

## *Vibrio mimicus* ATCC 33653이 생산하는 Siderophore의 정제와 균의 병원성에 미치는 영향

부산대학교 자연과학대학 미생물학과<sup>1</sup>, 대학원 미생물학과, 제주대학교 해양과학대학  
응용해양과학전공<sup>2</sup>, 울산대학교 자연과학대학 생명과학부<sup>3</sup>

박수정 · 주성아<sup>3</sup> · 허문수<sup>2</sup> · 정초록 · 주진우<sup>1</sup>

=Abstract=

### Purification Siderophore from *Vibrio mimicus* ATCC 33653 and its Effect to Bacterial Pathogenicity

Soo-Jung Park, Seong-A Ju<sup>3</sup>, Moon-Soo Heo<sup>2</sup>, Cho-Rok Jung and Jin-Woo Ju<sup>1</sup>

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan,  
Korea<sup>1</sup>, Department of Microbiology, Graduate School, Pusan National University, Pusan,  
Korea, Faculty of Applied Marine Sciences, College of Ocean Sciences, Cheju National  
University<sup>2</sup>, Division of biological Sciences, College of Natural Science, Ulsan University<sup>3</sup>

Growth under conditions of iron-restriction and the production of siderophore was examined in *Vibrio mimicus* ATCC 33653. This strain grew and multiplied in the presence of the high-affinity iron chelators ethylenediamine-di (o-hydroxyphenylacetic acid). Chrome azurol S (CAS) agar and solution were used to detect the production of siderophore under these condition. Siderophore could be detected in the iron-restricted culture supernatants. The siderophore was extracted from iron-restricted culture supernatants by phenol-chloroform-ether method and purified by Dowex ion-exchange and Sephadex G-25 gel filtraction chromatography. The purified siderophore was confirmed by paper chromatography and HPLC.

The Purified siderophore enhanced the growth of *V. mimicus* when the bacterium was grown in iron limited medium. Injection of both the siderohore and the bacteria to mice resulted in more rapid death than that of the only bacteria. However, the siderophore did not show lethality to mice and any toxicity to cell line like HeLa and U937.

**Key Words:** *V. mimicus*, Siderophore, Pathogenesis

### 서 론

미생물들은 생존을 위해서 여러 금속이온을 필

요로 한다. 그러나 금속이온은 유기물질과 다르게 생체내에서 합성되지 않고 환경에서 획득하여야 한다<sup>2)</sup>. 이중 철은 토양환경에서는 풍부하지만 수계 환경이나 생체내에서는 제한되어 있다. 따라서

접수 : 1999년 10월 6일, 게재결정 : 1999년 12월 27일

Corresponding author: 주진우, 부산시 금정구 장전동 부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Tel: 051-510-1773, Fax: 051-514-1778

이 논문은 1998년도 부산대학교 기초과학연구소 학술연구조성비 (기성희비) 지원에 의하여 연구 수행되었음 (RIBS-PNU-98-403).

생장에 필수적이면서 이처럼 낮은 농도로 존재하는 철의 흡수를 쉽게 하기 위해 많은 미생물들은 철에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 합성하여 세포외로 분비한다<sup>3)</sup>. 이들은 이 물질에 결합된 철을 선택적으로 흡수하여 철의 결핍현상을 극복한다<sup>15)</sup>. 미생물이 철의 chelator로 생산하는 물질을 총칭하여 siderophore라 한다. siderophore는 그 화학적 구조가 다양하나 대체로 catecholamide<sup>13)</sup>과 hydroxamate<sup>28)</sup> 형태이며 이것을 기준으로 siderophore를 분류한다<sup>14,21)</sup>. catecholamide로는 *Escherichia coli*로부터 분리된 enterobactin<sup>33,35)</sup>과 *Paracoccus denitrificans*으로부터 분리된 parabactin, 그리고 *V. anguillarum*에서 분리된 anguibactin<sup>1,22)</sup>이 있으며 hydroxamate로는 다양한 장내세균에서 분리되는 aerobactin, fungi에서 분리되는 coprogen, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Ustilago*에서 분리되는 ferriochrome, *Arthrobacter spp*에서 분리되는 terregen factor가 있다. 대부분 미생물중에서는 한 종류의 siderophore를 생산하기도 하지만 Shelley<sup>26,27)</sup> 등은 *Shigella flexneri*에서 두 종류 모두를 생산한다고 보고하기도 하였다<sup>13,9)</sup>.

Siderophore는 호기상태에서 철이온과 효과적으로 결합하여 siderophore-Fe<sup>3+</sup> 복합체를 형성하므로, siderophore를 합성하는 미생물은 이 결합체를 흡수하지 못하는 미생물의 성장을 억제할 수 있다. 이러한 성질을 이용하여 siderophore를 생산하는 세균을 식물 병원균의 길항균으로 사용한다. 또한 숙주조직내에서는 철이 transferrin과 결합되어 있어 미생물이 침입하더라도 자유롭게 철을 이용할 수가 없다<sup>24)</sup>. 이러한 환경에서 siderophore가 효과적으로 철을 chelating하여 철이 부족한 상태에서 미생물의 성장을 가능하게 한다<sup>8,29,25)</sup>. 본 연구에서는 여름철 질환에 관계된 *Vibrio mimicus*를 이용하여 실험을 수행하였다. 이 균은 *Vibrio*의 한 종으로써 전형적인 콧마형의 간균으로 편모를 가지고 있으며 요리되지 않은 해산물, 특히 생굴을 섭취한 후에 발생하는 설사와 관계되어 있다. *V. mimicus*는 해양에 위치한 나라들에서 광범위하게 분포되어 있다<sup>10)</sup>. 굴, 새우 그리고 해안에서의 분포를 살펴보면 생태학적 성상이 이미 잘 연구되어 있는 *Vibrio cholerae* non-O1과 유사하다는 것을 나타낸다<sup>31)</sup>.

본 연구에서는 *V. cholerae*와 유사한 *V. mimicus* ATCC 33653에서 siderophore를 분리, 정제하여 균의 성장과 병원성에 미치는 영향을 관찰하였다.

특별히 숙주의 환경이 유리 철이온 농도가 낮은 것을 고려하여 철 결핍상태에서 균을 배양하여 생산되는 siderophore를 정제하여 그 특성을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 균주

*Vibrio mimicus* ATCC 33653 균주 (이하 *V. mimicus*라 칭함)를 일본 국립예방위생연구소의 T. Shimada 박사로부터 분양받아 사용하였다.

### 2. 사용 배지

전배양과 본배양시에는 0.5% NaCl를 가한 brain heart infusion (이하 BHI로 약함) 액체배지를 사용하였고, 특히 철을 제한시키고자 할 때 EDDHA (100 µg/µl)을 첨가하였다. siderophore 검출에는 CAS (chrome azurol S) agar를 사용하였다.

### 3. 균의 배양과 siderophore 생산 측정

#### (1) 철제한에 따른 균의 성장률 비교

철제한 물질인 EDDHA (100 µg/ml)를 첨가한 BHI 배지와 EDDHA를 첨가하지 않은 BHI 배지 100 ml에 전배양한 배양액 (OD<sub>660</sub>=0.7)을 1%를 접종한 후 37℃에서 진탕배양하면서 성장속도를 OD<sub>660</sub>에서 관찰하였다. 사용한 초자기 기구는 외부로부터 철의 유입을 막기 위해 6 N HCl에 하룻밤 담귀 둔 후 3차 증류수에 10번 정도 씻어 사용하였다.

#### (2) Siderophore 생산 측정

전배양한 균체를 생리식염수에 잘 씻은 후 disc paper에 묻혀 CAS 한천배지에 놓고 하룻밤 배양하였다. 균체를 제거한 배양액 0.5 ml은 동량의 CAS 용액에 섞어 6시간 이내에 색 변화를 관찰하였다<sup>5,34)</sup>.

### 4. Siderophore 정제<sup>12)</sup>

#### (1) 배양 조건

0.5% NaCl을 첨가한 BHI 액체배지 1,000 ml에 철제한 물질인 EDDHA (100 µg/ml)을 첨가하여 고압멸균한 다음 37℃에서 하룻밤 진탕배양하였다. 진탕배양 후 이 배양액을 4℃, 6,000 rpm으로 20분간 냉각 원심분리하여 상등액만을 회수하였다.

(2) Siderophore 추출

회수된 상등액을 0.2 μm (pore size) 여과지로 여과한 후 여과액을 동결건조하여 10배로 농축하였다. 농축한 여과액에 CHCl<sub>3</sub>-phenol (1:1, wt/wt)을 1/2 넣은 후 10분간 잘 흔든 다음 5,000 rpm에 10분간 원심분리하였다. 위의 수층을 버리고 다시 CHCl<sub>3</sub>-phenol을 넣어 3번 반복하였다. CHCl<sub>3</sub>-phenol 층에 5배의 ethyl ether를 넣어 잘 흔든 다음 1배의 3차 증류수를 넣어 잘 흔들었다. 이렇게 하여 생긴 위의 유기층을 버리고 ethyl ether를 넣어 3번 씻었다. 마지막으로 동결건조하여 최종 5 ml의 추출액을 얻었다.

(3) 이온교환 크로마토그래피

추출한 siderophore를 pH 7로 맞춘 다음 Dowex 1×8 (Cl<sup>-</sup>, 3×20 cm) 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다.

3차 증류수로 평형화된 컬럼에 siderophore를 흡착시킨 후 다시 3차 증류수로 비흡착 siderophore를 용출시킨 다음 0.2 M NH<sub>4</sub>Cl로 흡착된 siderophore를 용출시켰다. 이때의 유속은 분당 6 ml로 하였으며 1개의 분획은 4 ml로 하였다. 각 분획의 0.5 ml에 0.1 M perchloric acid에 10 mM ferric perchlorate을 녹인 용액 0.5 ml과 섞어 OD<sub>495</sub>에서 측

정하였다. Siderophore가 들어있는 부위를 모아 동결건조하였다.

(4) 겔여과 크로마토그래피

동결건조된 것을 소량의 3차 증류수에 녹인 다음 Sephadex G-25 (2×70 cm) 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 컬럼은 3차 증류수로 용출시켰으며 각 분획을 이온교환 크로마토그래피와 동일한 방법으로 OD<sub>495</sub>에서 측정하였다. Siderophore가 들어있는 부위를 모아 동결건조하여 하얀색 분말을 얻었다.

5. 정제된 siderophore 순도 확인

(1) 종이 크로마토그래피

정제된 siderophore를 Whatman No. 2 paper에 점적한 후 *n*-butanol : acetic acid : water (60 : 15 : 25) 용액으로 전개시켰다. 전개가 끝난 후 잘 말려 오드 증기로 발색시켰다.

(2) Liquid chromatography

정제된 siderophore는 HPLC에 의해 정량 확인하였다. 조건은 μBondapakTM C<sub>18</sub>, 용매는 증류수를 사용하였고, 유속은 0.5 ml/min으로 하였으며 검출기는 자외선 검출기를 사용하였다.

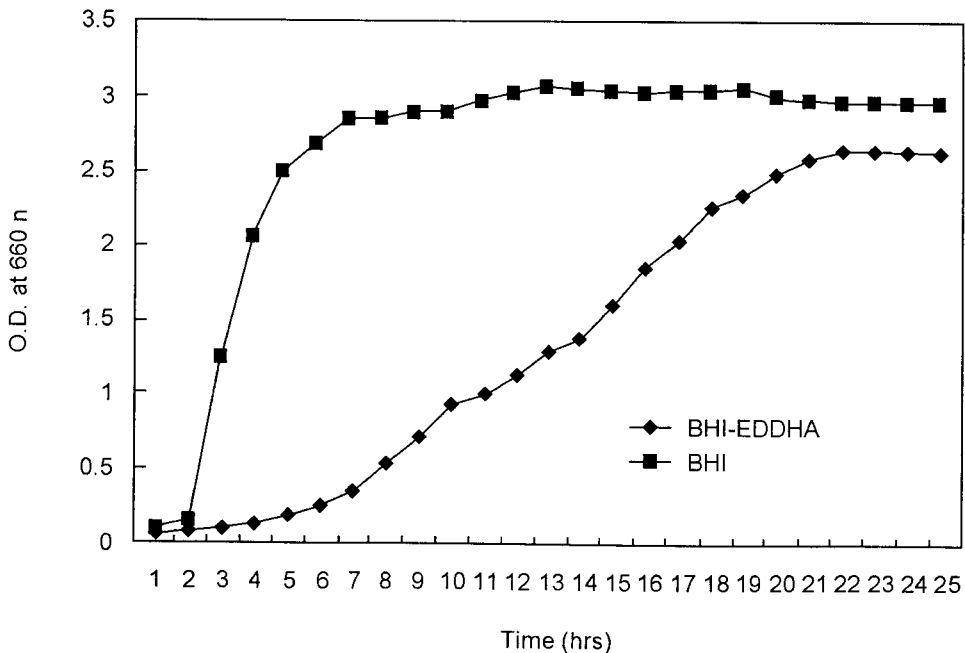


Figure 1. Growth curve of *V. mimicus*. ■ : *V. mimicus* grown in BHI media, ◆ : *V. mimicus* grown in BHI-EDDHA media.

## 6. 균의 성장능 촉진 실험

0.5% NaCl를 가한 BHI에 철제한 물질인 EDDHA (100 µg/ml)를 넣어 멸균한 후 이것이 균기 전 잘 씻은 *V. mimicus*를 OD<sub>660</sub>=0.5로 맞춰 넣어서 균했다. 그리고 siderophore을 생리식염수에 ml당 0, 3, 30, 100 mg을 녹여 원판을 적신 후 배지 위에 둔 후 37°C에서 24시간 배양하였다.

## 7. 병원성 실험

Siderophore (3 mg), *V. mimicus* (OD<sub>660</sub>=1.0) 균 자체, siderophore (3 mg/ml)가 첨가된 *V. mimicus* 그리고 대조군으로 생리식염수를 마우스의 복강에 각각 1 ml씩 주사한 후 치사시간을 기록하였다. 각 군마다 5마리의 5주된 BALB/c 마우스를 사용하였다

## 8. 세포독성 검사

### (1) 세포배양

HeLa, U937 세포를 10% 소태아 혈청이 든 Minimum Essential Medium을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기 내에서 적당히 배양한 후 배지를 제거하고 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>가 들어있지 않은 PBS로 두번 씻은 다음, 약 2 ml의 Trypsin-Versin 용액으로 처리한 후 세포를 회수하여 혈구 계산판으로 세포수를 계산하여 2×10<sup>4</sup>/ml의 세포를 well당 100 µl씩 96 well microculture plate에 분주하였다.

분주한 세포들은 18~24시간 배양시켜 siderophore를 계산회석하여 처리한 후, 24시간 반응시킨 다음, MTT assay를 실시하였다.

### (2) MTT assay

MTT를 PBS에 5 mg/ml의 농도가 되도록 녹여 무균적으로 여과하여 4°C의 어두운 곳에 보관하였다. 보관된지 3주 이내의 것을 검사에 사용하였다.

배양된 세포와 siderophore가 들어있는 microtiter plate의 각 웰에 상층의 배지를 조심스럽게 100 µl씩 제거하였다 신선한 RPMI 1640 배지로 5 mg/ml의 MTT 보관액을 10배로 희석한 용액 0.5 ml/ml을 각 웰에 100 µl씩 첨가하고 이때 siderophore를 가지지 않은 대조군에도 MTT 희석액을 가하였다.

37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 4시간 배양 후, 상층의 배지를 조심스럽게 제거하고, 세포손실을 막기 위해 약 30 µl 정도는 남겼다. 각 well에 100 µl dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가한 후 실온에서 plate

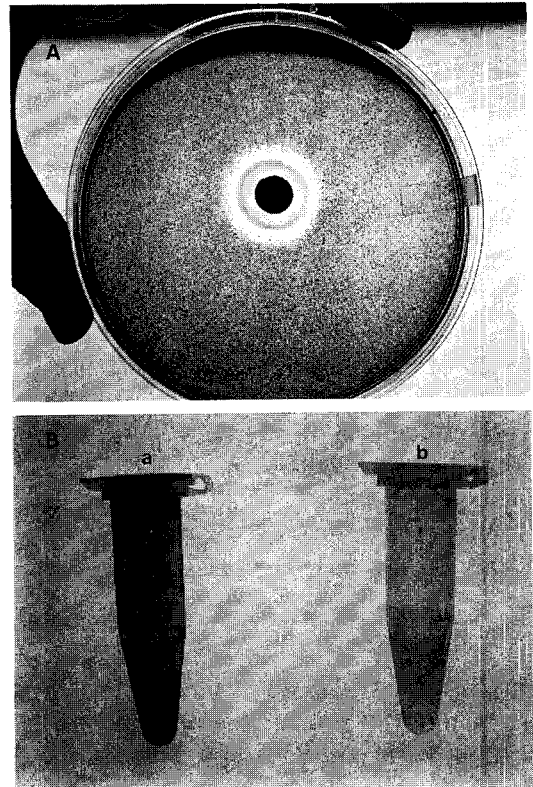


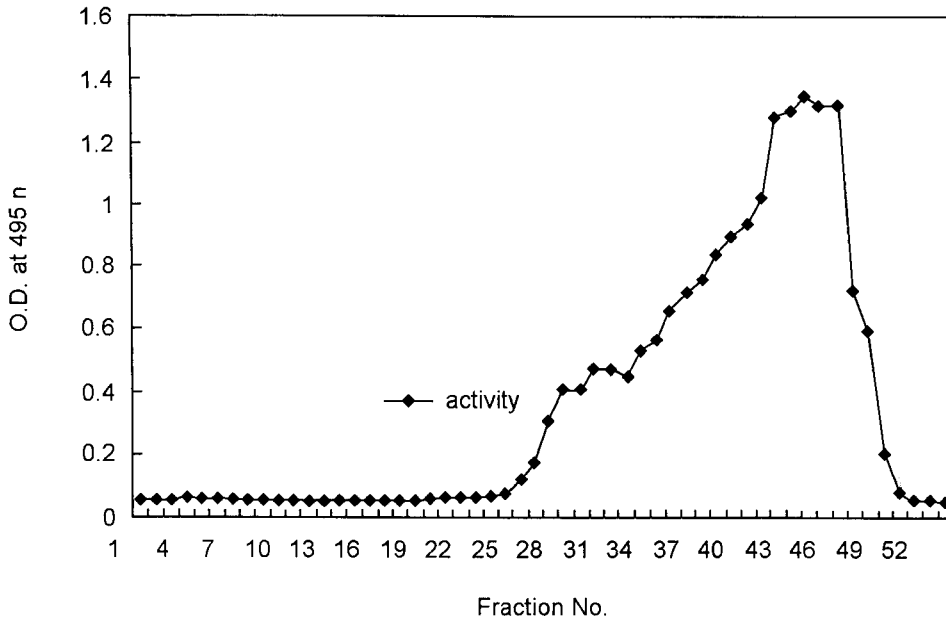
Figure 2. Detection of siderophore production of *V. mimicus*. A, CAS agar; B, CAS solution; a, saline; b, supernatant.

shaker로 각 20~30분간 흔들어 준 뒤 효소면역측정용 판독기로 570 nm와 650 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 siderophore를 함유하지 않은 웰을 대조군으로 하고 650 nm는 비교치로서, 570 nm 측정치에서 650 nm 측정치를 감하여서 이 값을 결과치로 사용하였다. siderophore의 각 회석배수에 있어서의 측정치로서 그래프를 작성한 뒤, 대조군에 비하여 50%의 생존율을 나타내는 농도인 IC<sub>50</sub>을 산출하여 세포독성을 비교하였다.

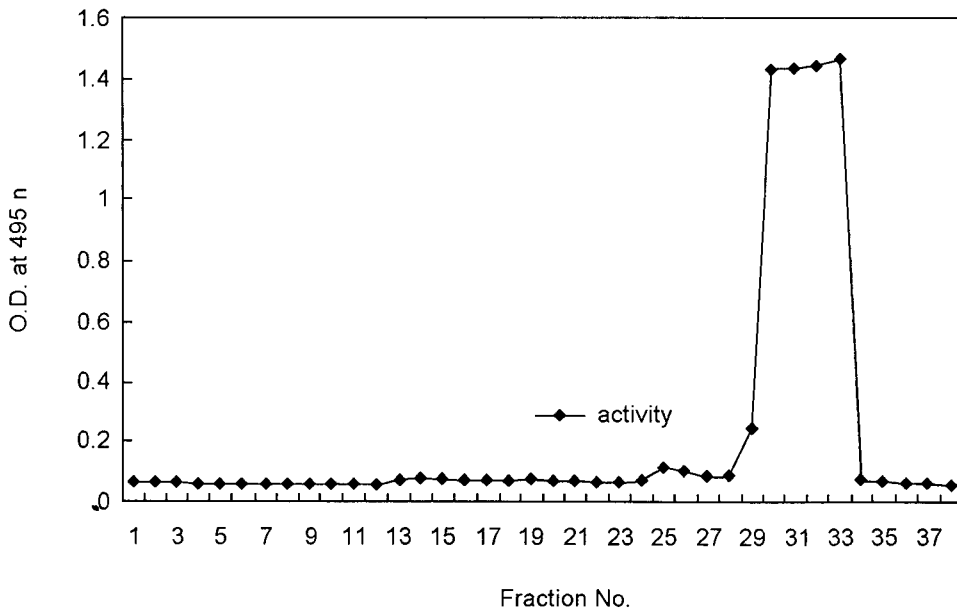
## 결 과

### 1. 균의 성장속도의 비교

정상의 배지에서 성장하였을 때는 1시간의 유도기를 거쳐 6시간만에 정지기에 도달한 것에 비해 EDDHA를 사용하여 철을 제한시킨 배지의 경우에는 6시간의 유도기를 거쳐 20시간 이후에 정지기에 도달하였다. 전체적으로 철이 제한된 조건에서 균을 성장시켰을 때 성장률이 현저히 떨



**Figure 3.** Elution profile of ion-exchange chromatography. Concentrated preparation (10 ml) was charged on a column (3 × 20 cm) of Dowex which had been equilibrated with deionized water. Elution was carried out by the application of 0.2 M NaCl. ◆, siderophore activity

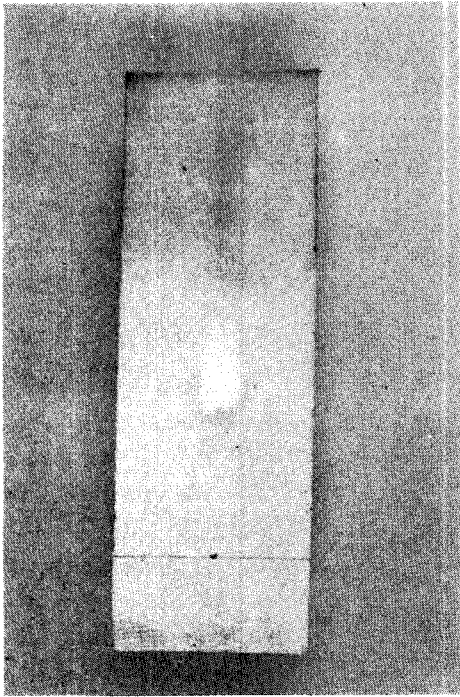


**Figure 4.** Elution profile of sephadex G-25 gel filtration. Three milli liter of concentrated siderophore solution were applied onto a column equilibrated with deionized water column (size, 2 × 70 cm; flow rate, 12 min/ml).

어지는 것을 알 수 있었다. 따라서 철이 균의 성장에 중요한 인자임을 알 수 있었다 (Fig. 1).

## 2. Siderophore 생산 측정

CAS assay<sup>19)</sup>를 실시하면 siderophore 존재시 배지색이 푸른색에서 오렌지색으로 변하므로 이 색



**Figure 5.** Paper chromatogram of the purified siderophore of *V. mimicus*. Solvent system is *n*-butanol : acetic acid : water (60 : 15 : 25)

의 변화로써 siderophore 생성 유무를 관찰할 수 있었다.

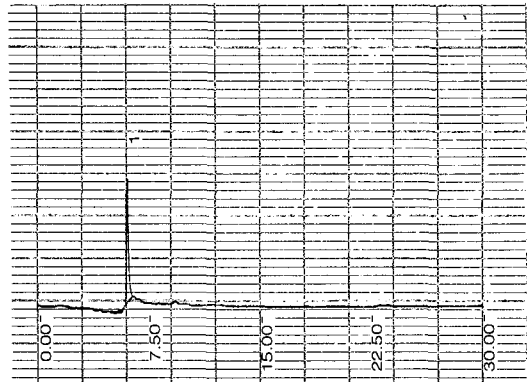
먼저 원판에 균을 묻혀 CAS 한천배지에 성장시켰을 때 6시간만에 균 주위로 오렌지색의 띠가 형성되기 시작하여 시간이 지나면서 점점 띠의 크기가 커졌다. 이것이 외부로 분비되는 물질임을 확인하기 위해서 균을 배양한 상등액을 CAS 용액과 동량 섞어 색 변화를 관찰하였다. 색이 오렌지색으로 변하는 것을 보아 이 물질은 세균외로 분비되는 물질임을 알 수 있었다 (Fig. 2).

### 3. Siderophore 정제

#### (1) 이온교환 크로마토그래피

배양 상등액으로부터 siderophore를 추출하여 이온교환 크로마토그래피를 행하였다. 받은 분획을 perchloric acid 용액으로 반응시켰을 때 철과 반응하는 물질이 있는 분획은 색이 적갈색으로 변하였으며 OD<sub>495</sub>로 측정하였을 때는 26에서 50번째의 분획까지 활성이 있는 것을 알 수 있었다. 철과 반응성 있는 부분만을 모아 동결건조를 행하였으며 이때 하얀색 분말을 얻을 수 있었다 (Fig. 3).

List		
ATTENUATION		32
CHART	FEED	5.00
END	TIME	30.00
MINIMUM	AREA	5000
MINIMUM	HEIGHT	500
MINIMUM	WIDTH	0.100
DOUBLE PEAK	WIDTH	10.000
CALCULATION	METHOD	00



No	NAME	RT	A	OR	H	MK	CON.
1		6.095	43577				100.0000
TOTAL			43577				100.0000

**Figure 6.** High performance liquid chromatography (HPLC) of the purified siderophore

#### (2) 겔여과 크로마토그래피

이온교환 크로마토그래피에서 얻은 하얀색 분말을 소량의 물에 녹여 사용하였다. 받은 분획을 동일한 방법으로 검출하였다. 그 결과 단일의 피크를 얻을 수 있었으며 이 부분을 동결건조 하였을 때 하얀색 분말을 얻을 수 있었다. 얻은 분말은 -20℃ 저장하였다 (Fig. 4).

### 4. Siderophore 정제 확인

#### (1) 종이 크로마토그래피

요오드 증기로 발색시켰을 때 단일의 연보라색 반점이 나타났다 (Fig. 5)

#### (2) HPLC

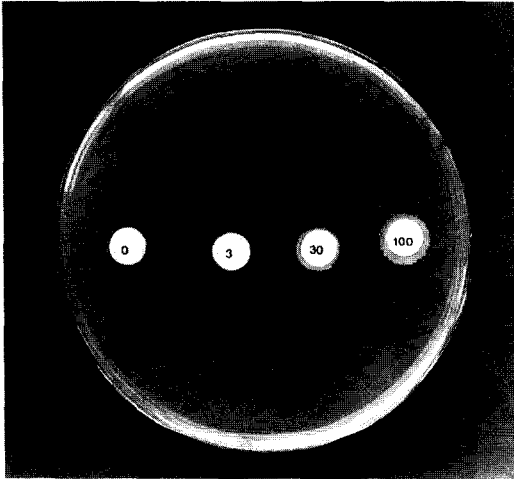
정제된 siderophore는 HPLC에 의해 확인되었다.

HPLC에 의해 분석한 결과 단일의 피크가 나타났으며 이것으로 순수하게 siderophore가 정제되었음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

**Table 1.** Toxicity of siderophore to BALB/c mice

	Siderophore	Siderophore + <i>V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i>	Saline*
After 3 hrs	<sup>a)</sup> 5 / <sup>b)</sup> 0 <sup>c)</sup> / 5 <sup>c)</sup>	0 / 5 / 5	5 / 0 / 5	5 / 0 / 5
After 9 hrs	5 / 0 / 5	0 / 5 / 5	0 / 5 / 5	5 / 0 / 5

\*, negative control; a), number of alive mice; b), number of dead mice; c), number of total mice.



**Figure 7.** Growth enrichment study of siderophore. Siderophore concentration is 0, 3, 30 and 100 mg/ml.

5. 균의 성장능 촉진 실험

Siderophore가 균의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알기 위하여 실시한 실험으로 siderophore를 농도별로 적신 원판 주위로 *V. mimicus*가 성장하였다. 3, 30, 100 mg으로 농도가 증가할수록 원판 주위의 균 성장능이 높음을 알 수 있었다 (Fig. 7).

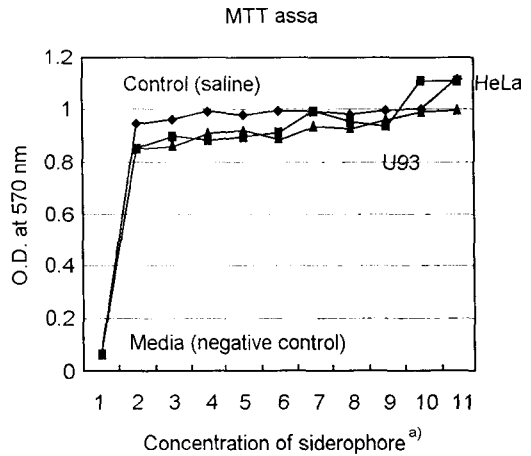
6. 병원성 실험

균체만을 주입한 경우는 마우스가 약 9시간 후에 죽었으며 siderophore과 같이 주입한 경우에는 그보다 훨씬 짧은 3시간 후에 죽었다. 그러나 siderophore만을 주입한 경우에는 마우스가 죽지 않고 살아있었다 (Table 1).

7. 세포독성 실험

정제한 siderophore의 자체 독성 여부를 확인하기 위해서 실시하였다.

세포주로는 HeLa, U937 cell을 이용하였는데, 실험 결과 세포독성이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 8).



**Figure 8.** Cytotoxic assay of purified siderophore form *V. vmimicus*. Cytotoxicity was measured by MTT assay of which initial concentration was 30 µg/well.; a), Two fold dilution from initial concentration (30 µg/well); ◆, saline; ■, HeLa cell; ▲, U937 cell.

고 찰

병원성 *Vibrio spp*에서 추정되는 병원성 인자들은 cholera toxins (CT), CT-related enterotoxins, *E. coli* heat stable enterotoxin (ST)-like toxins, protease, phospholipase, hemolysin, siderophore 등 여러가지가 있으며 이 가운데 siderophore는 미생물의 성장에 필수적인 철의 흡수와 연관되어 있다.

포유동물내에서는 혈청내 철이 transferrin에 결합되어 있어 미생물은 철을 사용할 수 없게 된다<sup>19,18</sup>. Hepatic disease와 hemochromatosis를 앓고 있는 사람의 혈액 철 농도는 정상인보다 높은 수준이다. 이 사람들에게 폐혈증이나 균혈증의 발병률이 높은 것으로 보아 철은 숙주내에서 미생물 성장에 필수적이므로 숙주로부터 철을 획득하는 능력이 균의 병원성을 높인다고 할 수 있다<sup>14,21</sup>. 이런 측면에서 보았을 때 철은 *V. mimicus*가 감염

을 일으키는데 중요한 역할을 한다고 할 수 있다<sup>30)</sup>.

철이 결핍된 환경에서 미생물은 철을 획득하기 위해서 저분자량의 chelator, 즉 siderophore를 생산하고 여기에 철을 결합시켜 막결합 수송계를 통해 안으로 들어온 다음 다시 이 혼합체에서 철만을 획득한다<sup>6,7,23)</sup>. Siderophore를 생산하는 미생물은 철이 제한된 조건에서 철과 결합된 siderophore의 흡수를 용이하게 하기 위해 외막내에 siderophore 수용체 단백질을 생산한다<sup>17)</sup>. Janice<sup>16)</sup> 등은 *V. cholerae*가 철이 결핍된 조건에 반응하여 vibriobactin과 몇몇 외막단백질을 생산하는데 이중 74 kDa의 vibriobactin에 대한 수용체로 제공된다고 보고하였다.

철이 제한된 환경에서 *V. mimicus*를 성장시켰을 때 정상적인 조건에서 성장한 경우보다 유도기도 길어졌으며 전반적으로 생육이 느려졌다. 따라서 철이 미생물 생육에 중요한 요소이며 6시간 이후에 서서히 균이 증식하는 것으로 보아 균을 접종하고 6시간 이후에 siderophore가 합성됨을 알 수 있었다. 이것은 철이 첨가되지 않은 선택배지인 M9에서 균을 성장시켜 CAS assay를 실시한 결과 6시간 이후에 배지색이 푸른색에서 오렌지색으로 변하는 것을 보고 추론할 수 있었다. 즉 siderophore가 합성되기 시작하면서 균이 성장하기 시작하였으며 정지기가 되면서 축적되는 것을 알 수 있었다.

*V. mimicus*에서 정제한 siderophore를 균과 섞어 배양하였을 때 균의 성장능이 촉진되었는데 siderophore의 양이 많을수록 성장이 촉진되는 것을 볼 수 있었다.

이러한 시험관 실험을 거쳐 생체 실험에서도 siderophore가 *V. mimicus*의 생육을 촉진시키는 것을 알아보기 위해 siderophore를 균과 섞어 마우스의 복강에 주입하여 치사시간을 알아보았다. 이때 대조군으로써 *V. mimicus*만을 복강에 주입하여 얻은 9시간의 치사시간보다 훨씬 짧은 3시간의 치사시간을 얻을 수 있었다.

Siderophore 자체의 독성 유무를 알아보기 위해서 동일하게 siderophore만을 복강에 주입하였을 때 마우스가 죽지 않고 살아 있었으며 어떠한 조직학적 변화도 관찰되지 않았다. 또한 사용한 He-La, U937 세포주에서도 아무런 영향을 나타내지 않는 것으로 보아 siderophore 자체는 독성이 없으면서 균의 생육만을 촉진시킴으로써 병원성을 유발한다는 것을 알 수 있었다.

이상에서 *V. mimicus*가 생산하는 siderophore는 균이 철이 제한된 환경에 노출되었을 때 균의 생존을 위해 생산되며, 이 siderophore가 균의 독성을 도와주지만, 이것 자체로는 독성이 없는 것을 알 수 있었다. 유리 철이 제한되는 인간의 몸속과 같은 환경은 균들에게는 스트레스로 작용되며, 이에 적응을 위해 siderophore가 생산되는 것으로 조심스럽게 생각된다. 그러므로 사람에게는 치명적인 독성인자로 작용하지만, 실상은 균의 생존을 위한 환경적응 반응(stress response)인 것이다. 이러한 균의 적응반응은 복잡하고, 단계적으로 연결된 일련의 반응들이 관계하는 것으로 알려져 있다.

## 결 론

*Vibrio mimicus* ATCC 33653을 이용하여 철이 제한된 조건에서 생성되는 siderophore를 정제하고 이것이 균의 생육과 병원성이 미치는 영향을 조사하였다.

철이 제한된 조건에서의 성장속도를 정상에서와 비교하였을 때는 유도기가 길어지면서 전반적으로 균의 성장속도가 낮았다. 따라서 철은 균의 성장에 필수적인 요소임을 알 수 있었다. 이때 siderophore 생성 유무를 확인하기 위해서 CAS assay를 행하였는데 용액의 색이 푸른색에서 오렌지색으로 변하는 것으로 보아 이 균이 siderophore를 합성, 분비하는 것을 확인할 수 있었다.

*Vibrio mimicus* ATCC 33653의 siderophore를 Dowex ion-exchange chromatography와 Sphadex G-25 gel filtration을 통해 정제하였다. 정제된 siderophore가 균의 생육에 어떠한 영향을 미치며 병원성에 어떠한 연관이 있는지를 확인하기 위해 실험을 행하였다. 즉 siderophore를 균과 같이 섞어 배양하였을 때는 균의 성장이 촉진되었으며, 이러한 혼합액을 마우스에 주입하였을 때는 마우스의 치사시간이 훨씬 단축됨을 알 수 있었다. 세포독성 실험을 행하였을 때는 siderophore 자체는 아무런 독성을 나타내지 않았다. 이것으로 보아 siderophore 자체는 독성이 없으나 균의 생육을 촉진시킴으로써 균의 병원성을 유발한다고 볼 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Albrecht bindereif, Volkmar Braun, Klaus Ha-



- ntke: The Cloacin receptor of ColV-bearing *Escherichia coli* is part of the Fe<sup>3+</sup>-aerobactin transport system. *J bacteriol* **150**: 1472-1474, 1982.
- 2) Anita C. Wright, Linda M. Simpson, James D. Oliver: Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect Immun* **24**: 503-507, 1981.
  - 3) Anne BaGG, Neiland JB: Molecular Mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol reviews* **51**: 509-528, 1987.
  - 4) Bernhard Schwyn, Neilands JB: Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analyt biochem* **160**: 47-56, 1987.
  - 5) Bianca colonna, Lorella Ranucci, Piera assunta Fradiani, Mariassunta Casalino, Attilio Calconi, Mauro Nicoletti: Organization of aerobactin, hemolysin, and antibacterial resistance genes in lactose-negative *Escherichia coli* strains of serotype O4 isolated from children with diarrhea. *Infect Immun* **60**: 6224-6231, 1992.
  - 6) Camille Filip, Gail Fletcher, Judith L. Wulff, Earhart CF: Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J bacteriol* **115**: 712-722, 1973.
  - 7) Carmen V. Sciortino, Richard A. Finkelstein: *Vibrio cholerae* expresses iron-regulated outer membrane proteins in vivo. *Infect Immun* **42**: 990-996, 1983.
  - 8) Carol A. Ishimaru, Joyce E. Loper: High-affinity iron uptake systems present in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* include the hydroxamate siderophore aerobactin. *J bacteriol* **174**: 2993-3003, 1992.
  - 9) Clement Bordier: Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution. *J Biochem* **256**: 1604-1607, 1981.
  - 10) Davis BR. Fanning R, Madden JM: Characterization of biochemistry atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Clin Microbiol* **14**: 631-639, 1981.
  - 11) Gerda J. Van Tiel-menkveld, Joke M. Mentjox-Vervuurt. Bauke Oudega, Frits K. De Graaf: Siderophore production by *enterobacter cloacae* and a common receptor protein for the uptake of aerobactin and cloactin DF13. *J bacteriol* **150**: 490-497, 1982.
  - 12) Gillam AH, Lewis AG, Andersen RJ: Quantitative determination of hydroxamic acids. *Analyt chem* **53**: 841-844, 1981.
  - 13) Henry J. Rogers: Iron-binding catechols and virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **7**: 445-456, 1973.
  - 14) Ian D. Hirst, Trevor S. Hastings, Anthony E. Ellis: Siderophore production by *Aeromonas salmonicida*. *J general microbiol* **137**: 1185-1192, 1991.
  - 15) Neilands JB: Microbial envelope proteins related to iron. *Ann Rev* **36**: 285-309, 1982.
  - 16) Janice A. Stoebner, Joan F. Butterson, Stephen B. Calderwood, Shelley M. Payne: Identification of the vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*. *J bacteriol* **174**: 3270-3274, 1992.
  - 17) Jorge H. Crosa, Linda L. Hodges: Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infect Immun* **31**: 223-227, 1981.
  - 18) Krystyna Konopka, Binderief A, Neilands JB: Aerobactin-mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry* **21**: 6503-6508, 1982.
  - 19) Krystyna Konopka, Neilands JB: Effect of serum albumin in siderophore-mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry* **23**: 2122-2127, 1984.
  - 20) Lawrence L. Stookey: Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. *Analyt chem* **42**: 779-782, 1970.
  - 21) Linda M. Simpson, James D. Oliver: Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **41**: 644-649, 1983.
  - 22) Marcelo E. Tolmasky, Patricia C. Salinas, Luis A. Actis, Jorge H. Crosa: Increased production of the siderophore anguibactin mediated by pJM1-link plasmids in *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* **56**: 1608-1614, 1988.
  - 23) Michael Kuhn, Werner Goebel: Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* **1**: 55-61, 1989.
  - 24) Munirul alam, Shin-Ichi Miyoshi, Ken-Ichi Tomochika, Sumio shinoda: Purification and chara-

- cterization of novel hemagglutinins from *Vibrio mimicus*: a 39-Kilodalton major outer membrane protein and lipopolysaccharide. *Infect Immun* **64**: 4035-4041, 1996.
- 25) Sally A. Leong, Neilands JB: Siderophore production by phytopathogenic microbial species. *Arch Biochem Biophys* **218**: 351-359, 1982.
- 26) Shelley M. Payne, David W. Niesel, Sue S. Peixotto, Kathleen M. Lawlor: Expression of hydroxamate and phenolate siderophores by *Shigella flexneri*. *J bacteriol* **15**: 949-955, 1983.
- 27) Shelley M. Payne: Synthesis and Utilization of siderophores by *Shigella flexneri*. *J bacteriol* **143**: 1420-1424, 1980.
- 28) Simon J. Stuart, Kenneth T. Greenwood, Richard K. J. Luke: Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by ColV plasmids. *J bacteriol* **143**: 35-42, 1980.
- 29) Suzanne P. Sigel, shelley M. Payne: Effect of iron limitation on growth, siderophore production, and expression of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. *J bacteriol* **150**: 148-155, 1982.
- 30) T Ramamurthy, M. John Albert, Anwarul Huq, Rita R. Colwell, Yoshfumi takeda, Tae Takeda, Toshio shimada, Mandal BK, Nair GR: *Vibrio mimicus* with multiple toxin types isolated from human and environmental sources. *J Med Microbiol* **40**: 194-196, 1994.
- 31) Wayne X, Shandera MD: Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. *Annals of Interna Medicine* **99**: 169-171, 1983.
- 32) Wesley R. Harris, Carl J. Carrano, Kenneth N. Raymond: Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 16. isolation, characterization, and formation constants of ferric aerobactin. *Biochemistry* 1979.
- 33) William C. Hollifield Jr., Neilands JB: Ferric enterobacton transport system in *Escherichia coli* K-12. extraction, assay, and specificity of the outer membrane receptor. *Biochemistry* **17**: 1922-1928, 1978.
- 34) Yong Lim, Mi Young Lee, Sung Heui Shin, Nam Ung Yang, Shee Eun Lee, Joon Haeng Rhee, Yeul Park, Ik Sang Kim: Effect of iron limitation on the production of siderophore and hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *J Korean Soc Microbiol* **31**: 331-337, 1996.