

토양으로부터 Myxobacteria의 분리 및 16S rDNA RFLP 분석

김수광* · 최병현 · 김종균 · 이병규 · 강희일

유한양행 중앙연구소 바이오텍 연구실

토양 시료와 Coli-spot 한천평판 배지를 이용하여 myxobacteria를 분리하였다. 용균 현상이 관찰되는 Coli-spot 한천평판에서 myxobacteria의 swarm 및 자실체 형성 여부를 확인하고, 확인된 자실체를 분리하여 VY/2 한천평판 배지에서 순수배양을 실시하였다. 분리 균주의 동정을 위하여 myxobacteria 표준 균주 및 토양에서 분리한 균주들의 16S 리보솜 DNA를 중합효소 연쇄 반응을 통해 증폭시킨 다음, 제한효소(*Hae*III, *Eco*RI 및 *Eco*RV)로 절단하여 RFLP 양상을 비교하였다. 그 결과, 토양에서 분리한 균주들이 Family I, II, III의 myxobacteria에 속하는 것을 확인하였다.

Key words □ 16S rDNA, fruiting body, myxobacteria, RFLP, swarm

Myxobacteria는 그람음성 세균으로서 간균 형태이며 단세포로 존재하는 토양 미생물이다. 고체배지 상에서 활주운동(gliding or creeping)을 하여 부정형의 swarm을 형성하고, 세포의 효소를 분비하여 세균이나 효모 등 다른 토양 미생물을 분해하여 이들의 구성성분을 영양원으로 이용하는 특징이 있다.

Myxobacteria는 토양 미생물로서 지금까지 알려지지 않은 새로운 구조의 생리활성물질을 생성하는 것으로 보고되고 있으며, 신규 생리활성물질 탐색을 위한 유용한 연구대상으로 다양하게 이용되고 있다(4). 현재까지 myxobacteria의 대사산물에서 항진균, 항세균, 항암 등의 활성을 갖는 80여개의 서로 다른 기본구조를 가진 물질과 450여개의 유도체들이 확인되었으며, 이들 대부분이 신규물질이고, 작용 기작 또한 다른 미생물에서 발견된 것과는 다른 것으로 알려져 있다(3). Hofle 등은 분리된 2,150개의 용균성 myxobacteria 중 55%가, 720개의 섬유소 분해성 myxobacteria 중 95% 이상이 생리활성물질을 생산한다고 보고하였다(1).

Myxobacteria는 *Proteobacteria* 문(Phylum)의 *Delta-proteobacteria* 과(Class) IV, *Myxococcales* 목(Order) VII 으로 분류가 되며, myxospore의 구조적인 차이와 여러 배양상의 특징에 따라 Family(과) I (*Myxococcaceae*-Genus(속) *Myxococcus*), Family II (*Archangiaceae*-Genus *Archangium*), Family III (*Cystobacteraceae*-Genus *Cystobacter*, Genus *Melittangium*, Genus *Stigmatella*), Family IV (*Polyangiaceae*-Genus *Polyangium*, Genus *Nannocystis*, Genus *Chondromyces*)의 4그룹으로 구분된다(2). 세포 형태와 수산기를 가진 지방산 조성에 있어서 Family I, II, III는 서로 비슷하며, Family IV와는 구분된다고 알려져 있다.

Myxobacteria를 분리하는 방법은 크게 세균 분해능과 섬유소 분해능을 이용하는 방법이 사용된다. 용균성 myxobacteria의 분

리는 myxobacteria가 토양 등에 서식하면서 다른 토양 미생물을 영양원으로 하는 특성을 이용하는 것으로, 단일 영양원으로써 대장균 또는 효모 등의 미생물을 먹이균으로 공급한 배지에서 myxobacteria를 분리하는 방법이다. 섬유소 분해성 myxobacteria의 분리는 영양분이 없는 무기염류 배지에 섬유소 분말이나 종이 여과지를 첨가하여 섬유소 이용성을 보이는 균을 분리하는 방법이 이용된다. 통상적인 myxobacteria의 분리는 자실체, swarm의 형성 유무 등을 기준으로 하여 이루어지고 있는데, 이 방법은 많은 시간과 노력이 요구된다는 단점이 있다.

최근에는 유전자 감식(DNA finger printing)을 이용한 방법으로, RFLP (restriction fragment length polymorphism, 제한효소 절편 길이 다형성)를 이용한 균주 동정 방법이 이용되고 있다. RFLP는 제한효소로 DNA가 절단되었을 때 생기는 절편들의 길이가 생물 종마다 다르게 나타나는 DNA의 다형성을 의미하며 인간의 유전자 분석 뿐만 아니라 균의 분류, 확인에도 사용되고 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 대장균을 먹이균으로 사용한 선택적 분리법으로 용균성 myxobacteria를 분리하고, 여러 myxobacteria의 16S 리보솜 DNA에 공통적으로 존재하는 염기서열을 조사하여 프라이머를 합성한 후 중합효소 연쇄 반응을 실시하였다. 증폭된 유전자를 제한효소인 *Hae*III, *Eco*RI, *Eco*RV로 절단한 후 RFLP 양상을 비교하여 분리한 균주의 myxobacteria Family를 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지 제조

Myxobacteria의 표준 균주로서 *Myxococcus xanthus* ATCC 25232, *Myxococcus fulvus* ATCC 25199, *Cystobacter fuscus* ATCC 25194, *Melittangium lichenicola* ATCC 25944, *Stigmatella*

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-452-4111 (내329) Fax: 031-456-4418
E-mail: blueeye01@yuhan.co.kr

aurentiaca ATCC 25190, *Polyangium cellululosum* ATCC 25531, *Archangium gephyra* DSM 2261, *Chondromyces apiculatus* DSM 436, *Nannocystis exedens* DSM 71의 9종 균주를 American Type Culture Collection (ATCC) 및 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)에서 구입하여 사용하였다. 용균성 myxobacteria의 분리를 위한 먹이균으로 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. RFLP 분석에 사용한 시약은 Takara, Roche 사에서, 배지 제조를 위한 시약은 Difco, Sigma 사에서 구입하였다. 먹이균 배양배지는 Luria-Bertani (LB) 배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%)을 사용하였으며, *Myxobacteria* 분리용 배지로는 Coli-spot 한천 배지(CaCl₂ · 2H₂O 0.1%, agar 1.5%, cyclohexamide(50 mg/L))를 사용하였다. 배지 제조 후 먹이균을 멸균된 생리 식염수에 현탁하여 이를 50~100 μ l씩 배지 표면에 점적하여 건조시킨 다음 myxobacteria 분리에 사용하였다. Myxobacteria의 순수분리, 계대용 배지로는 VY/2 agar (baker's yeast 0.5%, CaCl₂ · 2H₂O 0.1%, agar 1.5%, cyanocobalamin 0.5 mg/L)를 사용하였으며, 표준균주 및 토양 분리균주는 30°C에서 배양하였다.

토양시료

토양 미생물의 분리를 위하여 국내(강원, 충남, 경기 일대) 및 국외(영국, 미국) 일대의 토양에서 시료를 채취하였다. 채취한 토양은 상온에서 24~48시간 동안 건조한 다음, myxobacteria 분리에 사용하였다.

Myxobacteria의 분리

용균성 myxobacteria를 분리하기 위해, 멸균된 생리식염수 5 ml에 토양시료 0.5 g을 현탁한 후 이를 멸균된 생리식염수로 100~1,000배 희석하였다. Coli-spot 배지의 먹이균 위에 토양 희석액을 5~10 μ l씩 점적한 후 30°C 항온 배양기에 배양하면서 먹이균의 분해환이 생성되는지의 여부를 확인하고, myxobacteria의 swarm과 자실체의 출현 여부를 관찰하였다. 먹이균이 분해되어 형성된 반투명한 용균 부위에서 형성된 swarm과 자실체는 멸균된 바늘을 이용하여 일부를 채취한 다음 VY/2 고체배지에 접종하고 30°C에서 5일 이상 배양하였다. VY/2 고체배지 상에서 투명환을 형성한 균들을 대상으로 광학현미경을 통해 영양세포와 포자의 형태를 관찰하였다.

Genomic DNA 추출

Tris-EDTA 완충용액 0.4 ml이 들어있는 1.5 ml 원심분리 튜브에 균체를 현탁하고, 라이소자임(1 mg/ml) 5 μ l와 프로테아제 케이(K)(20 mg/ml) 2 μ l를 첨가하여 10분간 반응 후, 10% SDS 30 μ l를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응하였다. 5 M NaCl 100 μ l와 CTAB/NaCl 80 μ l를 첨가한 후 65°C에서 10분간 반응하고 PCI(페놀 : 클로로포름 : 이소아밀알콜=25 : 24 : 1) 용액을 500 μ l 첨가한 후 교반하였다. 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 상등액에 동량의 이소프로필알콜을 첨가하여 실온에서 20분 이상 방치하고 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 70%

에탄올로 세척한 다음 DNA 펠릿을 증류수로 용해시켰다.

16S 리보솜 DNA의 중합효소 연쇄 반응 및 RFLP 분석

16S 리보솜 DNA의 중합효소 연쇄 반응을 위한 프라이머는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등재된 myxobacteria의 16S 리보솜 DNA상의 상동성 검색 및 프라이머 디자인을 통해 forward (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGG-3'), reverse (5'-ATCCAGCCGCAGTTCCCTA-3') 프라이머를 고안하였다. Myxobacteria의 16S 리보솜 DNA 서열의 제한효소 작용 부위를 검색하여 RFLP 분석을 위한 제한효소로서 *Hae*III, *Eco*RI 및 *Eco*RV를 선정하였다. 중합효소 연쇄 반응은 DNA 증폭기(Techgene)를 사용하여 pre-denaturation 94°C 5분, denaturation 94°C 1분, annealing 56°C 1분, extension 72°C 2분을 1 사이클로 하여 30 사이클을 실시하였다. 중합효소 연쇄 반응 후 전기영동하여 1.5 kb의 DNA 크기를 확인하였으며, *Hae*III, *Eco*RI 및 *Eco*RV (Roche)로, 37°C에서 1시간 동안 제한효소로 처리하였다. 낮은 농도의 DNA 검출을 위해 PAGE(폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 12% 겔) 분리 후 실버 염색을 하여 DNA 단편을 확인한 다음, Image master2D Elite 프로그램(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 스캔한 겔에서의 DNA 분자량을 비교하였다.

결 과

Myxobacteria의 분리

용균성 myxobacteria는 swarm과 자실체 형성을 선별기준으로 하여 분리하였다. 표준 균주들을 VY/2 고체배지에 배양한 결과, 모든 표준 균주가 대장균에 대해 분해환을 형성하는 것으로 확인되었는데, 이는 용균성 myxobacteria가 다른 미생물을 분해하여 영양원으로 하는 특성과 연관이 있는 것으로 추정되었다. 표

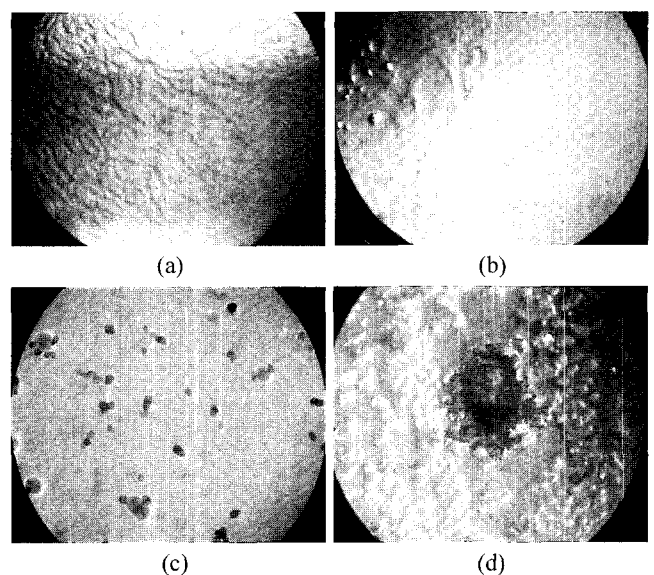


Fig. 1. Swarm (a-b) and fruiting bodies (c-d) of isolated myxobacteria. (a) YH20-40, (b) YH23-22, (c) YH20-40, (d) YH23-22.

준 균주 및 토양 분리균들을 VY/2 고체배지에서 배양 후, swarm 및 자실체를 관찰하고(Fig. 1), 광학현미경(x1,000)으로 관찰하여 간균 형태의 균주만 선별하였다.

Myxobacteria의 swarm은 방사상으로 배지 전체로 퍼지는 형태를 나타내었고, 영양세포 층이 겹쳐져 반복적인 불결모양의 ripple을 생성하는 균도 있었다. 또한 swarm은 연노란색에서부터 오렌지, 갈색 등의 붉은색 계열 또는 갈색 계열의 색을 나타내었는데, 이는 myxobacteria가 생성하는 카로티노이드 색소에 의한 것으로 추정되었다. Swarm 형성 후 일정기간이 경과하면 swarm의 옆부분이나 swarm 전체에서 자실체 형성이 관찰되었다. 자실체의 형태는 돌기를 형성하거나 둥근 형태, 둥근 형태가 연속적으로 연결 또는 뭉쳐진 형태 등이었으며, 이 자실체의 일부를 취하여 VY/2 한천배지에서 순차적으로 계대배양하여 myxobacteria

로 추정되는 균주를 순수분리한 후 16S 리보솜 DNA의 RFLP 분석을 실시하였다.

16S 리보솜 DNA의 중합효소 연쇄 반응

표준 균주 및 음성 대조균으로서, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 등을 주형으로 하여 forward 프라이머와 reverse 프라이머를 이용해 16S 리보솜 DNA의 중합효소 연쇄 반응을 실시한 결과, *Proteus vulgaris*, *Micromonospora purpurea*, *Cytophaga arvensicola*, *Cytophaga marinoflava*, *Capnocytophaga ochracea*에서는 16S 리보솜 DNA의 중합효소 연쇄 반응이 일어나지 않았다(Fig. 2).

표준 균주의 RFLP 분석

표준 균주의 RFLP 분석 결과 *Polyangium cellulorum*, *Chondromyces apiculatus*, *Nannocystis exedens* (Family IV)를 제외하고 409-

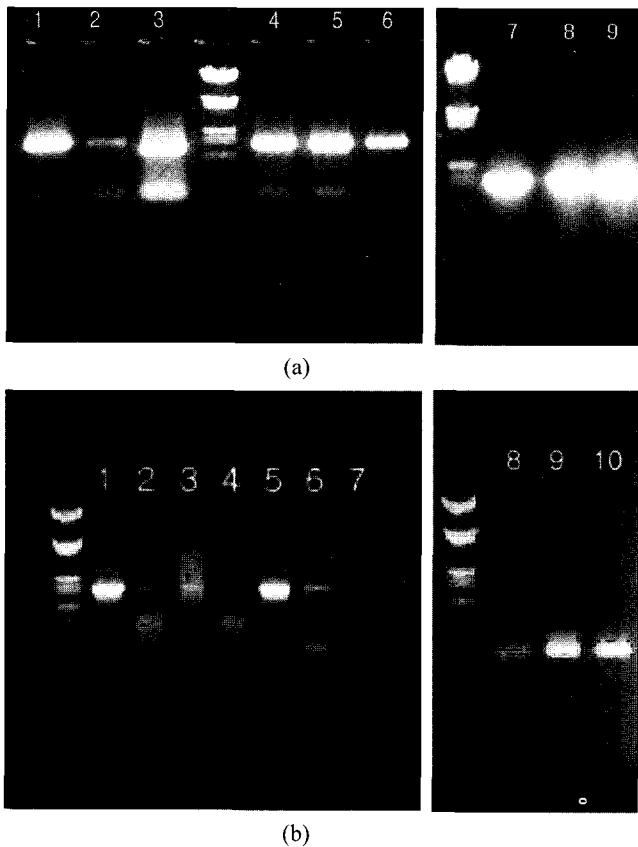


Fig. 2. Photographs of 16S rDNA PCR products. (a) 16S rDNA PCR products of myxobacteria type strains. 1: *Myxococcus xanthus* ATCC25232, 2: *Melittangium lichenicola* ATCC 25944, 3: *Cystobacter fuscus* ATCC 25194, 4: *Myxococcus fulvus* ATCC 25199, 5: *Stigmatella aurentiaca* ATCC 25190, 6: *Polyangium cellulorum* ATCC 25531, 7: *Archangium gephyra* DSM 2261, 8: *Chondromyces apiculatus* DSM 436, 9: *Nannocystis exedens* DSM 71. (b) 16S rDNA PCR products of negative control strains. 1: *Escherichia coli* XL1-blue, 2: *Serratia marcescens* ATCC 25419, 3: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, 4: *Proteus vulgaris* ATCC 6059, 5: *Providencia stuartii* IFO 12930, 6: *Bacillus subtilis* ATCC 11774, 7: *Micromonospora purpurea* ATCC15835, 8: *Capnocytophaga ochracea* KCTC 3693, 9: *Cytophaga arvensicola* KCTC 2943, 10: *Cytophaga marinoflava* KCTC 2915.

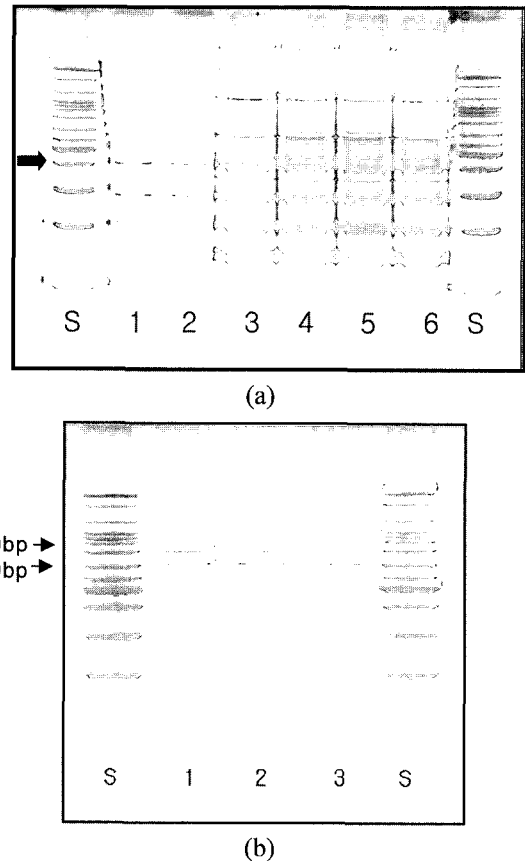


Fig. 3. RFLP pattern analysis of myxobacteria type strains. Arrow indicates 420 bp size. (a) RFLP analysis of Family I, II, III using *Hae*III and *Eco*RI. S: size marker (100 bp DNA ladder), 1: *Myxococcus xanthus* ATCC 25232, 2: *Melittangium lichenicola* ATCC 25944, 3: *Cystobacter fuscus* ATCC 25194, 4: *Myxococcus fulvus* ATCC 25199, 5: *Stigmatella Aurentiaca* ATCC 25190, 6: *Archangium gephyra* DSM 2261. (b) RFLP analysis of Family IV using *Eco*RV. S: size marker (100 bp DNA ladder), 1: *Polyangium cellulorum* ATCC 25531, 2: *Chondromyces apiculatus* DSM 436, 3: *Nannocystis exedens* DSM 71.

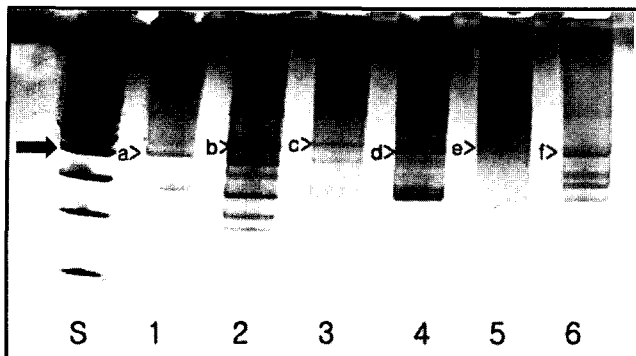


Fig. 4. RFLP pattern analysis of negative control strains. Arrow indicates 420 bp size. S: size marker (100 bp DNA ladder), 1: *Myxococcus xanthus* ATCC 25232 (a>: 419 bp), 2: *Escherichia coli* XL1-blue (b>: 479bp), 3: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (c>: 500 bp), 4: *Providencia stuartii* IFO 12930 (d>: 473 bp), 5: *Serratia marcescens* ATCC 25419 (e>: 482 bp), 6: *Bacillus subtilis* ATCC 11774 (f>: 480 bp).

429 bp 의 크기에서 DNA 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Family I, II, III 내의 다른 종에 대해서도 제한효소 인지부위 검색을 통해 분석한 결과, 모두 이와 유사한 크기의 DNA 단편을 확인할 수 있었다. Family IV의 RFLP 분석에 대해서는 *Polyangium cellulosum*, *Chondromyces apiculatus*, *Nannocystis exedens*에 대해 *EcoRV*를 이용하여 RFLP 분석을 실시하여 690 bp와 870 bp의 DNA 단편들을 관찰할 수 있었다.

대조 균주의 RFLP 분석

*HaeIII/EcoRI*의 조합에 의한 RFLP 분석을 myxobacteria에 적용할 수 있는지 알아보기 위해 대조 균주를 선정하였다. 대조 균주는 세균 분류학적인 고찰에 근거하여 myxobacteria와 유연관계가 가까운 *Proteobacteria* (gamma-proteobacteria) 및 유연관계가 먼 균주들을 선별하였다. 선별한 균주들에 대해서는 ‘Genamics Expression’ 프로그램(<http://genamics.com>)에 의한 분석을 통해 제한효소 인지부위 검색을 실시하였는데, 표준 균주에서 나타난 420 bp 정도의 DNA 단편은 확인할 수 없었다. 선별한 대조 균주에서 16S 리보솜 DNA를 증폭하여, PAGE를 통한 RFLP 분석을 실시한 결과에서도 420 bp 부근의 DNA 단편은 확인되지 않았다(Fig. 4). 표준 균주 및 대조 균주의 16S 리보솜 DNA RFLP 분석을 통해 myxobacteria의 확인이 가능한 것으로 알 수 있었다.

토양 분리균주의 RFLP 분석

토양으로부터 분리한 균들 중 swarm 및 자실체를 형성하는 18 균주를 대상으로 *HaeIII*와 *EcoRI*에 의한 RFLP 분석을 실시하였다(Fig. 5).

전기영동 후 RFLP 패턴을 표준 균주의 패턴과 비교해 본 결과, 18개 균주 모두 420 bp 크기 부근의 DNA 단편을 확인할 수 있었다. 토양에서 분리한 18개 균주는 모두 자실체를 형성하고

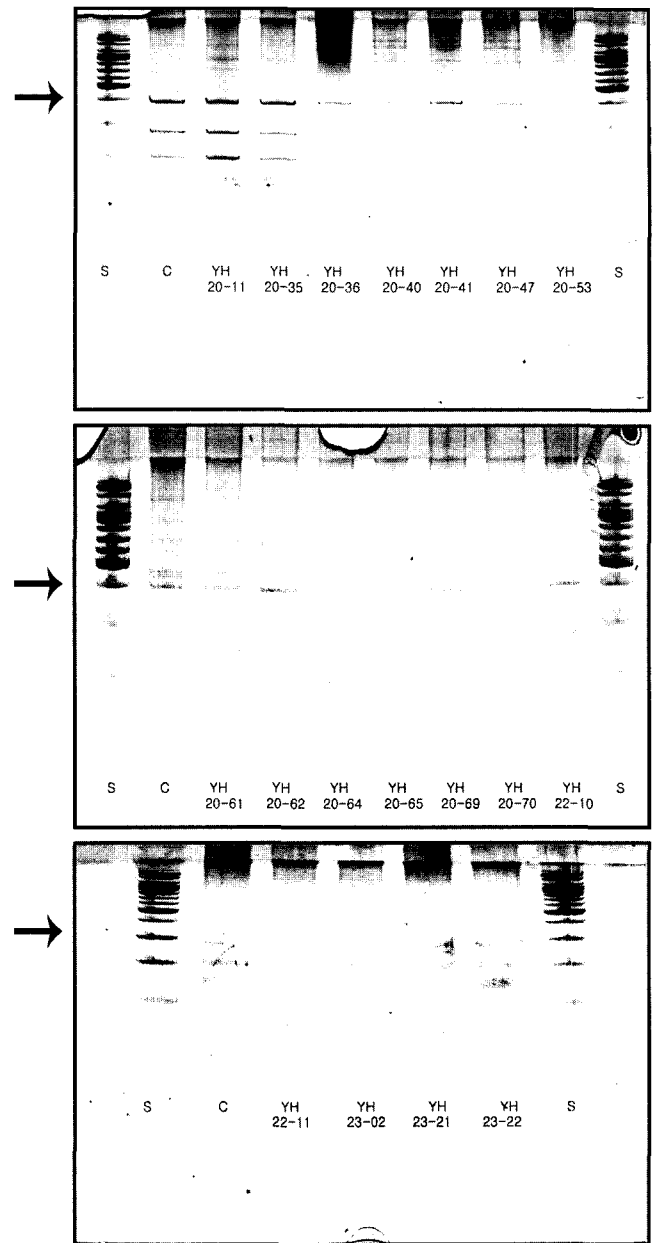


Fig. 5. RFLP pattern analysis of soil isolates. Arrow indicates 420 bp size. S: Size marker (100 bp DNA ladder), C: *Myxococcus xanthus* ATCC 25232, YH No: soil isolates.

표준 균주와 동일한 형태의 RFLP 패턴을 가지고 있는 것이 확인되어 이들 분리균들은 모두 myxobacteria family I, II, III에 속하는 것으로 사료되었다.

고 찰

토양에서 분리한 용균성 myxobacteria와 표준 균주들이 VY/2 배지에서 성장할 수 있음을 확인하고, 또한 VY/2 배지에서 자실체를 형성함을 관찰하였다. 따라서 myxobacteria의 분리용 배지

와 계대용 배지를 VY/2 배지로 사용할 수 있음이 확인됨으로써 용균성 myxobacteria의 분리와 계대배양의 편의성을 확보하게 되었다.

신규 생리활성 물질을 도출할 수 있는 대상 균주로서, 토양에 존재하는 다양한 종류의 myxobacteria 균주를 분리하고, 분리균이 myxobacteria 인지 여부를 확인하기 위하여 RFLP 분석을 실시하였다. Myxobacteria의 확인을 위해 16S 리보솜 DNA의 제한 효소 인지부위 검색 및 RFLP 분석을 통해 myxobacteria를 구분할 수 있음을 확인하였다. Family I, II, III에 속하는 myxobacteria들은 세균 분해능을 가지고 있으므로, 1차 스크리닝 과정에서 세균 분해능과 자실체 형성을 관찰함으로써 1차 분리를 할 수 있고, 이들 균주들에 대해 *HaeIII/EcoRI*의 제한 효소를 이용한 RFLP 패턴 분석을 함으로써 myxobacteria임을 확인 할 수 있었다. Family IV의 경우 Genus *Polyangium*, Genus *Nannocystis*, Genus *Chondromyces*는 *EcoRV*를 처리함으로써 동일한 패턴으로 나타남을 제한효소 인지부위 검색 및 RFLP 분석을 통해 확인 할 수 있었다. 그러나, Genus *Polyangium*의 경우 섬유소 분해능을 가지고 있으므로 1차 스크리닝할 때, 섬유소 분해능과 RFLP 분석을 통해 확인 할 수 있지만, Genus *Nannocystis*와 Genus *Chondromyces*의 경우 섬유소 분해능은 없고 세균 분해능을 가지고 있기에 1차 스크리닝할 때, 세균 분해능과 자실체를 형성하는 분리균에 대해 *HaeIII/EcoRI*으로 myxobacteria 여부가 확인이 안 되는 균주들에 대해서는 *EcoRV*를 사용한 RFLP 분석이 필요함

을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 IMT 2000 출연금 기술개발사업의 지원에 의하여 수행된 연구 결과의 일부로서, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Hofle, G. and H. Reichenbach. 1990. Biologically active substances from micro-organisms; an interdisciplinary research project at the GBF. *Sci. Ann. Rep.*, Gesellschaft fur Biotechnolog. Forschung, Braunschweig. 5-22.
2. McCurdy, H.D. 1989. Order Myxococcales, p. 2139-2170. In J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt (ed.), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
3. Reinchenbach, H. and G. Hofle. 1993. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol. Adv.* 11, 219-277.
4. Reinchenbach, H. and M. Dworkin. 1992. The myxobacteria, p. 3416-3487. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.

(Received April 1, 2003/Accepted June 19, 2003)

ABSTRACT: Isolation of Myxobacteria from Soil and RFLP Analysis of 16S rDNA Fragments.

Soo-kwang Kim*, Byung-hyun Choi, Jong-gyun Kim, Byung-kyu Lee, Heui-il Kang
(Biotech Research Laboratory, Yuhan Research Institute, Gunpo, 435-715, Korea)

In an attempt to isolate myxobacteria from soil samples, we isolated swarm and fruiting body forming bacteria that have bacteriolytic activity on Coli-spot agar plate. For the classification of myxobacteria, 16S rDNA RFLP patterns were analyzed. Amplified 16S rDNAs of myxobacteria type strains (Family I, II, III and IV), negative control strains and soil-isolates were restricted with *HaeIII*, *EcoRI* and *EcoRV*, respectively. We found that the soil-isolates belongs to myxobacteria Family I, II, III.