ g 및 추출 단백질 20 μ g을 사용하여 각각 대조구(멸균수)와 So의 혼합, So와 추출 단백질의 혼합, 그리고 So, 추출 단백질, inhibitor 용액(배양 상등액)을 모두 혼합한 용액을 37°C에서 1-2시간 반응시킨후 각 반응액을 So 감수성균인 *E. coli* K-12와 *B. subtilis* PCI 219를 시험균으로 사용하여 So의 항균효과 및 inhibitor의 활성을 비교하였다.

Sisomicin 내성 inhibitor의 분리정제

Inhibitor의 정제는 공시균주를 inhibitor생산배지에서 5일간 배양한 배양액을 evaporator(EYELA Co., Japan)로 감압농축하여 평형화시킨 Dowex-1(Sigma Co.)을 이용한 음이온 교환수지(32 \times 300 mm)에 흡착시킨후 100% H₂O(HPLC Grade, Merck Co.)로 용출하였다. 용출된 각 fraction(5 ml/tube)은 UV spectrophotometer(Biochrome 4060, Pharmacia Biotech Co.)를 사용하여 scanning(wavelength: 200~800 nm)한 다음, 최대 흡수 파장이 유사한 fraction별로 모아서 evaporator로 감압농축 하였다. 이들 획분중 활성획분은 최종적으로 이온 교환 column인 Asahipak ES-502C column(Asahi Chem. Co., Japan)을 이용한 HPLC(Shimadzu LC-10AD, Shimadzu Co., Japan)에서 10 mM ammonium acetate 용액(0.5 ml/min)으로 용출하여 분리 및 정제를 수행하였다.

결과 및 고찰

공시균주의 동정

Table 1. Morphological characteristics of strain No. 155

Characteristics	Strain No. 155
Colony morphology on ISP 2 and 4	
Periphery	Limited, Spreading
Surface	Wrinkled, Flat
Aerial mycelium	Thick, Thick
Spore mass color	Gray
Spore chains on ISP 2	Rectiflexible
Color of colony on ISP 5	
Substrate mycelium	Gray, White
Soluble pigment	None

공시균주 No.155균의 형태적 및 생리적 특성을 조사한 결과 Table 1에서 보인 바와 같이 본 균주의 형태적 특징으로 ISP No. 2(Yeast-malt extract agar)배지에서 생육한 colony의 주변부는 국한성 및 중심부는 잔물결형태를 보였으며, No. 4(Inorganic salt-starch agar)배지에서는 확산 및 평탄한 형태를 보였다. 기균사의 착생상태는 아주 두텁게 형성되었으며 포자의 색은 회색을 나타내었다. ISP No. 5(Glycerol-asparagine agar)배지에서 생육한 기저균사는 흰색을 띄었으며, 가용성색소는 생성하지 않았다. 생리적 특징은 Table 2에서와 같이 melanin색소의 생성은 ISP No. 7(Tyrosine agar)배지에서만 적색색소를 생성하였고, 탄소원의 이용성은 fructose, glucose, inositol, xylose, sucrose는 양호하였으며, mannitol, raffinose, rhamnose도 다소 이용하였다. 생육온도는 ISP No. 2배지에 접종하여 조사한 결과 배양온도 10°C에서 37°C(11일 배양)까지 양호하게 생육하였으나 45°C에서는 생육하지 않았다. Cellulose분해력, gelatin액화력 및 우유응고력은 보이지 않았으나 전분분해력은 존재하였다. NaCl내성은 4, 7, 10, 13%까지 첨가시 4%에서 단 생육하였다. 형태적 특징으로는 No. 2배지에서 2주일간

Table 2. Physiological characteristics of the strain No. 155

Characteristics	Strain No. 155
Optimal growth temperature	10 °C ~ 37 °C
Liquefaction of gelatin	-
Coagulation of skim milk	-
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of cellulose	-
Tolerance of NaCl	below 4%
Melanin pigment on ISP 1 and 7	None, Red
Carbon utilization	
D-fructose	++
D-glucose	++
Inositol	++
D-mannitol	±
Raffinose	±
L-rhamnose	±
Sucrose	±
D-xylose	±

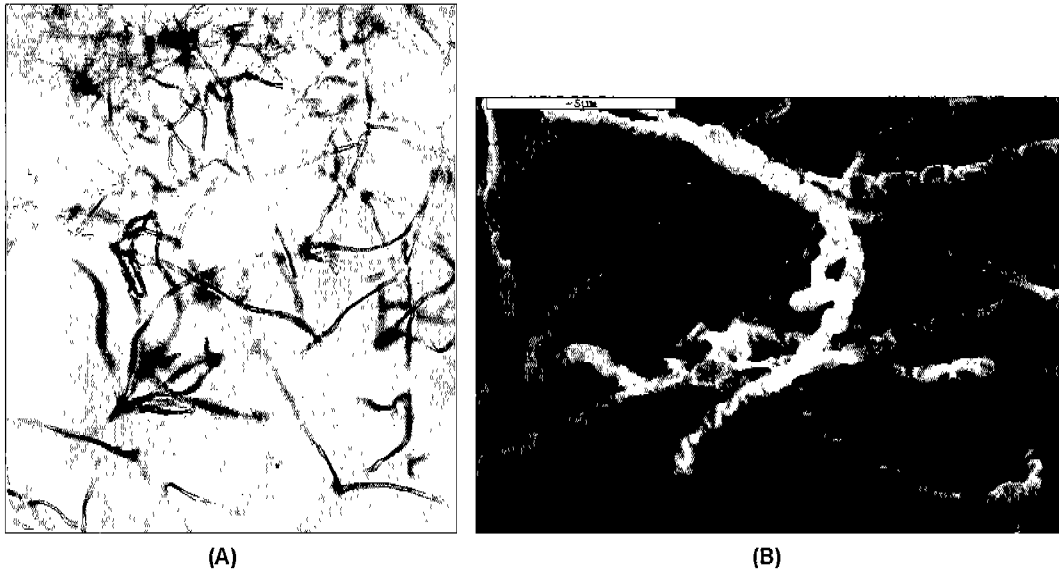


Fig. 1. Light micrograph (A, × 600) and scanning electron micrograph(B, × 7,500) of strain No. 155 on ISP medium No.2.

배양한 후 광학 현미경으로 검경한 결과(Fig. 1A), 기균사의 형태는 잘 발달되어 길며 적절히 분지되어 있는 rectiflexible 형을 나타내었다. 전자현미경으로 관찰한 결과 기균사는 rod type의 spore chain을 형성하였고 포자의 표면은 smooth type이었으며 길이는 약 0.9~1.0 μm이었다(Fig. 1B). 이들 결과로부터 본 분리균주는 *Nocardioopsis* sp.으로 판단되었으며, 형태적 특징 및 일부 생리적 특성[34]으로부터 *N. dassonvillei*와 유사하나 탄소원의 이용성 등[17]에서 다소 차이를 보임에 따라 상세한 동정이 필요하다고 사료된다.

Inhibitor 첨가에 따른 각종 항생제의 항균효과

공시균이 생산하는 inhibitor의 기능은 So내성균의 저해 기능 이외 감수성균에 의한 So의 사용량의 경감효과가 김등[24]에 의해 입증되었다. 따라서 inhibitor 첨가에 따른 각종 항생제의 항균효과를 검토하기 위해 20 μl의 inhibitor 용액에 각종 항생제를 농도별로 첨가하여 항균력을 검토하였다. Inhibitor의 첨가에 의한 항균력의 효과는 항생제 감수성균인 *E. coli* K-12와 *B. subtilis* PCI 219를 시험균으로 사용하여 agar diffusion법을 사용하여 MIC를 확인하였으며, 그 결과 각종 항생제에 대한 inhibitor의 효과는 항생제 단독 투여시 보다 inhibitor와 항생제의 혼합투여시 약 20~50% 정도의 MIC감소효과를 나타내었다(Table 3). 이 결과는 본 inhibitor의 기능이 시험균에 대한 항생물질의 세포내 수송에도 관여한다고 추정되며, 이러한 결과를 바탕으로 No. 155균이 생산한 inhibitor는 So를 비롯하여 다른 항생제와 혼합투여시 항생제 사용량을 경감시킬 수 있고, 항생제의 남용에 따른 내성균의 출현도 방지할 수 있다고 사료된다.

Inhibitor 첨가에 따른 sisomicin의 항균효과

Table 3. Susceptibility of *E. coli* K-12 and *B. subtilis* PCI 219 on various antibiotics with or without inhibitor

Antibiotics	Inhibitor addition (20 μl)			
	- ^a		+ ^b	
	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i> PCI 219	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i> PCI 219
	MIC (μg/ml)			
Ampicillin	0.2	0.1	0.4	0.2
Bacitracin	20.0	10.0	10.0	7.0
Chloramphenicol	0.2	0.1	0.2	0.1
Kanamycin	0.2	0.05	5.0	3.5
Mitomycin	0.2	0.1	0.2	0.1
Nalidixic acid	0.2	0.1	0.4	0.25
Streptomycin	0.4	0.1	3.0	2.5
Tetracycline	0.2	0.02	0.04	0.02
Vancomycin	0.04	0.01	0.01	0.005

-^a: Antibiotics only. +^b: Antibiotics and inhibitor combination.

Inhibitor 첨가에 따른 각종 병원균의 항균효과를 검토하기 위해 20 μl inhibitor 용액에 So를 농도별로 첨가하여 항균력을 검토하였다. 항균력의 효과는 Gram(+)세균 4균주, Gram(-)세균 6균주 및 yeast 3균주를 대상으로 확인하였다. Table 4에서 보인 바와 같이 Gram(+), Gram(-)균의 경우 So와 inhibitor 혼합 첨가시 So단독 첨가시 보다 약 1.16~3.0 배 정도의 MIC 감소효과를 나타내었다. 또한 *Cryptococcus neoformans*를 비롯한 효모류에도 inhibitor첨가시 항균효과를 보임에 따라 병원성 균의 감염에 의한 각종 질병에 소량의 항생제와 inhibitor를 혼합투여함으로써 광범위한 항균 효과가 예상되었다.

Sisomicin첨가에 의한 내성균의 단백질 생산
공시균이 생산하는 inhibitor의 AG(aminoglycoside)항생물

Table 4. Effect of antimicrobial activity by sisomicin under inhibitor addition

Strains	Inhibitor addition(20 µl)	
	- ^a	+ ^b
	Sisomicin MIC(µg/ml)	
Gram-positive bacteria		
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KCTC 1057	0.08	0.05
<i>Mycobacterium phlei</i> KCTC 1932	0.09	0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	0.03	0.01
<i>Serratia marcescens</i>	0.03	0.02
Gram-negative bacteria		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.07	0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.07	0.06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1930	0.04	0.02
<i>Salmonella typhi</i> KCTC 2424	0.05	0.02
<i>Salmonella paratyphi</i>	0.05	0.03
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.06	0.02
Yeasts		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	- ^c	0.01
<i>Hansenula anomala</i> B-7	-	0.02
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	0.02

-^a: Sisomicin only. +^b: Sisomicin and inhibitor combination. -^c: No inhibition.

질 내성 저해기구를 규명하기 위해, β-lactam계와 AG계 항생물질 내성균이 다양한 항생물질 수식효소를 생산하여 내성을 획득한다는 점에 착안하여 먼저 So내성균의 So에 대한 내성기구를 검토하였다. So내성균 또한 So불활성화 효소 생산에 의한 내성 획득이라 가정하여 So를 농도별로 첨가한 LB배지에 So내성균을 접종(1×10⁶ CFU/ml)한 다음, 120 rpm, 37 °C, 7일간 배양하여 단백질 생산량을 비교하였다. 내성균이 생성한 단백질은 80% ammonium sulfate로 배양액과 균체내(균체 파쇄)에 생성된 단백질을 농축후 Bradford 법으로 단백질을 정량하여 So첨가농도에 따른 단백질 생성량을 확인하였다. 그 결과, 배양액 중 생산된 단백질은 항생제 첨가농도에 상관없이 일정하였지만(결과 미계재), 동량의 배양액중 균체내의 단백질은 항생제 첨가 농도가 40 µg/ml까지 증가 되었으나, 그 이상의 농도에서는 내성균의 생육 저하로 인하여 생성 단백질양 또한 감소하였다(Fig. 2).

Sisomicin 내성균이 생산한 단백질의 sisomicin 내성기구 및 inhibitor의 기능

So내성균이 생산한 단백질이 So내성에 미치는 영향 및 inhibitor의 저해기구를 검토하였다. So가 농도별로 첨가된 각각의 배지에서 배양한 So내성균의 균체내 단백질(20 µg/20 µl)을 대상으로 So(20 µg/20 µl)와 혼합하여 So최종 농도가 10 µg/20 µl이 되게 한 후 37 °C에서 12시간 반응 시켜 So감수성균인 *E. coli* K-12와 *B. subtilis* PCI 219를 대상으로 So(10 µg/20 µl) 단독 투여한 대조구와 항균활성을 비교하였다. 그 결과 So와 추출 단백질의 혼합용액에서는 항균활성을 나타내지 않았거나 So단독 첨가시 보다 항균활성의

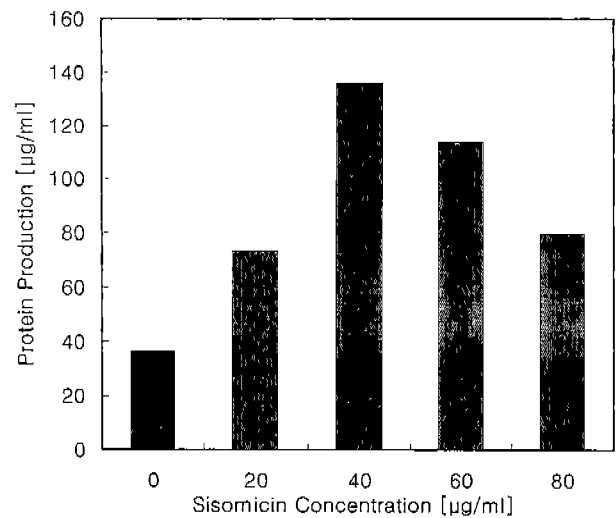


Fig. 2. Produced proteins pattern of sisomicin resistant strain by addition of sisomicin.

Table 5. Effect of Sisomicin with induced protein by addition of sisomicin

Sisomicin concentration in culture broth (µg/ml)	<i>E. coli</i> K-12				<i>B. subtilis</i> PCI 219			
	Proteins addition				Proteins addition			
	- ^a	+ ^b	-	+	- ^a	+ ^b	-	+
	Inhibitory zone (φ, mm)							
None	20	20	18	17	20	20	18	17
20	19	18	17	17	19	18	17	17
40	19	15	17	15	19	15	17	15
60	20	- ^c	18	-	20	-	18	-
80	19	-	20	-	19	-	20	-

-^a: Sisomicin 20 µl(1mg/ml) and H₂O (20µl). +^b: Sisomicin 20 µl (1 mg/ml) and protein 20 µl(1 mg/ml) combination. -^c: No inhibition.

저하를 나타내었다(Table 5). 특히 So미첨가 및 20 µg/ml첨가 배양한 균체내 단백질은 So의 항균효과가 유지되었으나, 단백질 생성량이 최대인 40 µg/ml의 So를 첨가한 배양균체에서 추출한 단백질은 So의 항균활성을 감소시켰으며 단백질 생산의 감소를 보인 60 µg/ml 및 80 µg/ml의 So첨가배양에 의해 추출한 단백질은 So의 항균효과를 완전히 불활성화시켰다. 또한 So(30 µg/20 µl), 추출단백질(30 µg/20 µl) 및 inhibitor(20 µl)의 혼합 첨가시에는 So와 추출단백질의 혼합 투여시(Table 5)와 비교하여 내성균에 대한 항균활성(내성 저해효과)을 나타내었으며(Table 6), So내성균의 배양시 So첨가량이 증가 할수록 생산된 단백질에 대한 inhibitor의 저해효과가 증대하였다. 이들 결과에서 So내성균의 내성기작은 So의 첨가시에 유도되는 So수식효소 또는 불활성화 효소를 균체내에서 생성하여 내성을 획득한다고 사료되며 So첨가 농도가 증가 할수록 So불활성화 효소의 생산이 증가한다고 추정되었다. 또한 김 등[24]이 보고한 inhibitor의 특성중 protease의 처리, 산, 알칼리 및 열처리시에도 저해

Table 6. Inhibition of sisomicin inactivation of induced proteins by addition of inhibitor

Sisomicin concentration in culture broth ($\mu\text{g/ml}$)	<i>E. coli</i> K-12		<i>B. subtilis</i> PCI 219	
	Inhibitor addition			
	- ^a	+ ^b	-	+
	Inhibitory zone(ϕ , mm)			
40	15	18	15	17
60	- ^c	14	-	15
80	-	12	-	14

-^a : Sisomicin 20 μl (1 mg/ml) and protein 20 μl (1mg/ml) combination. +^b : Sisomicin 20 ml (1.5 mg/ml), inhibitor 20 μl and protein 20 μl (1.5 mg/ml) combination. -^c : No inhibition

활성이 유지되어 protein성 물질이 아닌 점에서 inhibitor의 저해기구는 이들 So불활성화 효소 등에 inhibitor가 결합하여 내성기능을 저해한다고 사료되며, 계속적인 연구를 통하여 저해기구를 규명하고자 한다.

Inhibitor의 정제

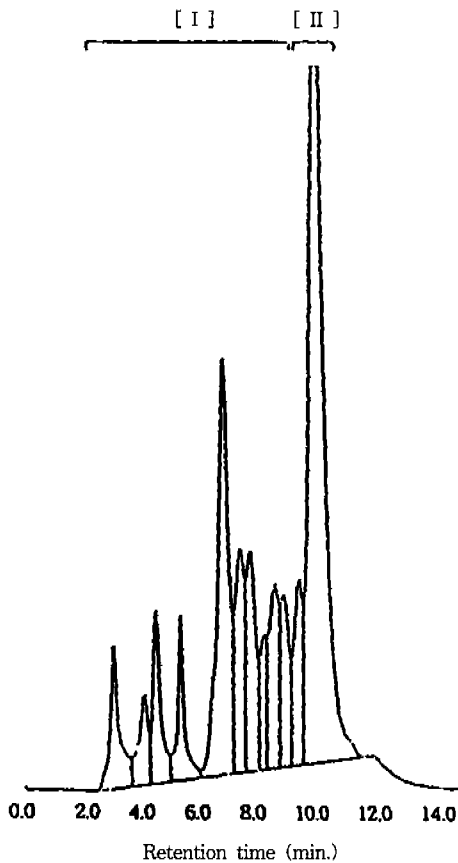


Fig. 3. HPLC chromatogram of inhibitor on ion exchange column.

The elution was done on an ion exchange column(Asahipak, ES-502C, 7.6 \times 100 mm) with 10mM ammonium acetate as solvent at flow rate of 0.5 ml/min and detected at 280 nm. [I] : Fraction I, [II] : Fraction II.

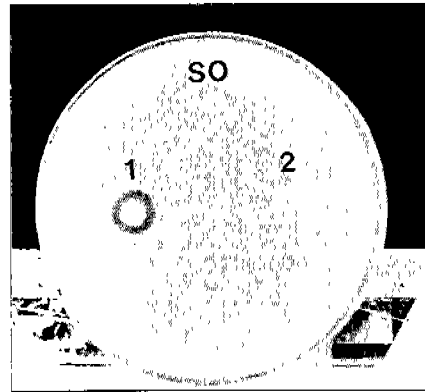


Fig. 4. Inhibition of sisomicin-resistant strain by addition of fraction [II].

Fraction [II] in Fig.3 was prepared through the five runs of HPLC. The 100 μl of concentrated fraction [II] was used for inhibitor assay. SO : Sisomicin (10 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) only.

1 : Sisomicin (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) and fraction [II] (20 μl) combination.

2 : Fraction [II] (20 μl)only

공시균이 생산하는 inhibitor의 정제는 inhibitor가 생산된 배양액을 evaporator(EYELA Co., Japan)로 감압농축하여 음이온 교환수지(Dowex-1, Sigma Co., U.S.A)에 흡착시켜 H₂O(HPLC Grade, Merck Co., Germany)로 용출하였다. 용출된 각 fraction은 spectrophotometer(Biochrome 4060, Pharmacia Biotech Co., Sweden)를 사용하여 scanning (Wavelength : 200 ~ 800 nm)한 다음, 최대 흡수 파장이 유사한 fraction별로 혼합하여 evaporator로 감압농축 하였다. 이들 분획중 활성 확분은 최종적으로 Asahipak ES-502C column(Asahi Chem. Co., Japan)을 이용한 HPLC(Shimadzu LC-10AD, Shimadzu Co., Japan)로서 분석 및 정제하였다. Fig. 3에서 보인 바와 같이 여러 개의 peak가 검출되었으며, 각 peak를 [I], [II]로 분획하여 5회 분취후 농축하여 So내성균에 대한 내성 저해효과를 확인한 결과, retention time이 10.326인 peak [II]가 inhibitor임이 확인 되었으며(Fig. 4), 따라서 peak [II]를 수회 분취하여 Shimadzu chromatopak을 이용한 분석 결과 정제도는 약 98.5% 이상이었다(Fig. 5). 정제된 inhibitor는 20%이상의 methanol을 비롯한 각종 유기 용매에 침전되는 점에서(결과 미계재) 수용성이 매우 강한 물질로 추정되며, 구조분석을 위하여 계속 연구를 수행하고 있다.

요 약

토양으로부터 분리된 methanol자화 방선균 No. 155균은 aminoglycoside(AG)계 항생물질 내성균을 저해하는 물질 (inhibitor)을 생산한다. 본 연구에서는 No. 155균의 속의 동정 및 sisomicin(So)내성 저해물질의 특성 및 정제를 수행 하였다. 공시균은 형태적 특징 및 일부 생리적 특성에서

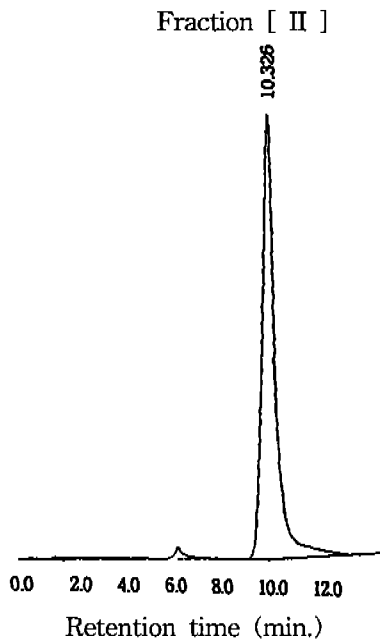


Fig. 5. HPLC chromatogram of purified inhibitor.

Active fraction II in Fig. 3 was injected. The elution was done on an ion exchange column (Asahipak, ES-502C, 7.6×100 mm) with the same conditions in Fig. 3.

Nocardiosis sp.으로 추정되었다. Inhibitor의 기능으로는 So 내성균의 저해효과 뿐만 아니라, Gram(+), Gram(-) 세균 및 효모류에서도 So단독 투여시 보다 inhibitor와 혼합 투여시 MIC 감소효과를 나타내었다. 또한 각종 항생제와 inhibitor의 혼합 투여시에도 항생제 단독 투여시보다 MIC의 감소를 보였다. So내성균의 내성기작을 검토한 결과, So의 침가능도에 따라(40 µg/ml까지) 균체내에서 생성된 단백질량이 증가하였으며, 이들 단백질이 So를 불활성화하여 So의 항균효과를 감소시키는 것으로 사료되었다. Inhibitor의 저해기구는 So불활성화 효소의 반응에 의해 내성을 저하시킨다고 추정되었다. Inhibitor의 정제는 음이온 교환수지(Dowex-1) 및 HPLC(Asahipak ES-502C column)를 통하여 retention time 10.326분의 peak인 inhibitor를 최종적으로 정제하였으며, 정제도는 약 98.5% 이상이었다.

REFERENCES

- Aldridge, K. E., C. V. Sanders, and R. L. Marier. 1986. Variation in the potentiation of β -lactam antibiotic activity by clavulanic acid and sulbactam against multiply antibiotic resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 463-469.
- Aoki, H., H. Sakai, M. Kohsaka, T. Konomi, J. Hosoda, Y. Kubochi, E. Iguchi, and H. Imanaka. 1976. Nocardicin A, a new monocyclic β -lactam antibiotic. *J. Antibiot.* 29: 492-500.
- Benveniste, R. and J. Davies. 1973. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 2276-2280.
- Bodnar, U. R., G. A. Noskin, T. Suriano, I. Cooper, B. E. Reisberg, and L. R. Peterson. 1996. Use of in-house studies of molecular epidemiology and full species identification for controlling spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates. *J. Clin. Microbio.* 34: 2129-2132.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, A. G., D. Butterworth, G. Hanscomb, J. D. Hood, C. Reading, and G. N. Rolinson. 1976. Naturally-occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* 29: 668-669.
- Bunny, K. L., R. H. Hall, and H. W. Stokes. 1995. New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 686-693.
- Bush, K. 1989. Classification of β -lactamase: Group 1, 2a, 2b, 2b'. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 264-270.
- Clarke, A. M. and S. J. V. Zemcov. 1984. Clavulanic acid in combination with ticarcillin: An *in vitro* comparison with other β -lactams. *J. Antimicrob. Chemther.* 13: 121-128.
- Cole, S. T. and M. H. Nicolas. 1986. β -Lactam resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Sci.* 11: 334-339.
- Crompton, L. E., B. K. Cuthbert, G. Lowe, and S. G. Waley. 1988. Beta-lactamase inhibitors-the inhibition of serine beta-lactamase by specific boronic acid. *Biochem. J.* 251: 453-459.
- Davis, J. and D. I. Smith. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annals Rev. Microbiol.* 32: 469-518.
- Douglass, J. and L. M. Steyn. 1993. A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis.* 167: 1505-1509.
- Efthimios, E. P., V. Miriagou, E. Tzelepi, M. Gazouli, and L. S. Tzouveleki. 1997. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 838-840.
- Finken, M., P. Kirschner, A. Wrede, and E. C. Botzger. 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* 9: 1239-1246.
- Gerding, D. N., T. A. Larson, R. A. Hughes, M. Weiler, C. Shanholtzer, and L. R. Peterson. 1991. Aminoglycoside resistance and aminoglycoside usage: Ten

- years of experience in one hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1284–1290.
17. Hamada, M. and M. Manabe. 1988. *Experimental Methods of Identification of Actinomycetes*, pp. 35–57. The Society for Actinomycetes Japan, Tokyo.(in japanese).
 18. Hata, T., S. Omura, Y. Iwai, H. Ohno, H. Takeshima, and N. Yamaguchi. 1972. Studies on penicillinase inhibitors produced by microorganism. *J. Antibiot.* **25**: 473–474.
 19. Hiramatsu, K. 1994. The present state and future of infection symptom in hospital from MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). *Bioscience & Biotechnology* **52**: 11–18. (in japanese)
 20. Honore, N. and S. T. Cole. 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 238–242.
 21. Hood, J. O., S. J. Box, and M. S. Verrall. 1979. Olivanic acids, a family of β -lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species II. Isolation and characterization of the olivanic acid MM4550, MM13902 and MM17880 from *Streptomyces olivaceus*. *J. Antibiot.* **32**: 295–304.
 22. Jacobs, M. R., S. C. Aranoff, S. Johanning, and S. Yamabe. 1986. Comparative activities of the β -lactamase inhibitors YTR830, clavulanate and sulbactam combined with extended spectrum penicillins against ticarcillin-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonads*. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**: 177–184.
 23. Jeffrey, P. M., A. M. Sefton, and L. M. Hall. 1997. Mechanism of sulfonamide resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2121–2126.
 24. Kim, H. S., J. O. Shin, and T. S. Yu. 1997. Production of aminoglycoside-resistant inhibitor from methylotrophic actinomycetes. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**: 96–102.
 25. Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**: 157–161.
 26. Martin, G. M., M. A. Drebot, and G. J. Tyrrell. 1997. Identification and characterization of IS1476, an insertion sequence-like element that disrupt van Y function in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1805–1807.
 27. Murakami, K. and A. Tomasz. 1989. Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **171**: 874–879.
 28. Nolte, F., K. E. Arnold, H. Sweat, E. F. Winton, and G. Funke. 1996. Vancomycin-resistant *Aureobacterium* species cellulitis and bacteremia in a patient with acute myelogenous leukemia. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1992 – 1994.
 29. Ohno, M. and S. Omura. 1987. *The Best Guidance of a Study of Antibiotics*, pp. 130–140. Yokyokagakudou-nin Co., Tokyo.(in japanese)
 30. Sanders, C. C., J. P. Iaconis, G. P. Bodey, and G. Samonis. 1988. Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*: Role of PSE-1 β -lactamase and high levels of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1365–1369.
 31. Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**: 138–163.
 32. Thomson, K. S., D. A. Weber, C. C. Sanders, and W. E. Sanders. 1990. β -Lactamase production in members of the family *Enterobacteriaceae* and resistance to β -lactam-enzyme inhibitor combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 622–627.
 33. Weinstein, J. W., S. Tallapragada, P. Farrel, and L. M. Dembry. 1996. Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant *Enterococci*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 210–212.
 34. Williams, S. T., M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 4, pp. 2451–2498. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

(Received April 14, 1999)