

점액세균 *Myxococcus* sp. JW154로 부터 항균물질의 분리 및 식물병원균에 대한 *in vivo* 활성

안종웅* · 김병섭¹

한국화학연구원 화학물질부, ¹강릉대학교 식물응용과학과

Isolation and *in vivo* Activities of Antifungal Compounds from *Myxococcus* sp. JW154 (Myxobacteria). Jong-Woong Ahn*, and Byung-Sup Kim¹. *Bio-Organic Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea, ¹Department of Applied Plant Science, Kangnung National University, Gangnung 210-702, Korea* - Two bithiazole-type antibiotics were isolated from the culture broth of a *Myxococcus* species which isolated from the marine sediment off the coast of Cheju Island, Korea. The structures of these metabolites were determined as KR025 and melithiazole F, previously reported bithiazoles, using combined spectroscopic methods. Both compounds showed an antifungal activity. In *in vivo* tests, these compounds exhibited potent controlling activities against tomato late blight, wheat leaf rust, and barley powdery mildew with control values more than 80% at a concentration of 20 µg/ml.

Key words: *In vivo* antifungal activity, KR025, melithiazole F, *Myxococcus* sp., Myxobacteria

자연계에는 아직 잘 알려져 있지 않은 미생물이 많은데 그 중 하나로 점액세균을 들 수 있다. 점액세균은 그람음성의 활주세균(gliding bacteria)에 속하면서 포자와 자실체를 형성하는 등 세균류와 진균류의 특징을 모두 지닌 미생물로서 이들은 일정한 환경 하에서 영양세포가 모여들어 집합체를 이루어 점차 성숙함에 따라 육안으로도 확인할 수 있을 정도의 자실체로 발달하고, 그 내부에서는 모여 든 세포들이 점액성 포자(myxospore)로 변환하는 특이한 생활사를 이루고 있다[11]. 점액세균에 대한 연구는 1892년 Thaxter에 의해 처음 보고된 이래 1960년대에 비로소 McCurdy[4]를 중심으로 한 분리법 및 형태학을 중심으로 분류학적 연구가 이루어졌고 근래 독일을 비롯한 선진국에서 이들의 분리 및 배양 방법이 개발되면서 이 균에 대한 응용연구 및 대사산물에 대한 연구가 활발하게 되었다. 그 결과, 점액세균은 방선균에 필적하는 물질의 생합성 능력을 보유하고 있음이 밝혀졌고[8] 특히 셀룰로오스 용해성 점액세균인 *Sorangium cellulosum*의 대사산물로부터 taxol을 능가하는 항암제로 기대되고 있는 ephthalones가 최근 발견됨으로써[2,10] 점액세균은 그야말로 21세기 생리활성 물질의 새로운 source로 급부상되어, 현재 이들에 대한 산업적 응용연구가 선진 제약기업을 위주로 대단히 활발하게 진행되고 있는 상황이다. 또한 세균 및 곰팡이, 바이러스 등에 대한 활성물질의 생산도 보고되고 있는데 특히 점액세균의

용균작용에 착안한 새로운 항균물질의 탐색연구는 많은 신규물질을 탄생시키는 계기가 되었다[6]. 우리나라에서는 Ahn[1] 등이 국내 최초로 용균성 점액세균인 *Myxococcus fulvus*를 분리하고 그 대사산물로부터 신규 물질을 보고한 바가 있다.

본 연구는 이러한 점액세균의 독특한 용균작용에 주목하여, 이들로부터 주요 식물병원균에 대한 새로운 항균제 선도물질을 개발할 목적으로 먼저 항균활성 연구팀이 확립한 *in vivo* 활성 검정법을 이용하여 용균성 점액세균의 대사산물을 스크리닝 하던 중, 해양 퇴적물에서 분리한 균주 JW154가 식물 병원균에 대해 강한 항균활성 물질을 생산함을 발견하고 생산균주의 동정과 활성본체의 규명 및 *in vivo* 항균활성을 조사한 것이다.

재료 및 방법

시약

활성물질의 분리에 사용한 silica gel(230-400 mesh)은 Merck사에서, Sephadex LH-20 resin은 Pharmacia사로부터 구입하였다. Recycling preparative HPLC의 column으로 JAIGEL-1H (φ20×250 mm)를 사용하였으며, 용매는 HPLC 급을 사용하였다. 그 외의 모든 분리 조작에는 시약급 용매를 재 증류하여 사용하였으며 배양에 사용한 시약류는 Difco 사 제품과 기타 EP급 이상의 것을 사용하였다.

생산균주의 분리 및 배양

점액세균 JW154는 제주도 서귀포 소재의 해변에서 채취

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-7164, Fax. 82-42-860-7160

E-mail: jwahn@kriect.re.kr

한 해양 퇴적물로부터 *Rhodotorula rubra*를 먹이균으로 한 baiting method[12]로 분리하였으며, VY/2 agar배지[7] 상에서 계대하고, 균체증식을 위한 전배양과 물질생산을 위한 본배양은 modified SP배지 [galactose 0.1%, raffinose 0.1%, sucrose 0.1%, Casiton 0.25%, soluble starch 0.5%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, K₂HPO₄ 0.025%, sea water 10% (v/v), pH 7.0]를 이용하였다.

균주의 동정

생산균주인 JW154의 분류학적 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology의 분류 동정 및 참고문헌[12]의 시험항목을 기준으로 하였으며, 영양세포의 swarm 및 자실체의 형태는 쌍안 실체현미경(OLYMPUS SZ-11, OLYMPUS)과 광학현미경(ECLIPSE E600, NIKON)으로 관찰하였고, 포자의 형태 및 크기는 주사전자현미경(SEM, JSM-5410 LV, JEOL)으로 조사하였다.

추출 및 분리

생산균주인 JW154를 modified SP 배지에 접종하여 30°C에서 5일간 진탕 배양 후 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 얻었다. 균체를 acetone으로 추출한 후 농축하여 얻은 농축물을 silica gel에 흡착시켜 acetone:n-hexane=2:98~10:90을 전개용매로 하여 단계적으로 극성용매의 비율을 높이면서 silica gel column chromatography (φ3 × 30 cm)를 행하였다. 활성 분획물은 다시 CH₂Cl₂-MeOH (1:1)를 전개용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography (φ2 × 80 cm)한 후, 최종적으로 CH₂Cl₂을 용매제로 하여 JAIGEL-1H column을 장착한 recycling prep. HPLC(LC-908, JAI)로 정제하여 두 개의 순수한 활성물질을 얻었다.

기기분석

정제한 화합물 1과 2의 UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 Shimadzu UV 265 spectrophotometer로 측정하였고 IR spectrum의 측정은 Genesis II FTIR spectrometer로 하였다. 선광도는 AUTOPOL III automatic polarimeter로 측정하였으며, mass spectrum의 측정은 OPUS data system이 장착된 Micromass AutoSpec mass spectrometer로 하였다. COSY, ROESY, DEPT, HMBC 및 HSQC를 포함한 각종 NMR spectrum은 Varian사의 UNITY500 NMR spectrometer를 사용하였으며 내부 표준물질로는 tetramethyl silane(TMS)을, 측정용매로는 CDCl₃를 사용하였다.

화합물 1. colorless oil; [α]_D +152° (c 0.67, MeOH); UV(MeOH) λ_{max} nm (log ε): 231(4.69), 311(4.08); IR (KBr) ν_{max}: 3110, 1715, 1624, 1147, 1096 cm⁻¹; HREIMS m/z 502.1945 (calcd for C₂₆H₃₄N₂O₄S₂, 502.

1960); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.88 (1H, s), 7.10 (1H, s), 6.57 (1H, s), 6.41 (1H, dd, J=15.5, 8.1 Hz), 6.19 (1H, dd, J=15.3, 10.2 Hz), 6.03 (1H, dd, J=15.3, 10.2 Hz), 5.80 (1H, dd, J=15.1, 7.7 Hz), 5.69 (1H, dd, J=15.3, 7.0 Hz), 4.96 (1H, s), 4.19 (1H, m), 3.94 (1H, m), 3.81 (1H, t, J=8.4 Hz), 3.67 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.32 (3H, s), 2.32 (1H, m), 1.54 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.20 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.01 (6H, d, J=6.7 Hz).

화합물 2. colorless oil; [α]_D +166° (c 0.09, CHCl₃); UV(MeOH) λ_{max} nm (log ε): 226(4.79), 311(4.15); IR (KBr) ν_{max}: 3105, 1710, 1623, 1145, 1093 cm⁻¹; HREIMS m/z 470.1306 (calcd for C₂₄H₂₆N₂O₄S₂, 470.1334); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.88 (1H, s), 7.34~7.31 (4H, m), 7.30 (1H, m), 7.11 (1H, s), 6.58 (1H, d, J=15.6 Hz), 6.42 (1H, dd, J=15.6, 7.8 Hz), 4.96 (1H, s), 4.38 (2H, s), 4.17 (1H, m), 3.81 (1H, t, J=7.8 Hz), 3.66 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.33 (3H, s), 1.21 (3H, d, J=6.8 Hz).

항균활성 측정

순수 분리된 활성물질의 식물 병원균에 대한 *in vivo* 항균활성을 조사하기 위해 유묘검정법에 의한 벼 도열병(Rice blast) 및 벼 잎집무늬마름병(Rice sheath blight), 오이 잿빛곰팡이병(Cucumber grey mold), 토마토 역병(Tomato late blight), 밀 붉은녹병(Wheat leaf rust), 보리 흰가루병(Barley powdery mildew)에 대한 방제 효과를 다음과 같이 측정하였다. 벼 도열병 및 벼 잎집무늬마름병에 대한 항균활성을 측정하기 위해 먼저 2~3엽기의 낙동벼에 시험 물질을 살포하여 24시간 풍건 시킨 후 다음과 같이 병원균을 접종하였다. 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*)을 쌀겨 한천배지(Rice Polish 20 g, Dextrose 10 g, Agar 15 g, 증류수 1 l)에 형성시켜 그 분생포자를 멸균수로 일정 농도의 포자현탁액(10⁶ 포자/ml)을 만든 뒤 2~3엽기의 낙동벼에 흘러내릴 정도로 충분히 분무하여 균을 접종하였다. 벼 잎집무늬마름병은 적당한 양의 밀기울을 1 l 배양병에 넣고 멸균한 후 AG-1인 *Rhizoctonia solani*를 접종한 후 25°C 배양기에서 7일간 배양하였다. 이렇게 배양된 균사덩어리를 적당히 잘게 분쇄하여 낙동벼에 접종하였다. 접종된 벼는 습실상에서 암 상태로 24시간 놓아둔 뒤에 상대습도 80% 이상이며 온도가 26°C인 항온 항습실에 5일간 방치한 뒤 병반 면적을 무 처리구와 비교 조사하여 시험물질의 *in vivo* 항균활성을 측정하였다. 잿빛곰팡이병은 *Botrytis cinerea*를 감자 한천배지에 접종하여 25°C 항온기(암상태)에서 7일간 배양한 후 하루에 12시간씩 광/암을 교차하면서 다시 7일 동안 배양하여 포자를 형성시킨 후 그 포자를 potato-dextrose broth로 수확하여 혈구계를 사용하여 포자 농도를 10⁶ spore/ml로 만든 후, 미리 시험물질로 처리 된

오이(백다다기, 1엽기)에 분무 접종하였다. 접종된 오이 유묘는 20°C 습실상(상대습도 95% 이상)에 넣어 5일간 발병을 유도시킨 후 병반 면적율을 조사하였다. 토마토역병은 시험물질이 처리된 토마토(서광, 2엽기)에 V-8 juice agar 배지에 배양하여 형성시킨 병원균(*Phytophthora infestans*)의 유주자낭을 10^5 sporangia/ml의 포자 현탁액을 만들어 분무 접종하였다. 병균을 접종한 토마토 유묘는 20°C 습실상에서 48시간 습실 처리한 후 20°C 항온항습실(상대습도 95%이상)로 옮겨 3일간 발병 시킨후 병반 면적율을 조사하였다. 밀녹병은 병원균(*Puccinia recondita*)이 활물 기생균이므로 실험실에서 식물체에 직접 계대 배양하면서 밀 유묘에 형성된 하포자를 접종원으로 사용하였다. 활성을 조사하기 위해 일회용 포트(직경: 6.5 cm)에 5립씩의 밀종자(품종:조광)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 일엽기 밀 유묘에 먼저 시험물질을 처리하고 1일 동안 풍건시킨 후 포자현탁액(포자 0.67 g/l)을 분무 접종하였다. 접종된 밀 유묘는 20°C의 습실상에서 1일간 습실 처리 한 후에 상대습도가 70%인 20°C의 항온 항습실로 옮겨서 발병을 유도하고 접종한지 7일 후에 병반 면적율을 조사하였다. 보리 흰가루병도 병원균(*Erysiphe graminis*)이 활물 기생균이므로, 실험실에서 보리 유묘로 계대 배양하면서 보리 유묘에 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 즉 일회용 포트(직경: 6.5 cm)에 5립씩의 보리종자(품종: 동보리)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 일엽기 보리 유묘에 시험물질을 처리하고 1일 동안 풍건 시킨후 흰가루병 포자를 털어 접종하였다. 접종된 보리 유묘는 20~23°C, 상대습도 50% 정도의 항온항습실에 두어 7일간 발병 시킨후 병반 면적율을 조사하였다. 또한 대조약물로는 시험약물에서 강한 활성이 확인된 병원균에 대해 우수한 방제효과가 있는 시판 살균제인 Dimethomorph(동방아그로사)와 Flusilazole(Syngenta사)의 원제를 사용하여 비교 시험하였다.

결과 및 고찰

생산균주의 동정

균주 JW154는 타 세균의 균체를 용해하며 셀룰로오스를 이용하지 못하는 용균성 점액세균으로 Gram 염색결과 음성으로 판별되었으며, VY/2 평판배지 상에서 simple mound 형의 자실체를 형성하였다. 전자 현미경으로 그 형태학적 특성을 관찰한 결과 간균이며 myxospore는 크기가 1.5 μm 이하의 작은 구형으로 확인되었다(Fig. 1). 또한 각종 동정에 필요한 배양학적, 형태학적, 그리고 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology의 분류 동정 및 참고문헌[12]의 시험항목을 기준으로 하여 고찰한 결과 생산균주 JW154는 *Myxococcus*속의 점액세균으로 확인, 동정되었다(Table 1).

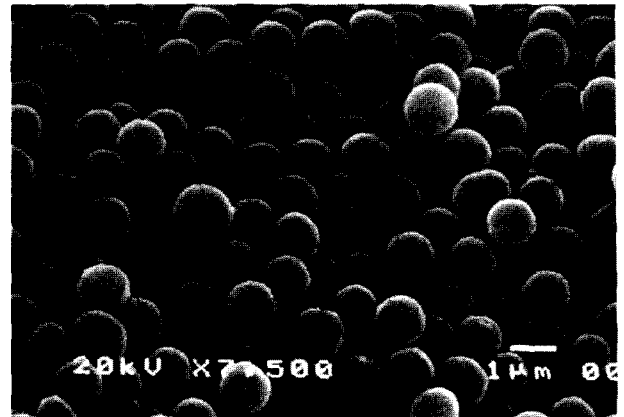


Fig. 1. Scanning electron micrograph of myxospores of *Myxococcus* sp. JW154.

Table 1. Basic biochemical and physiological properties of strain JW154.

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Temperature range for growth | 15-35°C |
| Optimum temperature for growth | 28-32°C |
| Gram staining | - |
| Fruiting bodies on VY/2 agar | |
| Deliquecent | + |
| Raised on a stalk | + |
| Myxospores | |
| Ellipsoidal to spherical | + |
| 1.5 μm or more in diameter | - |
| Enzyme activity of | |
| Catalase | + |
| Urease | + |
| Cellulase | - |
| Stained with Congo red | + |
| Greenish diffusible pigment on agar | - |
| Nitrate reduction | - |
| Starch hydrolysis | + |
| Degradation of microbial cell | + |

활성물질의 추출 및 분리

예비실험 결과 균체 추출물에 활성이 확인되었으므로 본 배양액(10 l)을 원심분리하여 균체를 모은 다음 acetone으로 3일간 실온에서 추출하였다. 활성을 보인 균체 추출물(980 mg)을 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 거쳐 최종적으로 recycling prep. HPLC로 정제한 결과 활성분체로서 화합물 1(16.1 mg)과 화합물 2(13.5 mg)를 순수한 액상으로 얻었다.

화학구조 동정

순수분리된 화합물 1과 2의 화학구조(Fig. 2)를 결정하기 위해 먼저 HREIMS와 ^{13}C NMR spectral data로부터 화합물 1의 분자식은 $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 로, 화합물 2는 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}$

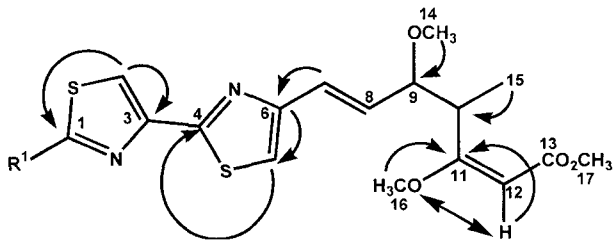


Fig. 2. Chemical structures of KR025 and melithiazole F
KR025: R¹= CH(CH₃)CH=CHCH=CHCH(CH₃)₂ **Melithiazole F:** R¹= CH₂C₆H₅ ↘:HMBC, ↔:ROE.

N₂O₄S₂로 각각 결정하였다. 분자내의 원소 N과 S의 존재 양식을 검토하는 과정에서 이들의 NMR 및 UV, IR 등의 spectral data가 myxothiazol[3]과 매우 유사하며 일치하는 부분이 많아 화합물 1과 2는 myxothiazol과 같이 분자내에 chromophore로써 bithiazole moiety를 지닌 동족체일 것으로 추정되었다. IR spectrum으로부터 각각 분자내에 α, β-unsaturated ester(1: ν 1715, 1147, 1096 cm⁻¹; 2: ν 1710, 1145, 1093 cm⁻¹)가 존재함을 알 수 있었으며, 이들의 ¹H 및 ¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC data의 해석과 myxothiazol과의 비교를 통하여 화합물 1과 2의 분자내에 bithiazole ring의 치환양식을 포함한 C1-C17의 부분구조가 확인되었다. 이를 근거로 문헌을 검색한 결과, 화합물 1은 저자 등에 의해 이미 보고된 KR025[1]와 일치하였고 화합물 2는 melithiazole F[9]와 일치하였다.

In vivo 항균활성

균주 JW154가 생산하는 항균활성의 본체로 분리된 KR025와 melithiazole F의 활성을 in vivo 유묘 검정으로 조사하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 KR025와 melithiazole F는 공시된 식물병원균에 대해 비슷한 세기의 항균활성과 작용양상을 보였다. 이들은 벼 도열병, 벼 잎집 무늬마름병, 오이 잿빛곰팡이병에 대하여는 모두 별 효과를 보이지 않았으나, 토마토 역병, 밀 녹병, 보리 흰가루병에 대하여는 우수한 방제효과를 나타내었다. 즉 KR025의 경

Table 2. Disease controlling activity of KR025 (1), melithiazole F (2), Dimethomorph (3) and Flusilazole (4) against six plant diseases.

| Plant disease | Control value (%) ^a | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------------|-----|----|-----|----|----|----|-----|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| | 20 ^b | 100 | 20 | 100 | 2 | 10 | 2 | 10 |
| Rice blast | 0 | 31 | 0 | 10 | | | | |
| Rice sheath blight | 0 | 35 | 0 | 29 | | | | |
| Cucumber grey mold | 13 | 51 | 0 | 35 | | | | |
| Tomato late blight | 82 | 94 | 88 | 96 | 25 | 78 | | |
| Wheat leaf rust | 92 | 98 | 93 | 100 | | | 73 | 100 |
| Barley powdery mildew | 93 | 98 | 93 | 100 | | | 95 | 100 |

^aControl value(%)=100 × (disease severity of untreated plants-disease severity of treated plants) × disease severity of untreated plants.

^bApplication rate (μg/ml).

우 20 μl/ml의 농도로 경엽 처리하였을 때 토마토 역병, 밀 녹병, 보리 흰가루병에 대한 방제효과는 82~93%이었으며 melithiazole F도 88~93%의 높은 방제 효과를 나타내었다.

KR025와 melithiazole F는 비록 동속의 점액세균으로부터 이미 분리, 보고된 바 있으나, 식물병원균에 대한 in vivo 활성은 본 연구에 의해 처음 밝혀졌으며, 이들은 구조적으로 볼 때 호흡 저해제로 잘 알려진 myxothiazol의 유도체로서 β-methoxyacrylate(MOA) 저해제에 속하여, 작용 기전이 cytochrom-bc1 complex(complex III)를 억제[5]하는 것으로 추정됨에 따라 기존의 호흡 저해제와는 다른 새로운 살균제의 선도물질로서 향후 연구가 기대된다.

요 약

제주도 서귀포의 해변에서 채집한 해양퇴적물로부터 *Myxococcus*속의 점액세균 JW154를 분리하여 그 대사산물로부터 강한 항균활성을 나타내는 두 개의 bithiazole계 화합물을 분리하고 각종 기기분석을 통하여 구조를 확인한 바, 이들은 각각 KR025와 melithiazole F로 보고된 화합물임을 밝혔다. 유묘 검정법으로 조사된 이 화합물의 주요 식물병원균에 대한 in vivo 항균활성은 토마토 역병과 밀 녹병 및 보리 흰가루병에 대해 높게 나타났는데, 20 μg/ml 수준으로 처리하였을 때 80% 이상의 높은 방제가를 보였다.

REFERENCES

- Ahn, J. -W., S. -H. Woo, C. -O. Lee, K. -Y. Cho., and B. S. Kim. 1999. KR025, a new cytotoxic compound from *Myxococcus fulvus*. *J. Nat. Prod.* **62**: 495-496.
- Cowden, C. J. and I. Paterson. 1997. Cancer drugs better than taxol? *Nature* **387**: 238-239.
- Gerth, K., H. Irschik, H. Reichenbach, and W. Trowitzsch. 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus*. *J. Antibiotics* **33**: 1474-1479.
- McCurdy, H. D. 1969. Studies on the taxonomy of the Myxobacteriales. *Canadian J. Microbiology* **15**: 1453-1461.
- Ojika, M., Y. Suzuki, A. Tsukamoto, Y. Sakagami, R. Fudou, T. Yoshimura, and S. Yamanaka. 1998. Cystothiazoles A and B, new bithiazole-type antibiotics from *Cystobacter fulvus*. *J. Antibiotics* **51**: 275-281.
- Reichenbach, H. and G. Hoefle. 1999. *Myxobacteria as producers of secondary metabolites*, pp. 149-179. In Grable, S. and R. Thiericke (eds.), *Drug discovery from nature*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1992. *The Myxobacteria*, pp. 3416-3487. In Balows, A., H. G. Truper, and M. Dworkin (eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed.), Springer Verlag, New York.
- Reichenbach, H., K. Gerth, H. Irschik, B. Kunze, and G. Hoefle. 1988. Myxobacteria: a source of new antibiotics. *TIBTECH* **6**: 115-121.

9. Sasse, F., B. Bohlendorf, M. Hermann, B. Kunze, E. Forche, H. Steinmetz, G. Hoefle, and H. Reichenbach. 1999. Melithiazoles, new β -methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from Myxobacteria. *J. Antibiotics* **52**: 721–729.
10. Wessjohann, L. 1997. Epothilones: Promising natural products with taxol-like activity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**: 715–718.
11. Yamanaka, S. 1989. Myxobacteria-Bacteria forming fruiting body. *Kagakutoseibutsu* **27**: 656–662.
12. Yamanaka, S., A. Kawaguchi, and K. Komagata. 1987. Isolation and identification of myxobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 247–265.

(Received Feb. 9, 2002/Accepted Mar. 25, 2002)