

분산 돌연변이 점액세균의 분리

이봉수 · 이차율 · 조경연*
호서대학교 생명과학과

Isolation of Dispersed Mutants from Wild Myxobacteria. Lee, Bongsoo, Chayul Lee, and Kyungyun Cho*. Section of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea – Clumping of cells is one of the major obstacles to culture wild myxobacterial strains in liquid media. In an effort to solve this problem, we tried a method isolating spontaneous mutants that grow dispersed in liquid media from a wild myxobacterial strain. *Myxococcus stipitatus* KYC1001, a newly isolated strain from Gyearyongsan National Park in Korea, clumps and sticks to the surface of culture vessels as other wild myxobacteria behave in liquid media. Taking an advantage of the characteristics that dispersed mutant cells would grow dispersed while most other wild type cells would clump and stick to the surface of culture vessels, spontaneous dispersed mutants were enriched by repeated subculturing of culture supernatant. A resultant mutant, KYC2001, did not form any clumps nor stick to the surface of culture flasks, but grew completely dispersed in liquid. Meanwhile, three other spontaneous mutants, KYC2002, KYC2003, and KYC2004, showed partially dispersed phenotype. A major portion of the cells grew dispersed in liquid but they still formed some clumps.

Key words: Myxobacteria, *Myxococcus stipitatus*, dispersed mutant

점액세균(myxobacteria)은 토양에 서식하는 그람음성 간균으로 활주운동에 의해 이동하며, 집단행동을 통해 다세포 자실체를 형성하는 등 다른 박테리아에서는 발견되지 않는 특이한 생활사를 보인다[6, 12, 24] 또, 점액세균은 많은 유용한 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져 있어 산업적인 측면에서도 관심의 대상이 되고 있다[1, 9, 13, 14]. 하지만 점액세균은 성장속도가 느리며, 배지조건이 까다롭고, 액체 배양시 세포들이 서로 응집하여 덩어리를 형성하거나 배양용기의 내부 표면에 부착함으로써 균주 조작 및 대량 배양에 여러 가지 장애를 가지고 있다. 즉, 배양하는 동안에 세포의 성장정도를 측정할 수 없으며, 세포의 회수 및 조작이 어렵고, 세포들이 서로 독립적으로 존재하지 않아 돌연변이 또는 형질전환 균주의 선별이 방해받게 된다. 점액세균 중 가장 연구가 많이 된 *Myxococcus xanthus*의 경우 1960년대에 분산되어 자라면서도 정상적으로 자실체를 형성하는 FB 균주가 얻어지면서 이러한 문제들이 해결되었고 *M. xanthus* 연구에 대한 획기적인 발전을 가져오게 하였다[5]. 오늘날에도 *M. xanthus*의 순수연구에 사용되는 균주는 대부분 FB 균주로부터 유래한 균주이다. 한편, 최근에는 여러 유용한 생리활성물질을 생산하는 유전자들이 야생점액세균으로부터 클로닝되었는데[20, 22], 이들 유전자들은 대부분 다른 박테리아에서는 정상적으로 발현되지 않기 때문에 *M.*

xanthus FB 계통 균주와 같이 성장이 빠른 점액세균 균주들을 사용하여 생리활성물질을 대량생산하려는 시도가 이루어지고 있다[10]. 또, 이에 더해 분자유전학적 방법을 통해 이들 유전자들을 변형시킴으로써 여러 다양한 유도체들을 생산하려는 시도도 이루어지고 있다. 따라서 분산 돌연변이의 분리는 점액세균 자체 특성의 연구와 대량생산뿐 아니라 유용물질 생산 유전자의 조작 및 대량생산을 위한 모균주를 개발하고자 할 때 가장 먼저 이루어져야 할 일이다. 이러한 배경에서 본 연구는 국내에서 분리된 점액세균 중에서 다양한 배지에서 잘 성장하며, 성장속도가 빠르고, 생리활성 물질을 생산하는 한 균주를 선택하여 동정하고, 이 균주를 대상으로 분산 돌연변이를 분리하는 방법을 시도해 보았다.

재료 및 방법

사용배지 및 배양조건

야생균주의 일반적인 배양에는 CY 평판배지를 사용하였으며, *M. stipitatus* KYC1001의 배양에는 CYE 배지를 사용하였다. 또, 자실체 유도는 CF 배지를 사용하였다. CY 배지는 0.3% casitone, 0.1% yeast extract, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 함유하고 있으며[15], CYE 배지는 1% casitone, 0.5% yeast extract, 10 mM morpholinepropanesulphonic acid(MOPS, pH 7.6), 8 mM MgSO_4 를 함유하고 있다[17]. 그리고 CF 배지는 10 mM MOPS (pH 7.6), 0.015% casitone, 8 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 0.2% sodium citrate, 0.1% pyruvate를 함유하고 있다[17]. 한편, 한천평판배지는 이들

*Corresponding author

Tel: 82-41-540-5627, Fax: 82-41-548-6231

E-mail: kycho@office.hoseo.ac.kr

배지에 1.5% 환천을 첨가함으로써 준비하였다. 액체배지는 32°C 진탕배양기에서 200 rpm으로 진탕하면서 배양하였으며, 평판배지는 32°C 배양기에서 배양하였다.

점액세균의 분리 동정

균주 KYC1001은 계룡산에서 채취된 토양시료에서 분리된 균주로, 점액세균의 확인은 자실체 형성 여부, 활주운동성, 그리고 세포의 모양에 의해 1차 확인되었다. 그리고 이미 알려진 방법 및 기준에 따라 세포, 포자, 자실체, 집락의 형태 및 색, 색소의 생성 여부, 영양 및 16S rRNA 염기서열 비교에 의해 동정되었다[6, 15, 21]. 16S rRNA 유전자의 대부분(1,530 bp)을 포함한 DNA 조각은 KYC1001으로부터 분리한 유전체 DNA를 주형으로 하고, 두개의 oligonucleotides, 5'-GAGTTTGATCCTGGCTGAG-3'(27f)과 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'(1525r)를 primer로 사용하여, Taq DNA polymerase(다카라코리아바이오테크놀로지(주))로 증폭한 DNA 증합효소연쇄반응(PCR)을 통해 얻어졌다. 얻어진 PCR 조각은 PCR purification kit(바이오니아(주))를 사용하여 분리한 후, PCR에서 사용된 두 primer 및 다음 primer들을 사용하여 염기서열을 결정하였다. 5'-CTGCTGCCTCCCGTA-3'(343r), 5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'(357f), 5'-GWATTA-CCGCGGCKGCTG-3'(519r), 5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'(536f), 5'-ATTAGATACCTGGTAG-3'(803f), 5'-CCGTCAATTCATTTGAGTTT-3'(907r), 5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'(1114f), 5'-CGGTGTGTRCAAGGCC-3'(1385r). 그리고, 얻어진 염기서열은 Ribosomal Database Project(RDP) II을 이용하여 다른 점액세균과의 유연관계를 분석하였다.

자연돌연변이 유발

40 ml의 CYE가 들어있는 12개의 250 ml 삼각플라스크에 KYC1001을 접종하여 3일간 배양한 후, 각각의 플라스크로부터 100 µl의 배양상등액을 채취하여 새로 준비한 40 ml의 CYE에 접종하여 배양하였다. 3일간 배양한 후, 다시 새로운 CYE 배지에 계대배양하기를 10회 반복한 후, 각각의 플라스크에서 얻어진 최종 배양액을 희석하여 CYE 평판배지에 도말하였다. 그리고 5일간 배양한 후, 집락의 형태가 야생형 균주의 집락과는 눈에 띄게 다른 집락을 선발하였다. 이렇게 얻어진 집락들은 다시 10 ml의 CYE 배지가 함유된 삼각플라스크에 접종하여 액체배지에서 분산되어 자라는지를 확인하였다.

세포 및 자실체의 관찰

점액세균을 10 ml의 CYE 액체배지에서 OD600이 1.0이 될 때까지 배양한 후, 원심분리하여 상등액을 제거하고, 1 ml의 CF 배지에 녹인 후, 20 µl를 CF 평판배지 위에 올려 놓고 3~5일간 32°C에서 배양함으로써 자실체 형성을 유도

하였다. 자실체의 관찰은 Nikon SMZ1000 입체현미경에 의해 이루어졌으며, 세포와 포자의 관찰은 Nikon Eclipse E600 위상차현미경에 의해 이루어졌다. 그리고 자실체, 세포 및 포자의 모습은 Nikon Coolpix-950에 의해 촬영되었다.

결과 및 고찰

야생점액세균의 분리 및 동정

충남 일대에서 분리된 100여종의 점액세균 중에서 다양한 배지에서 잘 성장하며, 성장속도가 빠르고, 그람양성균에 항균활성을 갖는 물질을 생산하는 균주인 KYC1001을 선택하여 동정하였다. 균주 KYC1001은 다른 박테리아를 분해하여 영양분으로 섭취하지만 셀룰로오스는 분해 이용하지 못하는 용균성 세균으로 *E. coli*와 같은 박테리아 외에도 casitone과 같은 단백질을 주성분으로 함유하는 배지에서 잘 성장하였다. KYC1001은 점액세균 특유의 긴 간균으로, 활주운동에 의해 운동함으로써 활주박테리아에서 일반적으로 관찰되는 집락을 형성하며(Fig. 1A), 영양분이 고갈된 배지인 CF 배지 상에서는 다세포 자실체를 형성함으로써 전형적인 점액세균의 모습을 보였다(Fig. 1B). 점액세균은 전통적으로 자실체, 포자, 영양세포, 집락의 모양과 색, 그리고 영양 및 색소생산 등에 의해 동정되는데[6, 15], 균주 KYC1001은 Fig. 1B에서 보인 바와 같이 CF 배지에서 구형에 짧은 자루가 달린 옅은 회색의 자실체를 형성하였으며, 포자는 구형으로(Fig. 1D), 현미경 관찰 시에 높은 굴절률을 보였다. 영양세포는 Fig. 1C에서 보인 바와 같이 두께가 약 0.5~0.8 µm, 길이 3~20 µm의 길이가 긴 간균으로, 세포의 끝부분이 약간 좁아든 형태이었다. 집락은 활주운동으로 인해 사방으로 펼쳐진 형상이며, 옅은 회색이었는데(Fig. 1A), 노란색을 띠는 형광물질을 생산함으로써 인해서 자외선 아래

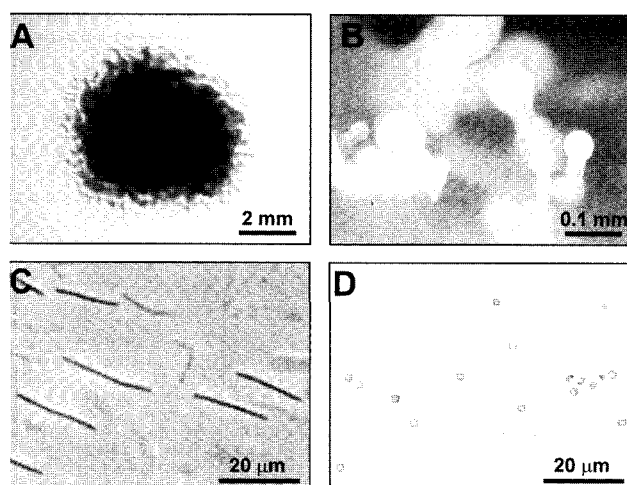


Fig. 1. Morphology of a vegetative colony (A), fruiting bodies (B), vegetative cells (C) and spores (D) of *M. stipitatus* KYC1001.

에서 진한 노란색으로 나타났다. 이러한 특성을 기반으로 균주 KYC1001은 점액세균의 한 종인 *Myxococcus stipitatus* 로 추정되었다. 한편, KYC1001의 16S rRNA 유전자 대부분(1,530 bp)을 PCR을 통해 증폭하고, 그 염기서열을 결정한 후, 얻어진 염기서열을 Ribosomal Database Project(RDP) II[2]에 저장되어 있는 다른 점액세균들의 16S rRNA 염기서열들과 비교 분석하였다. 그 결과 균주 KYC1001의 16S rRNA 유전자의 염기서열은 *M. stipitatus*의 16S rRNA 염기서열과 가장 유사한 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 이 결과들을 바탕으로 KYC1001 균주를 *Myxococcus stipitatus*로 최종 동정하였다.

M. stipitatus KYC1001의 배양 특성

점액세균은 일반적으로 성장속도가 느리며, 배양할 수 있는 배지도 한정되어 있는 경우가 많다. 하지만 KYC1001은 함께 분리한 다른 점액세균들보다도 상대적으로 성장속도가 빠르며, 또 다양한 배지에서 성장하는 특성을 보였다. 한 예로, 1%의 casitone과 0.5%의 yeast extract를 함유한 CYE 배지는 영양분이 풍부한 복합배지로 점액세균의 대표 연구 균주인 *Myxococcus xanthus* DK1622[8]또는 DZ2[3] 계통 균주들의 배양에 많이 쓰이지만, 분리된 야생균주의 절반 이상은 이 배지에서 성장하지 못하였다. 반면에, KYC1001은 CYE 평판배지에서 잘 성장하는 특성을 보였다. 이 외에도 KYC1001은 점액세균의 배양에 사용하는 여러 배지, 즉, CY, CTS, CF, VY2 등의 배지[15]에서도 잘 성장하였다. 한편, KYC1001의 배양액을 XAD-16로 처리한 후, 100% methanol로 추출한 추출물은 그람양성균인 *Bacillus subtilis*에 강한 항균활성을 보였다(결과 보이지 않음).

점액세균은 세포들간의 강한 응집력을 지니고 있어 대부분의 야생점액세균들은 액체 배양시 배양플라스크의 유리벽면에 부착하거나 세포들끼리 뭉쳐서 세포응집체를 형성한다. KYC1001의 경우에도 다른 점액세균과 마찬가지로 세포들간의 강한 응집을 보여 액체 배양시 대부분의 세포들이 배양플라스크의 벽면에 붙거나 세포들끼리 응집되어 세포응집체를 이루었으며, 액체 내에서 자유로이 분산되어있는 세포

는 극히 일부뿐이었다(Fig. 3A).

분산돌연변이의 분리

점액세균은 유용한 여러 생리활성물질과 효소를 생산 분비한다. 하지만 위에서 언급한 바와 같이 세포응집체의 형성 및 세포들이 배양용기 벽면에 부착하는 점은 점액세균을 대량으로 액체 배양하고자 할 때 또는 여러 방법으로 균주를 조작하고자 할 때 큰 장애요인으로 작용할 수 있다. KYC1001은 액체배지에서 세포응집체를 형성하거나 배양플라스크의 표면에 부착하고 배지에서 독립적으로 존재하는 세포의 수는 아주 적다(Fig. 3A). 그런데 만일 자연돌연변이에 의해 분산 돌연변이가 만들어지게 된다면 이 돌연변이 세포들은 야생형 세포들과는 달리 응집되지 않고 배지 내에 자유로이 떠돌아다니게 될 것이다. 본 연구에서는 이러한 특성을 이용하여 *M. stipitatus* KYC1001을 대상으로 분산 돌연변이 균주를 간단히 분리하는 방법을 시도해 보았다. 먼저 12개의 250 ml 삼각플라스크에 40 ml의 CYE 배지를 넣고, 균주 KYC1001을 접종하여 3일간 배양한 후, 다시 새로운 배지에 접종하여 배양하는 방식으로 약 30일에 걸쳐 10 회 계대 배양함으로써 분산 돌연변이 균주들을 농화 배양하였다. 그리고 최종 배양액을 CYE 평판배지에 도말하여 배양한 후 야생형 균주에 비해 집락의 형태 또는 크기가 눈에 띄게 달라진 균주를 선별하였다. 그리고 최종적으로 얻어진 균주들을 액체배지에 배양해 봄으로서 분산되어 성장하는지 여부를 확인하였다. 이러한 방식으로 최종 4균주를 분리하였는데, 이중 1균주(KYC2001)가 액체배지 내에서 전혀 응집되지 않고 완전히 분산되어 성장함으로써 배양액이 불투명하게 보였으며(Fig. 3B), 나머지 3균주(KYC2002, KYC2003, KYC2004)는 일부 세포들이 분산되어 성장함으로써 배양액이 불투명해지는 하지만 세포들이 여전히 응집체를 형성하는 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C).

분산 돌연변이 균주들의 특성

점액세균은 집단운동성(S-motility)과 개별운동성(A-motility)에 의해 운동하는데[4, 7], 세포의 응집현상은 집단운동성과 밀접한 상관관계를 지니고 있음이 알려져 있다[18, 19]. 또, *M. xanthus*의 경우 오랜 기간 진탕배양 할 경우 집

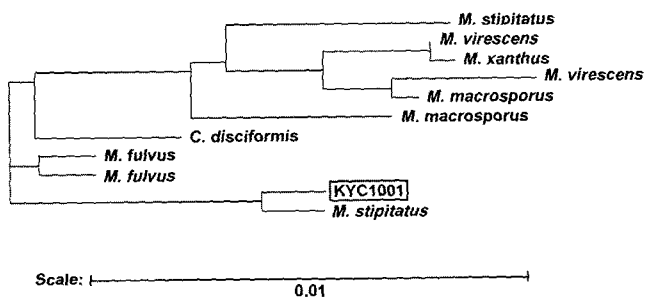


Fig. 2. Phylogenetic tree of KYC1001 based on 16s rRNA sequence analysis. The phylogenetic tree was generated with the RDP web interface to Phylip using the neighbor program [2].

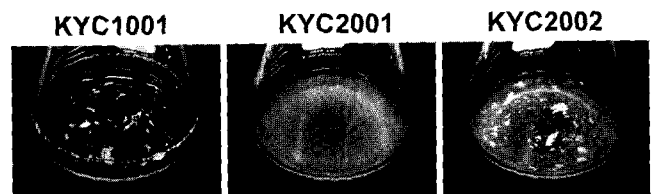


Fig. 3. Behavior of the wild type and the dispersal mutant in liquid media. The wild type strain, KYC1001, and the dispersal mutants, KYC2001 and KYC2002, were cultured in the CYE medium for 24 h with shaking.

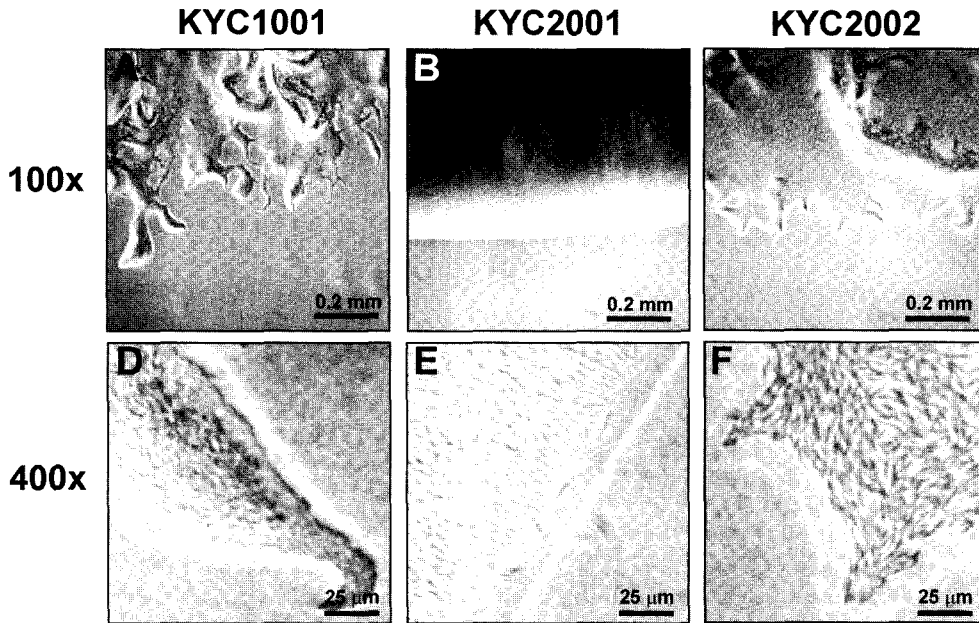


Fig. 4. Gliding motility of the wild type strain, KYC1001, and the dispersal mutants, KYC2001 and KYC2002 on agar surface. Perimeter of the colonies was observed with a phase-contrast microscope.

단운동성이 상실된 돌연변이 균주가 발생됨이 관찰되었다 [23]. 따라서 본 연구에서는 선별된 분산 돌연변이 균주들이 집단운동성을 상실하였는지의 여부를 조사해 보았다. 분리된 균주들의 집단운동성은 집단운동성이 두드러지게 관찰되는 0.5% 한천평판배지[16]에서 균주를 배양한 후 집락 모서리에서 관찰되는 세포들의 운동성을 관찰함으로써 이루어졌는데, 야생형 균주 KYC1001은 Fig. 4A와 D에서 보인 바와 같이 강한 집단운동성을 보여 세포들이 무리를 지어 집락의 모서리에서 뻗혀 나오는 것이 관찰되었다. 하지만 완전분산 돌연변이 균주인 KYC2001의 집락 모서리에서는 이러한 세포집단의 돌출이 전혀 관찰되지 않았으며, 집락의 모서리가 *E. coli*의 집락과 같이 반듯하였다(Fig. 4B와 E). 또한, 야생형 균주 KYC1001의 경우 집단을 이루는 세포들이 평행하게 정렬되어 있는 모습을 보였으나(Fig. 4D), 분산 돌연변이 KYC2001의 세포들은 무질서하게 행동함을 보였다(Fig. 4E). 한편, 부분 분산 돌연변이 균주들인 KYC2002, 2003, 2004는 야생형 균주들과 같이 활발하지는 않았지만 여전히 집단운동성을 지니고 있어 모서리에서 세포들의 집단들이 돌출하는 형상을 관찰할 수 있었다(Fig. 4C와 F).

일반적으로 활주운동성을 상실한 점액세균은 자실체를 형성하지 못하는 것으로 알려져 있다[11]. 분리된 돌연변이들을 대상으로 CF 및 CY 배지 상에서 자실체 형성을 조사하여본 결과 KYC2002, 2003, 2004 균주들은 약해지기는 하였지만 여전히 집단운동성을 지니고 있는 관계로 자실체를 형성할 수 있었다(결과 보이지 않음). 하지만 KYC2001의 경우에는 집단운동성을 완전히 상실한 관계로 자실체를 형성할 수 없었다. 한편, 점액세균은 일반적으로 자실체 내부

에서만 포자를 형성하는 것으로 알려져 있는데, 균주 KYC1001은 특이하게도 자실체 주변에도 포자를 형성하여 분산 돌연변이균주 KYC2001도 자실체는 형성하지 못하지만 포자는 형성하는 것으로 관찰되었다. 점액세균의 장기보관은 포자형태로 보관되므로 이러한 특성은 균주의 보관을 위해 매우 유용한 특성이 된다.

KYC2001이 분산되어 자라게 됨으로서 야생형 균주 KYC1001으로는 할 수 없었던 흡광도 측정에 의한 성장 관

Table 1. Morphological and physiological characteristics of *M. stipitatus* KYC1001

| | | |
|------------------------------------|-----------------------|---|
| Vegetative cell | thickness | 0.5 ~ 1.0 μm |
| | length | 3 ~ 20 μm |
| | color | gray |
| Spore | shape | spherical |
| | diameter | 1.5 ~ 2.0 μm |
| | other characteristics | highly refractive |
| Fruiting body | shape | sphere with short stem |
| | height | 0.1 ~ 0.5 μm |
| | color | gray |
| Colony | morphology | undulate |
| | color | gray |
| | pigment production | bright yellow fluorescence pigment |
| Growth rate | | 6.4 h/generation* |
| Production of bioactive substances | | antibacterial activity against <i>Bacillus subtilis</i> |

*Cultured in a 250 ml erlenmeyer flask containing 30 ml CYE broth with shaking (200 rpm) at 32°C.

찰이 가능하게 되었다. 균주 KYC2001을 CYE 배지에 접종하고 32°C에서 성장곡선을 그려본 결과 KYC2001은 세대시간이 6.4 시간임을 알 수 있었다. 한편, KYC2001은 모균주 KYC1001과 마찬가지로 여전히 그람양성균에 대한 항균 물질을 생산하는 것으로 나타나 항균물질의 생산이 분산돌연변이에 의해 눈에 띄는 만큼 영향 받지 않았음을 보여 주었다.

결론적으로, 돌연변이 KYC2001은 여러 액체배지에서 완전히 분산하여 자랄 뿐만 아니라, 여러 종류의 배지에서 성장가능하며, 성장속도가 다른 야생균주에 비해 빠르고, 포자를 생성함으로 인해 쉽게 장기 보관할 수 있는 형태로 바꿀 수 있다. 따라서 KYC2001은 다른 점액세균에서 분리한 유용물질 생산 유전자를 발현하거나 조작하고자 할 때 좋은 모균주로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 본 연구에서 시도된 방법은 세포의 응집체 형성에 의한 문제를 쉽게 해결해 줌으로서 현재 다수 분리되고 있는 야생 점액세균을 액체배지에서 대량 배양하고자 균주를 개량할 때 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

요 약

세포들간의 응집 및 배양용기 표면에서의 부착은 야생 점액세균의 액체배양에 큰 장애물로 작용한다. 이러한 장애를 해결하기위한 한 방안으로 야생 점액세균으로부터 자연적 분산 돌연변이 균주를 얻는 방법을 시도해 보았다. 실험 대상으로 사용한 균주 *M. stipitatus* KYC1001은 충남 계룡산의 토양에서 분리된 점액세균으로, 다른 점액세균들과 마찬가지로 액체배지 내에서 대부분의 세포들이 응집체를 형성하거나, 배양용기의 표면에 달라붙는다. 본 연구에서는 야생형 균주들이 세포응집체를 형성하거나 배양용기의 표면에 달라붙게 되는 반면 분산 돌연변이 세포들은 배지 내에 자유로이 떠돌아다니게 될 것이라는 특성을 이용하여, 배양액의 상등액을 30일에 걸쳐 10회 계대 배양함으로써 분산되어 상등액에 존재할 자연적 분산 돌연변이 세포들을 농화 배양하였다. 그 결과, 액체배지에서 완전히 분산되어 성장하는 한 균주, KYC2001과 부분적으로 분산하여 성장하는 세 균주, KYC2002, 2003, 2004를 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 미생물유전체활용 기술개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

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.
- Cole, J.R., B. Chai, T.L. Marsh, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, S. Chandra, D.M. McGarrell, T.M. Schmidt, G.M. Garrity, and J.M. Tiedje. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**: 442-443.
- Cho, K. and D.R. Zusman. 1999. AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **34**: 268-281.
- Cho, K. 2002. Bacterial gliding motility. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 199-205.
- Dworkin, M. 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**: 250-257.
- Dworkin, M. and D. Kaiser. 1993. *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington, D.C.
- Hodgkin, J. and D. Kaiser. 1979. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus*: two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**: 177-191.
- Kaiser, D. 1979. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5952-5956.
- Kim, Y.S., W.C. Bae, and S.J. Back. 2003. Bioactive substances from myxobacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 1-12.
- Lau, J., S. Frykman, R. Regentin, S. Ou, H. Tsuruta, and P. Licari. 2002. Optimizing the heterologous production of epothilone D in *Myxococcus xanthus*. *Biotechnol. Bioeng.* **78**: 280-288.
- MacNeil, S.D., A. Mouzeyan, and P.L. Hartzell. 1994. Genes required for both gliding motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **14**: 785-795.
- Reichenbach, H. 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* **1**: 15-21.
- Reichenbach, H. 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 149-156.
- Reichenbach, H. and G. Hofle. 1999. Myxobacteria as producers of secondary metabolites. pp. 149-179. In Grabley S. and R. Thiericke (ed.), *Drug Discovery from Nature*, Springer Verlag, Berlin.
- Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1992. The myxobacteria. pp. 3416-3478. In Balows A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2nd ed., Springer Verlag, New York.
- Shi, W. and D.R. Zusman. 1993. The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3378-3382.
- Shi, W., T. Khler, and D.R. Zusman. 1994. Motility and chemotaxis in *Myxococcus xanthus*. *Methods Mol. Genet.* **3**: 258-269.
- Shimkets, L.J. 1986. Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **166**: 837-841.
- Shimkets, L.J. 1986. Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation. *J. Bacteriol.* **166**: 842-848.

20. Silakowski, B., H.U. Schairer, H. Ehret, B. Kunze, S. Weinig, G. Nordsiek, P. Brandt, H. Blocker, G. Hofle, S. Beyer, and R. Muller. 1999. New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J. Biol. Chem.* **274**: 37391-37399.
21. Sproer, C., H. Reichenbach, and E. Stackebrandt. 1999. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **3**: 1255-1262.
22. Tang, L., S. Shah, L. Chung, J. Carney, L. Katz, C. Khosla, and B. Julien. 2000. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* **287**: 640-642.
23. Velicer, G. J., L. Kroos, and R. E. Lenski. Loss of social behaviors by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12376-12380.
24. Ward, M. J. and D. R. Zusman. 2000. Developmental aggregation and fruiting body formation in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*, pp. 243-262. In Brun Y.V. and L.J. Shimkets (ed.), *Prokaryotic development*. ASM Press, Washington, D.C.

(Received July 22, 2003/Accepted Dec. 2, 2003)