KOR. JOUR. MICROBIOL November, 1991 p. 307~313 Vol. 29, No. 5

Pseudomonas synxantha A3가 생성하는 Siderophore A3에 관한 연구

전홍기 · 강호영 · 고철종 · 백형석

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Biochemical Studies of the Siderophore A3 Produced by *Pseudomonas synxantha* A3

Jun, Hong-Ki, Ho-Young Kang, Chul-Jong Ko and Hyung-Suk Baik

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT: A yellow-green, fluorescent siderophore A3 was extracellularly produced under iron-limited growth conditions from *Pseudomonas synxantha* A3. The physicochemical and biological properties of siderophore A3 were examined. The approximate molecular weights of the Fe(III)-siderophore A3-1 complex and Fe(III)-siderophore A3-2 complex were estimated to be about 1,300 and 1,100, respectively, by Bio-gel P2 gel exclusion chromatography. The molar ratio between the siderophore and the Fe(III) was 1.08 mole. The molecular weight of the complex could be calculated with this ratio and the new values were 1,150 and 960, respectively. The binding constant(K) between the siderophore A3 and Fe(III) that determined by displacing the iron from the Fe(III)-siderophore complex with EDTA was 4.12×10^{18} at pH 5.0. Siderophore A3 appeared to have antibacterial activity on several bacterial strains, however, ferric siderophore A3 complex did not show that activity. The cytotoxicity of siderophore A3 was obtained from Human Chronic Myelogenous Leukemia K562 cells. Inhibition concentration (50%)(IC_{50}) was 0.17 μg/ml.

KEY WORDS □ *Pseudomonas synxantha* A3, siderophore A3, molecular weight, binding constant (K), antibacterial activity

금속이온은 유기물질과는 다르게 생체내에서 생합성되지 않고 외부환경으로 부터 획득하여야 한다. 호기적 환경하에서 생물학적인 pH의 범위에서 철은 불용성으로 존재하며, oxyhydroxide와 같은 3가의 상태로 존재한다(Schwyn과 Neilands, 1987). 이와같이 불용성으로 존재하는 철을 이용하기 위하여 많은 미생물들은 철과 친화성이 높고 형광성을 나타내는 물질을 분비하는데, 이 물질을 siderophore라 하며 (Neilands, 1981), 이 물질들은 대개 물에 가용성인 물질로서 분자량이 대략 1,500 이하의 저분자이다 (Bagg와 Neilands, 1987). Siderophore를 생성하는 세균으로는 *Escherichia coli*(Waters와 Crosa, 1988), *Agrobacterium tumefaciens* (Leong와 Neilands, 1981), *Azotobacter vinelandii*(Page와 von Tigerstrom, 1988), *Acinetobacter calcoaceticus*(Neidle등, 1988), *Pseudomonas fluorescens*(Philson과 Llinas, 1982), *Vibrio cholerae*(Sigel과 Payne, 1982)등이 알려져 있다. *Pseudomonas*가 생성하는 형광성의 siderophore는 철이 제한된 조건하에 생성되는 quinoline형태의 chromophore와 C말단의 아미노산이 δ-N-hydroxyornitine인 6~9개의 아미노산으로 구성된 직쇄상의 peptide로서 구성되어 있고, 자외선(UV)하에서 형광성을 나타낸다(Martin등, 1981). 여러 종의 미생물에 있어서 siderophore생성은 virulence factor와 관련성이 있다고 보고되었으며(Neilands와 Leong, 1986), 식물 병원균이 식물에 감염되었을때 병원성 유지를 위해서는 균의 지속적인 성장이 필요하므로 식물 병원성균의 siderophore는 식물병원성과 관련이 있는 것으로 보고되었다(Leong과 Neilands, 1981). 감자의 뿌리에서 분리된 *P. fluorescens* 및 *P. putida*를 감자등의 종자에 처리하여 작물을 생육시키면 생육이 좋고 수량이 증대하는 것으로 알려져 있다

(Manuell등, 1988). 이와같이 *Pseudomonas*속 세균은 뿌리 표면에 군집을 이루어 *Erwinia, Trichoderma, Fusarium*등의 병원균 생육을 억제시키는데 이는 *Pseudomonas*속 세균이 siderophore를 생성하여 식물 뿌리 주변의 철을 chelating하여 병원성균을 포함한 다른균들의 생육을 억제 함으로써 토양전염병을 감소시키며, 작물의 생육을 양호하게 하여 수량이 증대하는 것으로 알려져 있다(Kloepper등, 1980).

본 연구에서는 *Pseudomonas synxantha* A3(Sakai와 Jun, 1978)가 생성하는 siderophore A3를 정제하였으며, 물리화학적 및 생리화학적 성질을 검토하기 위해 siderophore A3와 철과의 결합 비율을 측정하였고, siderophore A3에 의한 항균활성과 K562 cell에 대한 세포독성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본실험에 사용한 균주는 실험실에 보존중인 adenosine과 adenine내성균으로 분리된 *Pseudomonas synxantha* A3(Sakai와 Jun, 1978)를 siderophore A3의 정제 및 그 생리적 성질 검토에 사용하였다.

배지 및 배양방법

균의 전배양에는 배지 B를 이용하였으며, siderophore생성을 위해서는 최적배지 A를 사용하였다(Table 1). 배지 B가 5 ml들어있는 15 ml cap tube에 균을 접종하여 하룻밤 동안 배양하여 멸균된 식염수(0.85% NaCl)로 2회 세척한 다음, 5 ml의 멸균된 식염수를 넣어 현탁한 후 전배양액으로 사용하였다. Siderophore 생성을 위하여 500 ml 진탕 플라스크에 배지 100 ml를 넣은후 전배양액 0.1 ml를 접종하여 30℃ 왕복 진탕배양기에서 120 Rev. ×6 cm stroke로 44~48시간 배양하였다.

시약 및 기구

8-Hydroxyquinoline, nicotineamide adenine dinucleotide phosphate($NADP^+$), hemoglobin, ferric ammonium citrate, 1,10-phenanthroline, α-naphthylamine, hydroxylamine · HCl은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO.)에서 구입하여 사용하였다. Bio-gel P2는 Bio-Rad Laboratories에서, CM-Sephadex C-50과 Sephadex G-25는 Pharmacia Fine Chemicals Inc.에서 구입하였다. 그 외의 시약들은 1급 이상의 분석용 시약들을 사용하였다. 증류수는 UHQ deionizer(Elga Ltd. Lane End High Wycombe Bucks, England)를 이용하여 물 속의 이온을 제거한 후 모든 실험에 이용하였으며, 모든 초자기구는 철 이온의 혼입을 최소화하기 위하여 사용하기 전에 4 N HCl과 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)로 세척하였다.

Siderophore A3의 정제

균주를 siderophore A3의 생성용 배지에 44~48시간 배양한 후 200 mg/l의 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 첨가하여 저어준 다음 10,000×g에서 30분간 원심 분리하였다.

Table 1. *Cultivation media for siderophore A3 production by Pseudomonas synxantha A3*

Medium A	L-Sorbitol	10 g
	KNO_3	5 g
	K_2HPO_4	1 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
	Distilled water	1000 ml
		(pH 8.0)
Medium B	Peptone	10 g
	Meat extract	5 g
	Yeast extract	5 g
	NaCl	2 g
	Distilled water	1000 ml

상등액을 취해 30℃에서 1/20로 감압 농축하여 NaCl로 완전히 포화시킨 다음 10,000×g에서 30분간 원심분리 하였다. 상등액을 회수한 다음 0.5 volume의 $CHCl_3$/phenol (1:1, v/v)을 첨가하여 30분~1시간 교반하여 수층을 제거하였다. 두배 volume의 diethyl ether와 소량의 물을 첨가하여 수층에 용출시킨 후 위의 유기층을 조심스럽게 제거하였다. Diethyl ether 1 volume을 3회 첨가하여 phenol을 제거한 다음, 30℃에서 감압농축하여 ether를 제거하였다. Isopropyl alcohol(−20℃)을 4배 정도 첨가하여 −20℃에서 30분간 방치한 다음, Fe(III)-siderophore A3 complex를 침전시키고 10,000×g에서 30분간 원심분리 하였다. Isopropyl alcohol을 제거한 다음 동결건조하여 −20℃에서 보관하여 다음 실험에 이용하였다. 동결건조된 crude Fe(III)-siderophore A3 complex를 소량의 0.1 M pyridine acetate buffer(pH 6.5)에 녹인 다음 Fig. 1과 같이 정제를 실시하였다. Sephadex G-25를 거친 각 시료들을 silica gel G-60에 10 μl를 점적하여 70% ethanol 용매계에서 전개시켜, 단일 spot가 얻어진 fraction들을 모아 동결건조를 행하였다.

Iron-free siderophore A3의 조제

Meyer등의 방법(Meyer와 Abdallah, 1978)을 이용하여 탈철과정을 행하였다. Fe(III)-siderophore A3 complex를 50 ml의 탈이온수에 현탁한 후 10%(v/v) aqueous acetic acid로 pH 4.0으로 조절하고 3 volume의 5%(w/v) 8-hydroxyquinoline/chloroform을 첨가한 후 마개를 한 삼각플라스크 내에서 4℃, 1일간 강하게 교반하였다. 색깔이 다시 형광성을 띠는 것을 확인한 다음, 수층을 취하여 다시 10%(v/v) aqueous acetic acid로 pH 4.0으로 조절하여 5%(w/v) 8-hydroxyquinoline/chloroform용액으로 4회 추출하였다. 이 용액을 20 ml로 농축한 후 증류수로 평형화시킨 Sephadex G-25 column (2.5×20 cm)에 loading하여 증류수로 용출하여 단일 peak를 얻은 다음, 동결건조하여 −20℃에서 저장하였다.

Siderophore A3의 분자량 측정

정제물질의 분자량은 Toress등의 방법(Toress등, 1986)으로 측정하였다. Bio-gel P2 column (1.6×42

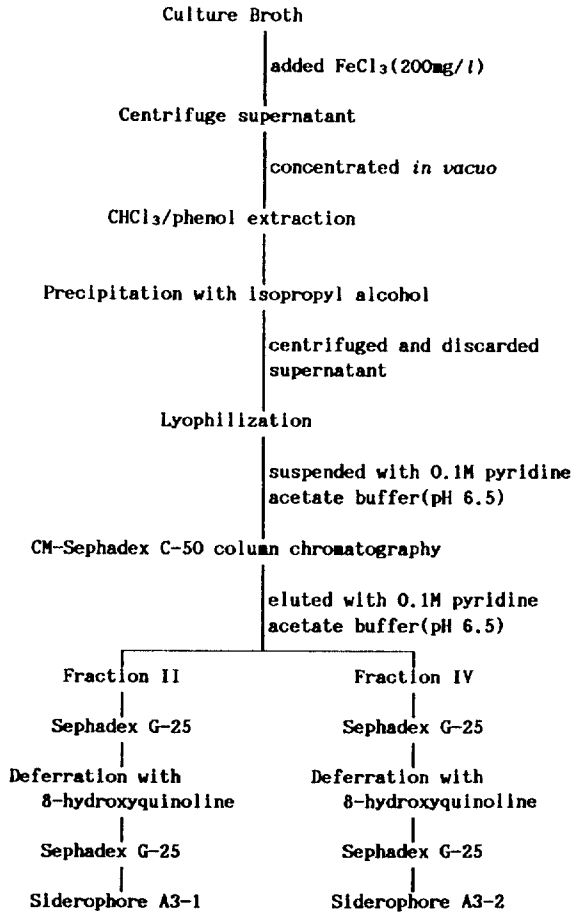

Fig. 1. *Isolation and purification of siderophore A3*

cm)을 0.1 M Potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화 시킨 후, sample을 loading하여 gel exclusive chromatography를 행하여 분자량을 측정하였다. Standard물질로 bacitracin(분자량 1,450), vitamin B_{12}(분자량 1,350), $NADP^+$(분자량 765), reduced glutathione(분자량 307)을 이용하여 8.9 ml/hr의 유속으로 용출하면서 연속적으로 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fe(III)-siderophore A3의 binding constant 측정

Meyer의 방법(Meyer와 Abdallah, 1978)에 준하여 실험을 하였다. Fe(III)-siderophore A3 complex를 0.1 M acetate buffer(pH 5.0), 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0), 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0), 0.1 M glycine/NaOH buffer(pH 10.0)에 녹여 50 μM되게 하였다. Fe(III)-siderophore A3 complex와 EDTA의 최종농도가 각각 50 μM, 15 mM 되도록 상기의 buffer에 녹였다. 각 buffer에 제조한 Fe(III)-siderophore A3 complex-EDTA용액을 50 μM Fe(III)-siderophore A3 용액에 첨가하여 EDTA의 최종농도를 0 mM에서 15 mM까지 연속적으로 증가시키면서 흡광도의 차이를 관찰하였다. 반응계의 전 체용량을 6 ml로 일정하게 하였고 이 상태하에서 Fe(III)-siderophore A3 complex의 농도는 일정하였다. 평형상태에 도달하도록 1시간 상온에 방치하여 평형에 도달되었을 때 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(Meyer와 Abdallah, 1978).

Siderophore A3의 항균 활성 시험

Paper disc 방법으로 siderophore A3의 항균 활성을 측정하였다. 시험균을 nutrient broth에서 하룻밤 배양한 후 2 ml의 nutrient top agar(0.75% agar)에 100 μl의 균을 pour plating한 후 직경 7.5 mm의 paper disc를 12.5, 6.5, 3.125 mg/ml의 siderophore A3용액과 15.4 mg/ml의 Fe(III)-siderophore A3 complex 용액에 적신 후 top agar위에 놓아 30℃에서 16시간 배양하여 그 결과를 관찰하였다.

Human 백혈병 유래의 암세포에 대한 siderophore A3의 세포독성

K562(Human Chronic Myelogenous Leukemia K562) 세포를 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium+10% Fetal Bovine Serum(FBS) medium에서 2×10^4 cells/ml되게 한 다음 24 well plate에 20 μl씩 분주하였다. 여기에 0.05, 0.1, 1, 2 μg/ml의 siderophore A3 용액을 20 μl씩 각각 첨가하여 37℃, 5% CO_2하에서 3일간 배양하였다. 배양후 세포를 0.5% trypan blue로 염색하고 생세포수를 혈구계수계를 사용하여 계산하였다. 다른 약제와의 combintion effect를 알아보기 위하여 0.01 μM의 vinblastine, actinomycin, cytosine, arabinoside, 5-fluoro-2-deoxyuridine 등의 약제에 ml당 0.1 μg의 siderophore A3를 첨가한 후 동일한 조건에서 실험을 행하였다.

결과 및 고찰

$CHCl_3$/phenol추출 및 isopropyl alcohol에 의한 침전

철 제한 배지에서 44~48시간 배양된 형광성물질(yellow-green)이 포함된 배양물에 $FeCl_3$를 첨가한 다음, $CHCl_3$/phenol(1:1, v/w)을 이용하여 추출을 행하였을때 Fe(III)-siderophore A3 complex는 $CHCl_3$/phenol에 녹아 짙은 reddish-brown색을 나타내었다. 철을 결합시키지 않은 crude siderophore A3는 $CHCl_3$/phenol에 대한 추출의 정도가 저조하였으나 철을 결합하였을때는 추출 효율이 5배 이상 증대하였다. 이 사실에서 Fe(III)가 siderophore A3의 $CHCl_3$/phenol에 대한 용해도를 증가시킴을 알 수 있었다. 위의 추출물에 isopropyl alcohol(−20℃)를 첨가하였을때 Fe(III)-siderophore complex는 침전이 되었다. 10,000×g에서 냉동 원심분리하여 isopropyl alcohol을 제거하고 소량의 물을 가하여 현탁한 후에 동결건조하여 얻어진 건조체를 CM-Sephadex C-50 column으로 정제하였다.

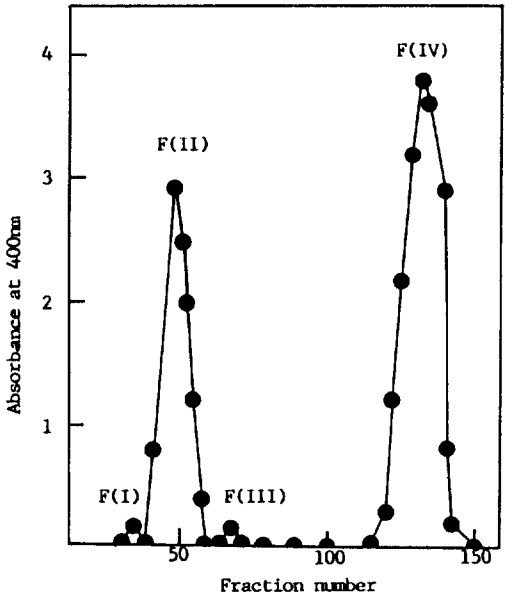

Fig. 2. *Elution profile of CM-Sephadex C-50 column chromatography of Fe(III)-siderophore A3 complex. Crude ferric siderophore A3 solution was applied to a CM-Sephadex column(2.5×90 cm) equilibrated with 0.1 M pyridine acetate buffer(pH 6.5) and eluted with same buffer. Ferric siderophore A3 was detected at 400 nm absorbance. Flow rate, 14 ml/hr; fraction volume, 3.0 ml.*

CM-Sephadex C-50 및 Sephadex G-25 column chromatography

Crude Fe(III)-siderophore complex 100 mg을 3 ml의 0.1 M pyridine acetate buffer(pH 6.5)에 녹여 동일 buffer로 평형화시킨 CM-Sephadex C-50 column (2.5×90 cm)에 loading하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 F(I), F(II), F(III), F(IV)의 4개의 peak가 나타났으며 F(II)와 F(IV) 부분을 각각 모아 동일 조건 하에서 CM-Sephadex C-50 column chromatogrphy를 행하였으며 단일 peak를 나타내는 F(II)부분을 Fe(III)-siderophore A3-1 complex, F (IV) 부분을 Fe(III)-siderophore A3-2 complex라고 명명하였다. 또한 Fig. 2에 나타난 F(I)과 F(III)의 분획은 F(II)와 F(IV)의 분해산물로 추정되었다. Sephadex G-25를 사용한 gel여과에서 얻어진 각 시료를 silica gel G-60에 10 μl씩 spotting하여 70% ethanol 용매계 및 butanol: acetic acid: water(120: 30:30, v/v/v)용매계로 분리하여 UV하에서 확인한 결과, 거의 단일 spot가 확인되었으며 본 정제과정 (Fig. 1)을 통하여 siderophore A3는 거의 단일물질로 정제가 된것으로 사료되었다.

Siderophore A3-1 A3-2의 분자량 측정

정제된 siderophore A3로 부터 Fe(III)을 제거한

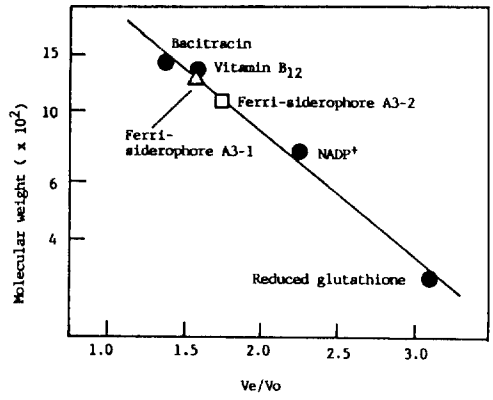

Fig. 3. *Determination of molecular weight of siderophore A3-1 and A3-2 by Bio-gel P2 gel filtration. The column(1.6×40 cm) of Bio-gel P2 was equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer and eluted with same buffer. The void volume(V_o) was determined by elution volume of hemoglobin(M.W. 64,500). Flow rate, 8.9 ml/hr; fraction volume, 2.5 ml*

siderophore A3-1과 A3-2를 Bio-gel P2 column에 loading하여 용출한 결과 표준물질보다 훨씬 뒤에 용출되었다. 두개의 fraction으로 분리되어졌으며 형광성의 fraction은 둘 다 305 nm에서 최대흡광도를 나타내었다. 따라서 정확한 분자량을 측정하기 위하여 ferric siderophore A3-1 및 A3-2를 각각 Bio-gel P2 column에 loading하였다. 그 결과 Fe(III)-siderophore A3-1 complex와 A3-2 complex의 분자량을 각각 1,300, 1,100으로 추정되었다(Fig. 3). Fe (III)를 결합시킨 상태에서는 siderophore A3가 구형으로 Fe(III)와 chelating하게 되어 단백질과 유사한 용출 양상을 보인다고 사료된다. 철을 제거시킨 상태에서는 siderophore가 불안정하여 절단이 되었다고 추정하였다. 평형상태에서 반응계의 EDTA의 농도는 53.278 μM이었고 Fe(III)-siderophore A3 complex의 농도는 49.18 μM이었다(Fig. 4). Siderophore A3와 Fe(III)간의 molar ratio는 1.08이었고 따라서 보정된 siderophore A3-1, A3-2의 분자량은 각각 1,150, 960이었다.

Binding constant의 측정

Complex의 binding constant인 K_2는 Rosotti등의 방법(Rosotti와 Rosotti, 1961)에 의해 EDTA를 Fe (III)의 경쟁적인 chelator로 사용하여 측정하였다. EDTA의 존재하에 Fe(III)-siderophore A3 complex (pFe)는 부분적으로 해리하게 된다.

$$pFe + EDTA \xrightarrow{K_1} p + EDTA - Fe \qquad (1)$$

평형상수 K_1은 다음과 같다.

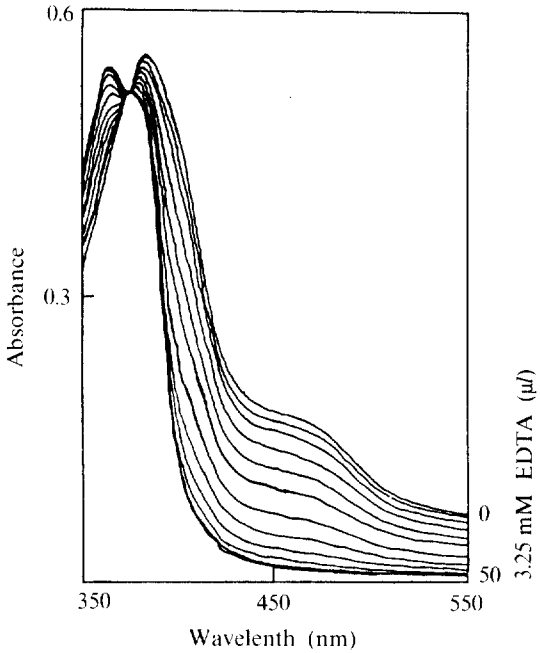

Fig. 4. *Determination of the molar ratio of the Fe(III)-siderophore A3-1. Change in the absorption spectrum of Fe(III)-siderophore A3-1 complex as a function of the amount of EDTA solution added.*

$$K_1=\frac{[pFe][EDTA]}{[p][EDTA\text{-}Fe]}$$

(1)식은 다음과 같은 2개의 식을 의미한다.

$$pFe \xrightarrow{K_2} p+Fe \qquad (2)$$

Table 2. *Variation of the apparent stability constant (K_2) of the Fe(III)-siderophore A3 complex as a function of pH*

pH	K_1	K_3	K_2
5	4.12	10^{18}	4.12×18^{18}
6	5.20	10^{20}	5.20×10^{20}
7	140.00	10^{22}	140.00×10^{22}
10	10,100.00	10^{27}	$10,100.00\times10^{27}$

$$EDTA+Fe \xrightarrow{K_3} EDTA-Fe \qquad (3)$$

이 식에서 평형상수는

$$K_2=\frac{[pFe]}{[p][Fe]},\ K_3=\frac{[EDTA\text{-}Fe]}{[EDTA][Fe]}$$ 이다.

따라서 Fe(III)-siderophore의 binding constant는 $K_2=K_1\times K_3$이다. EDTA와 Fe에서의 pH에 따른 K_3의 값은 잘 알려져 있으므로 free iron의 농도를 무시했을때, 이 경우 [p]=[EDTA-Fe]이다.

$[p]=[pFe]_{initial}-[pFe]$이며, $[EDTA]=[EDTA]_{initial}-[EDTA\text{-}Fe]$이므로 K_1값은 반응평형시의 [pFe]의 수치로서 계산될 수 있다. Fe(III)-siderophore A3-1 complex의 결합상수에 대한 실험결과는 Table 2와 같이 pH에 따라서 다르게 나타났다.

Siderophore A3에 의한 항균활성 test

각 시험균에 대한 항균활성의 결과를 Table 3에 나타내었다. *Erwinia carotovora, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens*에서는 항균활성이 없었으며 *Aerobacter aerogenes, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* 등에서는 강한 항균 활성을 보였는데 siderophore A3에 저항성을 나타내는 균

Table 3. *Antibacterial activity of iron acquisition by siderophore A3*

Microorganism	Siderophore A3			Ferric siderophore A3
	12.5 mg/ml	6.5 mg/ml	3.125 mg/ml	15.4 mg/ml
Agrobacterium tumefaciens PC2501	++*	−	−	−
Aerobacter aerogenes IFO3317	+++	++	+	−
Bacillus subtilis IFO3007	+++	++	+	−
Brevibacterium ammoniagenes IFO12071	+++	++	+	−
Erwinia carotovora IAM12633	−	−	−	−
Micrococcus leteus IFO 3763	+++	++	+	−
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* NPS3121	+++	++	+	−
Pseudomonas aeruginosa IAM1514	−	−	−	−
Pseudomonas fluorescens IAM12022	−	−	−	−
Proteus vulgaris IFO3851	+++	++	+	−
Staphylococcus aureus IAM1011	+++	++	+	−

Paper disc(7.5 mm) soaked in filter sterilized siderophore A3 solution was placed on NB top agar medium inoculated with test organism and incubated for 16 hr. at 30℃.
*+; <10 mm diameter, ++; 10-15 mm diameter, +++; >15 mm diameter, −; no zone

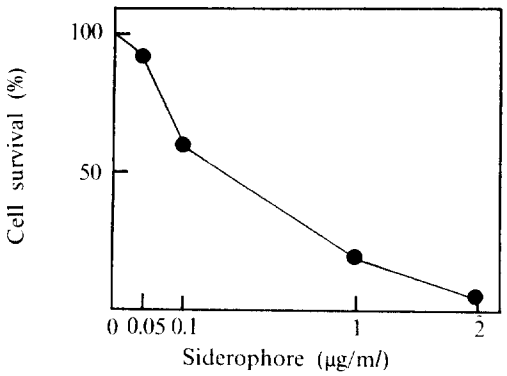

Fig. 5. *Cytotoxicity of siderophore A3 for human chronic myelogenous leukemia K562 cells*

주들은 대부분 siderophore를 분비하는 종으로 사료되었다(Cox, 1980; Leong과 Neilands, 1982; Meyer와 Abdallah, 1978).

K562 cell에 대한 siderophore A3의 세포 독성

Siderophore A3의 50%의 inhibition concentration(IC_{50})은 0.17 μg/ml로서 adriamycin, colchicine등과 비교해 보았을때 상대적으로 높은 세포독성이 있는 것으로 사료 되었다(도형국, 1991) (Fig 5). 각종 약물에서의 siderophore A3의 combination effect의 결과는 Table 4와 같았다. Siderophore A3를 같이 첨가해 주었을때 세포독성이 증가함을 알 수 있었다. 이는 siderophore A3가 철이온을 chelating함으로써 암세포가 철이온을 이용할 수 없어 생육이 저지되거나 siderophore A3 자체의 독성에 의해 생육이 저해된다고 사료되었다. 그러나 이러한 사실은 앞으로 더욱더 세밀하게 검토되어져야 할 것이며, siderophore A3의 세포독성의 기작 및 약리 물질로의 응용의 가능성도 역시 검토되어져야 할 것이다.

Table 4. *Combination effect of siderophore A3 with chemical agents*

Chemical agents	Siderophore A3(0.1 μg/ml)	
	None	Addition
Vinblastine	73(cells)	47(cells)
Actinomycin	68	26
Cytosine arabinoside	61	50
5-fluro-2-deoxyuridine	88	59

적 요

Pseudomonas synxantha A3는 철이 제한된 조건하에서 yellow-green의 형광성 siderophore A3를 세포외로 분비하였다. *Pseudomonas synxantha* A3가 생성하는 siderophore A3를 정제하여 물리화학적 및 생리화학적 성질을 검토하였다. Bio-gel P2 gel exclusion chromatogrphy에 의해 얻어진 Fe(III)-siderophore A3-1 complex와 Fe(III)-siderophore A3-2 complex의 분자량은 각각 약 1,300, 1,100이었다. Fe(III)-siderophore A3 complex에 EDTA를 경쟁적 ligand로 작용시켜 구한 Fe(III)와 siderophore A3의 molar ratio는 1.08이었으며, 따라서 siderophore A3-1과 siderophore A3-2의 분자량은 각각 1,150, 960이었다. Siderophore A3의 결합상수는 pH 5.0에서 4.12×10^{18}이었으며, *Aerobacter aerogenes, Bacillus subtilis*등의 siderophore를 생성하지 않는 세균에서는 siderophore A3가 항균활성을 나타내었으나, *Erwinia cartovora, Pseudomans fluorescens*등 siderophore를 생성하는 세균에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 그러나 Fe(III)-siderophore A3 complex는 항균활성을 나타내지 않았다. Human 백혈병 유래의 K562 cell에 대한 세포독성을 검토한 결과 siderophore A3의 IC_{50}은 0.17 μg/ml이다.

사 사

이 논문은 1990년도 문교부지원 한국 학술진흥재단의 지방대 육성 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. **도형국**, 1991. 사람 암세포중 K562와 U937에서의 항암제 다제내성 기정 및 내성극복. 부산대학교 의학석사논문.
2. **Bagg A. and J.B. Neilands,** 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.*, **51**, 509-518.
3. **Cox, C.D.,** 1980. Iron Uptake with Ferripyochelin and Ferric Citrate by *Pseudomonas aeroginosa. J. Bacteriol.*, **142**, 581-587.
4. **Kloepper, J.W., J. Leong, T. Martin and M.N. Schroth,** 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, **286**, 885-886.
5. **Leong, S.A. and J.B. Neilands,** 1981. Relationship of siderophore-mediated iron assimilation to virulence in crown gall disease. *J. Bacteriol.*, **147**, 482-491.
6. **Leong, S.A. and J.B. Neilands,** 1982. Siderophore Production by Phytopathogenic Microbial Species. *Arch. Biochem. Biophy.*, **218**, 351-359.
7. **Manuell, L.L., P. Salinas, A.E. Toranzo, J.L. Barja and J.H. Crosa,** 1988. Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum. J. Bacteriol.*, **170**, 1920-1925.
8. **Martin, T., M.B. Hossain, C.L. Barnes, J. Leong and D. van der Helm,** 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth

promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry*, **218**, 351-359.

9. **Meyer, J.M. and M.A. Abdallah,** 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification, and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.*, **107**, 319-328.
10. **Neidle, E.L., C. Harnett, S. Bonitz and L.N. Ornston,** 1988. DNA sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* catechyol 1,2-dioxygenase I structure gene cat A: Evidence for evolutionary divergence of intradiol dioxygenase by aquisition DNA sequence repetitions. *J. Bacteriol.*, **170**, 4874-4880.
11. **Neilnds, J.B.,** 1981. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 715-731 .
12. **Neilands, J.B. and S.A. Leong,** 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **37**, 187-208.
13. **Page, W.J. and M. von Tigerstrom,** 1988. Aminochelin, a catecholamine siderophore produced by *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 453-460.
14. **Philson, S.B. and M. Llinas,** 1982. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8081-8085.
15. **Rosotti, J.C. and H. Rosotti,** 1961. The determination of stability constants, New York: McGraw Hill.
16. **Sakai, T. and H.K. Jun,** 1978. Purification and characterization of adenine deaminase in *Pseudomonas synxantha*. *J. Ferment. Technol.*, **56**, 257-265.
17. **Schwyn B. and J.B. Neilands,** 1987. Universal chemcial assay for the detection and determination of siderphore. *Anal. Biochem.*, **160**, 47-56.
18. **Sigel, S.P. and S.M. Payne,** 1982. Effect of iron assimilation on growth, siderophore production, and expression of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **150**, 148-155.
19. **Toress, L., J.E. Perez-ortin, V. Tordera and J.P. Beltran,** 1986. Isolation and characterization of an Fe(III)-chelating compound produced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 157-160.
20. **Waters, V.L. and J.H. Crosa,** 1988. Divergence of the aerobactin iron uptake systems encoded by plasmid pCol V-K30 in *Escherichia coli* K-12 and pSMN1 in *Aerobacter aerogenes* 62-1. *J. Bacteriol.*, **170**, 5153-5160.

(Received October 11, 1991)
(Accepted October 24, 1991)