

Streptomyces 속 균주들의 생장에 따른 외피 항원성 변화의 혈청학적 분석

김재현^{1*} · 조성기²

¹단국대학교 미생물학 전공 및 기초과학연구소, ²한국원자력연구원 방사선생명공학연구센터

Streptomyces 균주들의 진탕배양 시간에 따른 항원성 변화를 면역확산 침강법과 간접 ELISA법으로 측정하였다. 각 균주들에서 모두 색소 생산 시기에 나타난 새로운 침강선이 배양시간이 경과되면서 진행되는 양상을 보였다. *S. coelicolor*와 *S. griseus*의 항원성 변화는 상대적으로 약하게 나타난 반면 *S. lavendulae*와 *S. viridochromogenes*의 항원성 변화는 강하게 나타났다. 이 결과는 균주에 따라 정도의 차이는 있지만 *Streptomyces* 균체의 진탕배양에서의 생장이 균체의 외피 성분의 변화를 수반하며 이를 정량적으로 분석할 수 있음을 나타낸다.

Key words □ antigenicity, envelope antigen, growth phase, *Streptomyces*

*Streptomyces*는 토양 세균으로써 균사체 분화와 항생물질 생산은 세균 분화의 모델 시스템으로써 연구되어 왔다. 한천배지 표면에서 콜로니 형성 시 일어나는 형태적 분화는 기저균사체로부터 기중균사체가 발달되고 각각의 기중균사는 분절되어 포자 사슬로 분화된다(4). 기중균사체 발달은 항생물질 생산을 동반하기도 하는데 공통의 조절 유전자가 관련되어 있기 때문이다(16).

Streptomyces 생물학에서 항원-항체 반응은 주로 균주 분류에 이용할 목적으로 균주간의 유사도 분석에 이용되어져 왔다. 그 결과 혈청학적 유사도는 기존의 수리분류체계에서 얻어진 유사도와 대체로 일치하게 나타났다(6). 이들 실험에서는 기준 균주의 수용성 세포 추출액에 대한 항체를 얻고 시험 균주의 수용성 세포 추출액과 반응시켜 형성된 침강선 개수를 조사하여 침강선이 많을수록 유사성이 높은 것으로 판단하였다(12). 또는 간접 ELISA를 실시하여 얻은 정량적 항원-항체 반응 결과를 균주간 유사도 비교에 적용하였다(13).

우리 실험실에서는 *Streptomyces*의 비수용성 외피(세포막, 세포벽) 분획에 대한 항혈청을 사용하여 침강선 형성 정도와 ELISA를 수행한 결과 외피의 혈청학적 유사성은 분류학적 목적으로 사용하기에는 적절하지 않음을 밝혔다(5). 즉 분류학적으로 근접한 종들(*S. griseus*와 *S. coelicolor*) 사이의 반응성이 30% 정도이고 유연관계가 먼 균주들(*S. viridochromogenes*와 *S. lavendulae*) 사이에 더 높은, 50% 정도의 반응성을 나타내어 균집단의 분류학적 거리를 반영하지 못했다. 한편 Wipat 등은 *Streptomyces*의 포자표면항원의 특이성을 이용하면 토양으로부터 특정 균주의 포자를 용이하게 회수할 수 있음을 보여주었다(17). 그 밖에 방선균의 표면항원을 응용한 예는 아직 보고된 바 없다.

세균 분화의 모델로써 잘 알려진 *Streptomyces*는 기중균사 및 포자 형성과 항생물질 생산이 엄밀하게 조절된 단계별 유전자 발현의 결과이다. 액체 배양에서는 이와 같은 형태적 분화는 볼 수 없지만 항생물질 생산은 특징적으로 이루어진다. 그러므로 형태적 변화 없는 균사체의 분화가 일어나고 있다고 가정할 수 있다.

이 논문에서 우리는 *Streptomyces*를 진탕 배양하는 동안에 일어나는 균사체 외피의 조성변화를 항원-항체 반응을 통하여 정량적으로 분석하고 이것이 균의 성장 단계를 표시하는 새로운 분화 지표로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

4종류의 *Streptomyces* 균주, 즉 *S. griseus* KCTC 9080, *S. coelicolor* KCTC 9005, *S. viridochromogenes* KCTC 9009, *S. lavendulae* KCTC 9007 등에 대하여 이미 보고한 방법에 따라 포자생산과 진탕배양을 수행하였다(5). 간략히 기술하면, 사용된 배지는 YEME 배지[yeast extract (Difco) 0.4%, malt extract (Difco) 1.0%, glucose 0.4%, pH 7.0]로써 필요한 경우에 한천(2%)을 첨가하였다. 사면배지 표면을 부드럽게 긁어서 얻어진 포자는 인산완충식염수(PBS)에 풀어서 보관하였다. 포자용액 4 ml을 YEME 배양액 50 ml에 접종하고 30°C, 120 rpm에서 진탕배양 하였다. 대조균으로 사용된 *Escherichia coli*는 LB 배지에서 배양하였다. 각 균체를 성장 단계 별로 회수하여 항원 생산에 사용되었다. *S. griseus*는 접종 후 1일, 3일, 5일, 7일에, *S. coelicolor*는 1일, 2일, 3일, 5일에, *S. lavendulae*는 1일, 3일, 6일, 8일에, *S. viridochromogenes*는 1일, 3일, 5일, 7일에 각각 수확하여 이전에 보고한 방법에 따라 비수용성 외피(세포막/세포벽) 항원을 생산하였다(5, 10). 항혈청은 충분히 성장한 *S. griseus* (7일 배양), *S. coelicolor* (5일 배양), *S. lavendulae* (10일 배양)의 세균체에 대해서 제조하였다. 각각의 외피 항원을 토끼 대퇴부에 근육 주사하여 면역화 시키고 토끼 귀 정맥에서 혈액을 채취하

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-550-3452, Fax: 82-41-550-3409
E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr

여 적혈구를 제거한 다음 항혈청으로 사용하였다(6). 항혈청 제조를 위한 균체는 배양액의 색깔 변화와 균체량의 증가를 관찰하여 더 이상의 변화가 없는 시점에 수확하였고, 항원 제조를 위한 균체는 일정한 배양시간 간격으로 수확하였다. 그렇게 함으로써 배양시간에 따라서 항원-항체 반응이 점차적으로 증가하는 것을 기대할 수 있었다. 이전 보고에서와 마찬가지로 *S. lavendulae* 외피 항혈청은 *S. viridochromogenes* 외피 항원에 대하여 강한 반응성을 보였으므로 *S. viridochromogenes*에 대하여는 *S. lavendulae* 외피 항혈청을 사용하였다(5).

항원-항체 반응은 이중면역확산법 및 ELISA를 통하여 측정하였는데, 침강선 관찰을 위해 PBS-sodium azide (0.02%) 용액에 정제된 한천(Merck)이 1% (w/v)되게 녹인 평판을 만들었다. 각 한천 평판에 well을 만들고 가운데 well에 항혈청을 넣고 주변 well에 각 배양일 별로 얻은 항원 용액을 넣은 다음 실온의 습윤조에 정치시켜 침강선이 형성되게 하였다(11). 간접-ELISA는 역시 이전에 보고된 방법으로 수행되었다(15). 각 균주 별로 배양 시간은 X축에 표시하였고 405 nm에서의 발색정도를 Y축에 표시하였다. 이때 대조군으로 *E. coli* 항원을 사용하여 비특이적 항원에 의한 항원-항체 반응을 상쇄하였다. 그러나 외피 항원에 면역 되지 않은 정상 혈청의 비특이적 항원-항체 반응을 상쇄하지는 않았다. 이 실험을 두 번 이상 반복 실행하여 같은 경향성을 나타내는 것을 확인하고 대표적인 결과를 이 논문에 제시하였다.

각 균주의 배양시간에 따라 균사체의 항원(세포막과 세포벽의 용출 성분)을 준비하여 충분히 분화된 각 균주에 대한 항혈청과의 항원-항체 결합 양상의 변화를 면역확산에 의한 침강선 형성을 통하여 분석하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 *S. griseus*의 경우 3일 배양한 것에서 새로운 침강선 2개가 나타나서 5일, 7일 배양 시에도 계속 존재하였으며 주 침강선 하나가 7일째에 진해졌다. *S. coelicolor*의 경우에는 배양시간이 경과됨에 따라 침강선 하나가 새로이 나타나기 시작했으며 5일 배양 시에 새로운 침강선 하나가 비교적 뚜렷이 형성되었다. 그러나 *S. coelicolor*의 침강선 세기의 증가는 다른 균주들에 비해서 약하게 나타났다. *S. lavendulae*의 경우 3일 배양했을 때 새로운 침강선 3개가 나타나기 시작하여 배양시간이 경과함에 따라 뚜렷해져 8일 배양 시에는 이 3개가 아주 진한 주 침강선을 형성하였다. *S. viridochromogenes*의 경우에는 항체로써 *S. lavendulae*에 대한 항혈청을 사용하였는데, *S. lavendulae*와 유사하게 배양 3일에 나타난 새로운 침강선이 5일에 진해지는 변화를 보였다.

간접-ELISA법을 통해서도 항원성의 변화를 정량적으로 나타낼 수 있었다(Fig. 2). *S. griseus*의 경우 배양기간에 1일 배양한 것에 비해 5일 배양한 것은 1.4배의 흡광도 증가를 보였다. 그러나 *S. coelicolor*의 경우에는 1일 배양한 것에 비해 3일 배양한 것이 1.3 배의 증가를 보였다. 이 두 경우는 다소 미약한 증가로써, 면역확산법에서 새로운 침강선의 출현을 보았던 것과는 상이한 결과이다. *S. lavendulae*의 경우 배양기간에 따라 흡광도가 비교적 크게 증가하여 1일 배양한 것에 비해 8일 배양한 것이 1.9배의 항체 결합능을 보였다. *S. viridochromogenes*의 경우에도 배양기간에 따라 흡광도가 현저하게 증가하여 1일 배양한 것에 비해 7

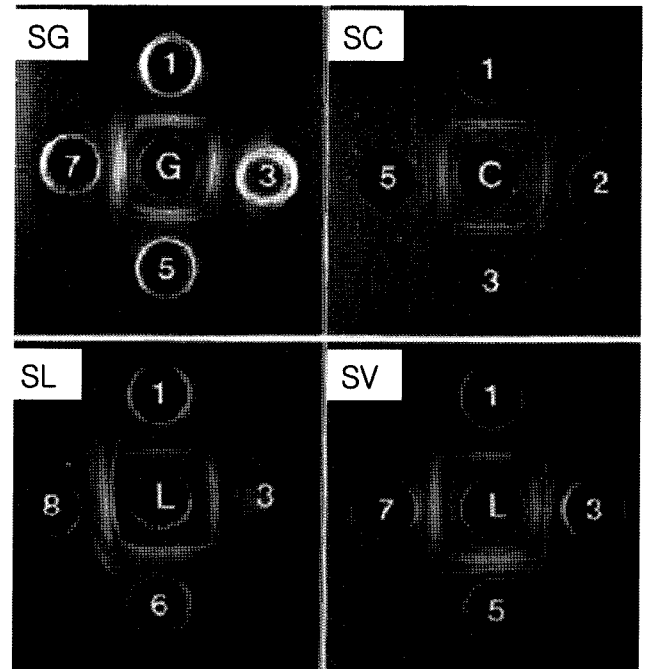


Fig. 1. Immunodiffusion analyses of the changes in antigenicity according to culture times: (SG), *S. griseus*; (SC), *S. coelicolor*; (SL), *S. lavendulae* and (SV), *S. viridochromogenes*. The antigens prepared at each culture time were deposited in the corresponding surrounding wells of the panels, and the antisera in the center. The numbers of the surrounding wells are the culture times in days. G, C and L: antisera to *S. griseus*, *S. coelicolor* and *S. lavendulae*, respectively. Antiserum to *S. lavendulae* was used for *S. viridochromogenes* antigens, too.

일 배양한 것이 2.5배의 항체 결합능을 보였다. 모든 균주의 생장에서 균사체가 색소를 띄는 시기에 ELISA의 흡광도도 따라서 증가하였다. 이상의 결과는 진탕배양에서의 생장에 따라 세포 외피의 구성 성분이 변화함을 알려주고 있다.

세균의 생장에 따른 항원성의 변화는 *Shewanella colwelliana*에서도 알려져 있다(14). 이 세균의 지수생장기 후반 또는 정체기 초반에 운동성 있는 1 μm 의 짧은 간균 형태에서 운동성 없는 3~40 μm 의 긴 코일처럼 감긴 나선 형태로 변화한다. 이때 세균의 표면에서 일어나는 중요한 변화는 새로운 세포외 다당체(EPS)의 생산으로써 단클론 항체를 사용하여 다양한 EPS 항원을 구분할 수 있었다(14). *Candida albicans*는 병원성 곰팡이로써 효모처럼 단세포 형태와 균사 형태의 변환을 수행하는데 고온(40°C)에서 균사를 형성하며 이때 세포벽의 mannans 구조에서 인산기와 β -1,2-linked mannopyranose 단위가 없어지고 비환원성 α -1,3-linked mannopyranose 단위는 증가한 결과 항원성의 뚜렷한 변화를 나타낸다(9). 병원성 방선균, 예를 들면 *Nocardioopsis*의 경우에 dimanomannosyl diglyceride와 diacylated trehalose가 주성분인 glycolipid가 세포 항원의 marker로써 알려져 있으나(8), 비병원성 *Streptomyces*에 대해서는 이러한 균체 항원성이 보고되어 있지 않다. 단지 *S. griseus*의 액침배양에서 배양시간에 따라

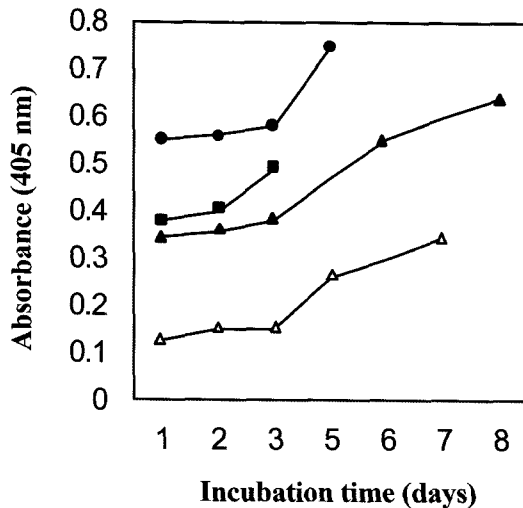


Fig. 2. Changes in the antibody binding capacity according to culture times based on ELISA. ●, *S. griseus*; ■, *S. coelicolor*; ▲, *S. lavendulae*; △, *S. viridochromogenes*. Polystyrene microplates were coated with antigens (0.5 mg/ml), washed by soaking in three changes of PBS-Tween 20, and blocked with BSA. The plates were filled with a 1:100 dilution of the appropriate antiserum. After washing, goat anti-rabbit antibody conjugated to alkaline phosphatase was added to the wells. The alkaline phosphatase was assayed with *p*-nitrophenyl phosphate in diethanolamine. The *p*-nitrophenol released was measured at 405 nm.

균사체 분화와 함께 세포벽의 육탄당 함량이 증가한다는 보고가 있으므로(1) *Streptomyces*에서도 항생물질 생산과 더불어 균사체의 분화가 일어나며 세포벽 다당류의 변화가 수반되고 있음을 추론할 수 있다. 그러나 본 실험에서 각 균주의 외피 다당류 성분에 대한 분석이 이루어지지 않았으므로 이를 항원성 변화의 원인으로 단정할 수는 없다.

*S. coelicolor*에서는 기중균사에만 존재하는 몇 가지 단백질들이 알려져 있다. 기중균사의 소수성 외벽(섬유층; fibrous sheath)에는 작은 막대형 단백질인 RdlA와 RdlB가 있으며, SapB는 계면활성제 기능을 나타내는 단백질로써 기중균사의 외벽을 감싸거나 분비되어 물의 표면장력을 감소시키는 작용을 한다(2). ChpA를 비롯한 8가지 Chp는 기중균사 세포벽 펩티도글리칸층에 존재하는 것으로 밝혀졌는데 이 단백질 역시 기중균사 발기에 필요하다(4). 그밖에 MreB는 포자벽 바로 아래층에 존재하며 포자벽을 견고하게 하는 작용을 하는 단백질로써 알려져 있다(7). *S. coelicolor* 균사 표면을 원자전자현미경(AFM)으로 관찰하면 영양세포는 매끄러운 표면을 갖는데 반해 기중균사의 표면은 섬유층으로 둘러싸인 것이 확인되었다(3).

이 보고들에 의하면 *S. coelicolor* 균사 표면에는 여러 종류의 새로운 단백질이 기중균사의 발달과 연관되어 존재하므로 콜로니 발달 과정에 따라서 항원-항체 반응의 강도가 높아질 것으로 예측할 수 있다. 그런데 본 실험에서 나타난 *S. coelicolor*의 항원성 변화는 매우 저조하게 나타났다. 이는 진탕배양과 표면배양

의 물리적 차이, 즉 진탕배양에서는 기중균사 형성을 위해서 콜로니 표면과 공기층간의 표면장력의 감소에 필요한 Sap이나 Chp 등의 기중균사 단백질들이 균사 외피에 축적될 수 없기 때문이라고 생각할 수 있다(2).

이상에서 진탕 배양하여 얻은 *Streptomyces* 균체 외피의 항원성 변화를 성장단계와 연관시키고자 하였다. 실험에 사용된 4균주에서 모두 항원성의 변화가 나타나기는 하지만 균주마다 변화 폭이 다양하게 나타나서 보다 정밀한 정량적 분석이 필요하다고 하겠다. 이를 위하여 항원성 변화가 뚜렷이 나타난 균주에서 주요 항원을 밝히고 이의 성장 단계별 변화를 분석해야 할 것이다.

감사의 말

이 연구는 2005년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었습니다.

참고문헌

- Barabàs, Gy. and G. Szabo. 1965. Comparison of cell wall composition of *Streptomyces griseus* strains. *Arch. Mikrobiol.* 50, 156-163.
- Claessen, D., W. De Jong, L. Dijkhuizen, and H.A.B. Wosten. 2006. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol.* 14, 313-319.
- Del Sol, R., I. Armstrong, C. Wright, and P. Dyson. 2007. Characterization of changes to the cell surface during the life cycle of *Streptomyces coelicolor*: Atomic force microscopy of living cells. *J. Bacteriol.* 189, 2219-2225.
- Elliot, M.A., N. Karoonuthaisiri, J. Huang, M.J. Bibb, S.N. Cohen, C.M. Kao, and M.J. Buttner. 2003. The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* 17, 1727-1740.
- Jo, S.K. and J.-h. Kim. 2007. Serolotaxonomical analysis of some *Streptomyces* strains using antibodies against cell envelope. *Kor. J. Microbiol.* 43, 137-141.
- Kirby, R. and E.P. Rybicki. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a mean of taxonomic analysis of *Streptomyces* and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1891-1894.
- Mazza, P., E.E. Noens, K. Schirmer, N. Grantcharova, A.M. Mommaas, H.K. Koerten, G. Muth, K. Flardh, G.P. Van Wezel, and W. Wohlleben. 2006. MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol. Microbiol.* 60, 838-852.
- Mordarska, H., J. Zakrzewinska-Czerwinska, M. Pasciak, B. Szponar, and S. Rowinski. 1998. Rare, suppurative pulmonary infection caused by *Nocardiosis dassonvillei* recognized by glycolipid markers. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21, 47-55.
- Okawa, Y. and K. Goto. 2006. Antigenicity of cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida stellatoidea* cultured at high temperatures in BACTEC medium. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1723-1727.
- Poxton, I.R. and C.C. Blackwell. 1986. Isolation and identification of bacterial antigens. In D.M. Weir (ed.), *Handbook of experimental immunology*, vol. 1, Immunochimistry, 4.1-4.22. Blackwell Scientific Publication.
- Ridell, M. 1981. Immunodiffusion studies of *Mycobacterium*,

- Nocardia*, and *Rhodococcus* for taxonomic purpose, pp. 235-241. In K.P. Schaal and G. Pulverer (ed.); Actinomycetes. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.
12. Ridell, M. and S.T. Williams. 1983. Serotaxonomical analysis of some *Streptomyces* and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2857-2861.
 13. Ridell, M., G. Wallerstrom, and S.T. Williams. 1986. Immunodiffusion analysis of phenetically defined strains of *Streptomyces*, *Streptovercillium* and *Nocardioopsis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 24-27.
 14. Sledjeski, D.D. and R.M. Weiner. 1993. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Shewanella colwelliana* exopolysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1565-1572.
 15. Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Bartlett. 1976. Enzyme-immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 53, 55-56.
 16. Willey, J., J. Schwedock, and R. Losick. 1993. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* 7, 895-903.
 17. Wipat, A., E.M.H. Wellington, and V.A. Saunders. 1994. Monoclonal antibodies for *Streptomyces lividans* and their use for immunomagenetic capture of spored from soil. *Microbiology* 140, 2067-2076.

(Received October 1, 2007/Accepted December 2, 2007)

ABSTRACT: Serological Analysis of the Antigenicity during Cultivation of *Streptomyces* Strains

Jae-heon Kim^{1*} and Sung-Kee Jo² (¹Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea, ²Radiation Research Center for Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeong-eup 580-185, Korea)

The changes in antigenicity during cultivation of streptomycetes were determined by immunodiffusion assay and indirect ELISA. New precipitin lines in immunodiffusion assay began to appear in the growth period of the soluble pigment production and became thickened thereafter. The increase in the antigenicity was also confirmed by ELISA. The antigenic development was relatively weak for *S. coelicolor* and *S. griseus* while that was strong for *S. lavendulae* and *S. viridochromogenes*. The results indicated that *Streptomyces* strains, even though not proved for some strains, changed the compositions of cell envelope during submerged growth and this could be estimated quantitatively by serological method.