

Burkholderia sp. CAS-5 균으로 부터 생산된 시드로포어의 Matrix metalloproteinase-2(Gelatinase A) 억제 활성

김 경 자*

순천향대 자연과학대학 생명공학과

(Received May 26, 2006; Revised August 14, 2006)

Inhibitory Effect of Siderophore Purified from *Burkholderia* sp. CAS-5 on the Matrix Metalloproteinase-2 (Gelatinase A)

Kyoung-Ja Kim*

College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

Abstract — Matrix metalloproteinase-2 is known to be involved in pathological processes such as tumor invasion or rheumatoid arthritis. A soil microorganism producing siderophore under low iron stress (up to 5 μ M of iron) was identified as *Burkholderia* sp. Hydroxamate type siderophore produced by *Burkholderia* sp. CAS-5 was partially purified. MMP inhibitory activity of siderophore was confirmed by gelatin zymography. The Zn^{2+} -chelating activity of siderophore correlated with the inhibition of MMP-2 activity.

Keywords □ siderophore, matrix metalloproteinase-2, inhibitory activity, *Burkholderia* sp. metal ion binding activity

암세포의 침윤과 전이에 있어서 가장 중요한 부분은 암세포가 정상적으로 통과할 수 없는 지지구조체인 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막(basement membrane, BM)에 있는 단백질의 분해¹⁾이다. 암세포는 이러한 장벽을 분해하기 위하여 많은 단백질 분해 효소를 분비하는데, 특히 기저막과 세포외기질을 분해하는 matrix metalloproteinase(MMPs)^{2,3)}가 암세포의 침윤과 전이에 중요한 역할을 한다. MMPs는 Zn^{+2} 를 함유한 효소로 matrix protein 분해 활성을 지니며, 구조와 기질 특이성에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin, matrilysin과 막형의 MMPs⁴⁾로 나눌 수 있다. 과도하게 발현된 MMPs는 관절염, 암의 성장, 암의 전이, 복합적인 경화증과 같은 여러 질병^{5,6)}과 연관되어 있으며, 특히 gelatinase A(MMP-2)⁷⁾와 gelatinase B(MMP-9)⁸⁾는 암⁹⁾에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. MMP-2의 경우 콜라겐과 반응하여 암세포가 조직으로 침투하는데 중요한 역할을 하며 여러 종류의 암에서 MMP의 활성이 증가되는 것으로 나타났으므로 MMP가 항암제 개발¹⁰⁻¹²⁾의 중요한

target으로 대두되고 있다. MMPs의 활성 자리에 있는 Zn^{2+} 와 chelate하는 Zn^{2+} 결합 group들(hydroxamate, carboxylate, aminocarboxylate, SH와 phosphorous acid 유도체들)이 MMPs의 억제제^{13,14)}로 작용하는 것으로 알려져 있다.

금속 이온과 결합하는 특성을 지닌 물질이 MMP의 억제 활성¹⁵⁾과 연관이 있는 것으로 보고되었으며, 철의 농도가 제한된 환경에서 Fe(III)이온과 결합하는 저분자량의 킬레이트 물질로 박테리아와 곰팡이류에서 생산되는 시드로포어(siderophore)가 MMP의 활성을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 시드로포어는 구조¹⁷⁾에 따라 hydroxamate, phenolate와 catecholate로 나뉘어지며 enterobacteria에서 생산되는 enterobactin이 대표적인 catecholate 형의 siderophore이며 그 외 *Azobacter vinelandii*와 myxobacterium인 *Angiococcus disciformis*에서 생산되는 azotochelin과 myxochelin 등¹⁸⁾이 있다. Trihydroxamate형의 시드로포어로는 *Streptomyces*종에서 생산된 ferrioxamate, 곰팡이류에서 생산된 ferrichrome^{7,19)}이 있으며 ferric hydroxamate에는 coprogen, aerobactin, schzokinin과 rhodotorulic acid 등²⁰⁾이 알려져 있다. Deferoxamine과 desferri-thiocin은 *Streptomyces pilosus*와 *Streptomyces antibioticus*로부터 분리된 시드로포어로 항암 효과를 가지는 것으로 보고되었

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-530-1352 (팩스) 041-530-1350
(E-mail) kyoungjakim@hotmail.com

다.²¹⁾ 이들의 항암 활성의 일부는 Fe^{+3} 결합 활성과 연관된 것으로 보고 되었으며²²⁾ 다른 학자들의 보고에 의하면 MMP-2 억제 활성과 항암 활성이 연관된 것으로 알려져 있다.²³⁾ 그러나 미생물에서 생산되는 MMP 억제제에 관한 연구는 미미한 형편이다. 미생물을 이용하여 MMP 억제제를 생산하여 의학적으로 이용하는 경우 경제적인 문제뿐 아니라 유전자 조작을 통한 미생물의 균주 개량으로 억제제의 대량 생산을 용이하게 할 수 있다는 점에서 유리하다고 할 수 있다. 일반적으로 시드로포어는 Fe^{+3} 이온과 강한 친화력을 가지는 것으로 알려져 있으나 *Pseudomonas fluorescens* 2-79의 siderophore는 Fe^{+3} 이온보다 Cu^{+2} 이온에 더 강한 친화력을 보이는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾ 이와 같이 시드로포어의 종류나 생산 균주에 따라 금속 이온에 대한 친화력이 다른 것으로 보여진다. 그러므로 Zn^{+2} 나 Ca^{+2} 이온을 활성 자리에 가지고 있는 MMP에 대한 시드로포어의 영향을 조사하는 것이 필요하다. 시드로포어 생산 균주의 금속 이온 결합 활성과 MMP-2 억제 활성을 조사하여 시드로포어를 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 조사하고자 하였다. 기존의 항암 치료법이 방사선이나 세포 독성 항암제에 의해 암세포를 직접 죽이는 것에 비해 MMP 억제제에 의한 치료는 암의 침윤, 전이 및 암세포의 혈관 신생등을 방지하여 세포 증식을 억제하는 방법이라 할 수 있고 이러한 치료법은 기존의 cytotoxic therapy를 보완할 수 있는 대체 치료법이 될 수 있다. 본 연구에서는 시드로포어를 생산하는 균주를 분리, 동정하였으며, 분리주인 *Burkholderia* sp. CAS-5 균이 생산하는 시드로포어를 분리한 후 Fe^{+3} 이온 이외의 여러 금속 이온과의 결합 활성을 조사하고 gelatin zymography를 이용하여 정제된 시드로포어가 MMP 활성을 억제하는지를 조사하였다.

실험 방법

실험 재료 및 시약

Gel extraction kit는 QIAGEN(Hilden, Germany), DNA 분리용 시약은 Bioneer(Seoul, Korea), 각종 배지용 시약은 Difco Lab(Detroit, USA)에서 구입하였으며, 그 외 Sephadex LH-20, gelatinase, methanol 등의 용매와 일반 시약은 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

실험 균주

본 실험에 사용한 *Burkholderia* sp. CAS-5균주는 미국 오레곤 주의 흙에서 분리한 균종으로 시드로포어 생산 균을 선별하기 위한 chrome azurol S(CAS) 고체 배지²⁵⁾에서 시드로포어 생성을 조사한 결과 시드로포어 생산 활성이 가장 높은 균종으로 선별 되었으며, 계대 배양을 위한 배지조성은 Glucose 5 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/l, yeast extract 0.05 g/l, KH_2PO_4 0.2 g/l, $MgCl_2$ 0.6 g/l, H_2O 0.2 g/l, $FeSO_4$ 0.005 g/l, agar 20 g/l, pH 7.0이며, 시드로포어 생

산용 배지는 다음과 같은 조성을 가진 ASP 배지를 사용하였다; L-asparagine 0.05%, glucose 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, KH_2PO_4 0.05%. pH 7.0. 배양조건은 30°C에서 3~4일간 배양하였다.

균주 동정

분리주인 CAS-5균에서 분리한 chromosomal DNA를 PCR premix(AccPower®PCR preMix, Bioneer) kit를 이용하여 16s rDNA forward primer(5'-AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG-3', 20 pmol)와 16s rDNA reverse primer(5'-GGCTACCTGTTACGACTT-3', 20 pmol)를 각각 2 μ l, 분리한 chromosomal DNA를 1 μ l, 증류수 15 μ l를 첨가하여 PCR을 실시하였다. PCR 조건은 시작 denaturation 단계를 94°C에서 1분간 실시하였고, 94°C에서 1분, 51°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30 cycle 반응 후 마지막 extention 단계는 72°C에서 7분간 더 실시하였다. 반응 후 1.5% agarose gel에서 전기 영동을 실시하여 증폭된 PCR 산물을 Gel Extraction Kit(QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Germany)를 이용하여 설명서에 기재된 방법에 따라 gel에서 추출하였다. 추출한 산물을 agarose gel 1.5%에서 다시 전기영동하여 확인한 후 TaKaRa Korea의 유전자 해석 센터에 의뢰하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI의 Blast search program을 이용하여 염기배열순서의 상동성을 조사하였다.

시드로포어 탐색

Chrome azurol S(CAS) assay²⁶⁾를 이용하여 시드로포어를 탐색하였다. CAS-Fe(III) 복합체의 푸른색으로부터 시드로포어가 Fe(III)를 제거하면 노란색으로 변화되는 반응을 이용하여 CAS 고체 배지에서는 노란색 halo가 생성되는 것을 관찰하였고, 액체 배지에서는 배양 상등액을 CAS assay 시약과 1:1로 혼합하여 상온에서 30분 후 630 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 감소 정도를 균을 심지 않은 배지 상등액과 비교하여 시드로포어 활성을 조사하였다.

Burkholderia sp. CAS-5의 시드로포어 생산에 미치는 철의 농도

CAS-5균을 $FeCl_3$ (5~50 μ M)를 첨가한 ASP 배지에 30°C에서 3일간 배양 후 상등액을 취하여 CAS assay법으로 시드로포어 생산을 조사하여 $FeCl_3$ 를 첨가하지 않은 배지에서 배양한 상등액과 비교하였다.

시드로포어의 분리, 정제

분리주 *Burkholderia* sp. CAS-5균을 시드로포어 생산배지(ASP 배지)에 3일간 30°C에서 배양후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 같은 부피의 메탄올로 추

출한 다음 감압 건조하였다. 감압 건조한 시료를 소량의 메탄올에 녹여 메탄올을 용출 용매로 Sephadex LH-20(Pharmacia) column chromatography 로 분획을 실시하였다. CAS assay 시약을 이용하여 시드로포어가 들어있는 분획만을 모아 감압 건조하여 소량의 메탄올에 녹여 HPLC Nucleosil ODS(C₁₈) column 에서 메탄올을 이동성 용매로 1.5 ml min⁻¹ 속도로 시드로포어를 분리하였다.

시드로포어의 종류 조사

시드로포어의 종류를 조사하기 위하여 Arnow reaction²⁷⁾과 Csaky test²⁸⁾를 이용하여 catecholate형인지 혹은 hydroxamate형인지를 조사하였다. 이때 표준품으로는 2,3-dihydroxybenzoic acid와 hydroxylamine를 이용하였다.

금속 이온 결합 활성 조사

Fe³⁺ 결합 활성은 CAS assay 방법에 의거하여 측정하였다. CAS 용액과 시드로포어 함유 시료를 혼합한 후 630 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. Control로는 균을 심지 않은 배지나 추출 용매를 이용하였다. CAS assay의 원리를 이용하여 다른 이가 양이온의 결합 활성은 4-(2-pyridylazo)resorcinol(PAR)을 이용하여 PAR assay 법¹⁵⁾으로 측정하였다. 각각의 금속 이온(Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺)을 20 μM 농도로 함유한 0.1 mM의 PAR 용액(in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)과 시드로포어 함유 시료를 혼합하여 Ni²⁺, Zn²⁺의 경우 500 nm에서, Co²⁺, Cu²⁺의 경우에는 514 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시드로포어가 금속 이온과 결합시 흡광도가 감소하게 되므로 흡광도 감소 정도를 조사하여 시드로포어의 금속 이온과의 결합 활성을 측정하였다.

젤라틴 zymography²⁹⁾

MMP-2(0.5 U/u)와 시드로포어 5~10 μl을 함유한 MMP-2를 sample buffer(0.1 M Tris-HCl, 4% sodium dodecyl sulfate[SDS], 20% glycerol, 0.005% bromphenol blue, 10 mM EDTA)에 1:1로 첨가하여 0.1% gelatin을 함유한 10% SDS-PAGE를 하였다. 그 후 SDS를 제거하기 위하여 2.5% Triton X-100으로 15 분간 2번 씻어 주었다. 이 gel을 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂를 함유한 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액에 담구어 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하고 7% acetic acid, 5% 메탄올 함유 탈색액으로 탈색하여 clear band의 굵기를 비교하였다.

결과 및 고찰

시드로포어 생산 균주의 동정

시드로포어 생산 균을 선별하기 위한 chrome azurol S(CAS)

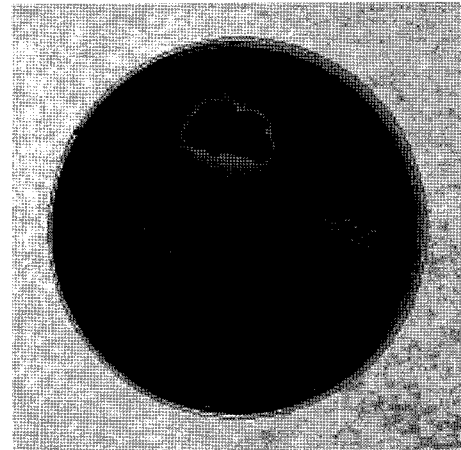


Fig. 1 - Orange halo formation of *Burkholderia* sp. CAS-5 on the siderophore detection medium (CAS medium). Arrow designates *Burkholderia* sp. CAS-5.

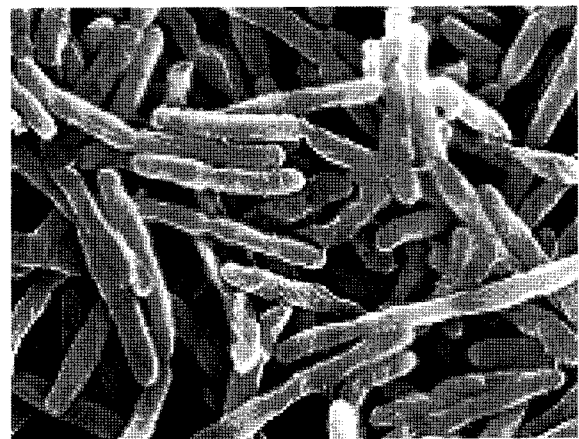


Fig. 2 - Scanning electron micrograph of *Burkholderia* sp. CAS-5 cultured on TSB medium for 3 days.

고체 배지²⁵⁾에서 시드로포어 생성을 조사한 결과 오렌지색 halo가 가장 큰 균종을 시드로포어 생산 활성이 가장 높은 균종으로 선별하였다(Fig. 1). 순수 분리한 시드로포어 생산 균종을 동정하기 위하여 이 균종에서 분리한 chromosomal DNA를 16s rDNA primer를 이용하여 PCR 반응 후 TaKaRa Korea의 유전자 해석 센터에 DNA 염기 서열을 분석하였다. 분석된 서열은 NCBI의 Blast search program을 이용하여 상동성을 조사한 결과 *Burkholderia* sp.와 97% 일치하였으며 그람 염색 결과 그람 음성균으로 나타났다(data not shown). 또한 전자 현미경으로 관찰한 균주의 모양(Fig. 2)과 API kit(BioMeieux, France)를 이용한 생화학적 특성등을 토대로 *Burkholderia* sp. CAS-5로 명명하였다.

CAS-5 균의 성장과 시드로포어 생산

CAS-5 균의 성장과 시드로포어 생산과의 관계를 조사하기 위

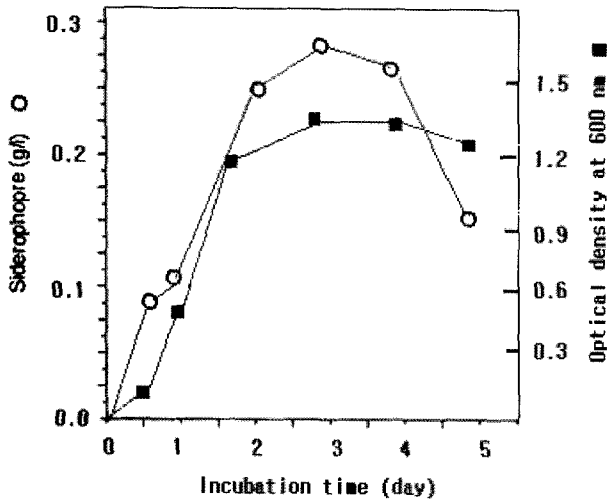


Fig. 3 - Relationship of growth and siderophore production of *Burkholderia* sp. CAS-5.

하여 ASP 배지에 30°C에서 5일간 균주를 배양하면서 배양 상등액의 시드로포어 생산은 CAS assay 법²⁶⁾으로 조사하였고 균주의 성장은 균 배양액을 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 시드로포어 생산은 대수기에 시작하여 정체기인 3일째에 시드로포어 생산이 최대가 되었으며 그 후 점차 감소하였다. 이 시기에는 배양액의 pH가 약 8.5로 증가되어 시드로포어의 알칼리성에서의 가수분해 현상으로 인한 것으로 사료된다.

***Burkholderia* sp. CAS-5의 시드로포어 생산에 미치는 철 농도**

CAS-5균을 FeCl₃(5~50 μM)를 첨가한 ASP 배지에 30°C에서 3일간 배양 후 상등액을 취하여 CAS assay법으로 시드로포어 생

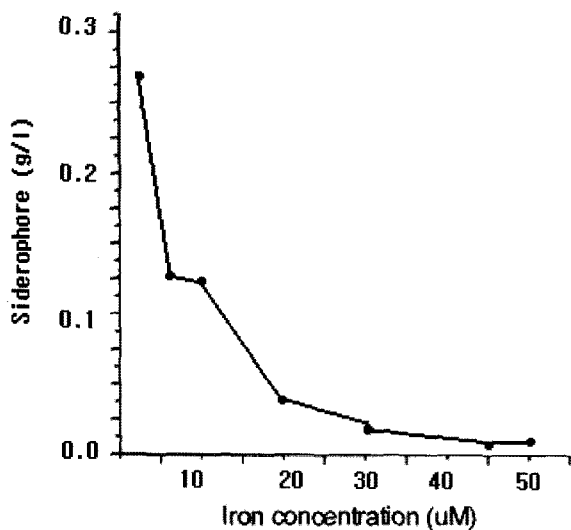


Fig. 4 - Effect of iron concentrations on the production of siderophore from *Burkholderia* sp. CAS-5.

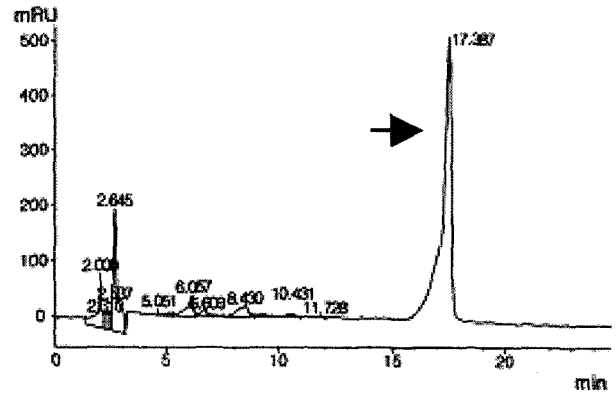


Fig. 5 - HPLC profiles of siderophore from *Burkholderia* sp. CAS-5.

산을 조사하여 FeCl₃를 첨가하지 않은 배지에서 배양한 상등액과 비교한 결과 5 μM 이상의 FeCl₃를 첨가한 배지 상등액의 시드로포어 생산은 현저하게 억제되었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 시드로포어 생산이 FeCl₃ 농도 2 μM 이상에서 급격하게 감소되는 것으로 조사되었다. 철의 결핍 상태에서 철과 결합하는 시드로포어의 생산이 촉진됨을 확인하였다.

시드로포어의 분리, 정제 및 종류 조사

분리주 CAS-5균을 시드로포어 생산배지(ASP 배지)에 배양 후 원심분리한 상등액을 메탄올 추출, Sephadex LH-20 column chromatography와 HPLC(Fig. 5)과정으로 분리, 정제 후 시드로포어를 silica gel TLC를 이용하여 chloroform : methanol(2 : 1)를 전개 용매로 전개한 결과 FeCl₃ 용액에서 hydroxamate의 경

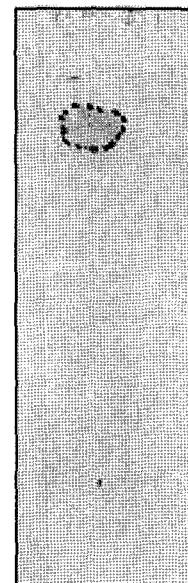


Fig. 6 - TLC of purified siderophore from *Burkholderia* sp. CAS-5. Used plate is silica gel plate and developing solvent is chloroform : methanol=2 : 1. Purified siderophore was detected by spraying 0.1% FeCl₃ solution.

우 나타나는 붉은 갈색을 나타내었다(Fig. 6). Catechol형일 경우 푸른 색을 띠게 된다. 또한 시드로포어의 종류를 조사한 결과, catechol 형과 반응하는 Arnow reaction²⁷⁾에서 반응을 나타내지 않았으며 hydroxamate 형과 반응하는 Csaky test²⁸⁾에서 반응을 나타내었다. 그러므로 CAS-5균이 생산하는 시드로포어는 hydroxamate형인 것으로 사료된다. 분리, 정제한 시드로포어의 자세한 구조 구명을 위하여 분석중이며 추후에 발표할 예정이다. Hydroxamate형인 시드로포어로는 ferrioxamate, ferrichrome, aerobactin, schzokinin과 rhodotorulic acid 등^{30,31)}이 알려져 있다. Hydroxamate형의 시드로포어는 일반적으로 catechol 형보다 안정하고 철과의 결합력이 더 높아 이용도가 더 많은 것으로 알려져 있다.³²⁾

금속 이온 결합 활성 조사

시드로포어의 Fe⁺³ 결합 활성은 CAS assay 방법에 의거하여 CAS 용액과 시드로포어함유 시료를 혼합한 후 630 nm에서 흡광도 감소를 측정된 결과 10 μl의 시드로포어를 첨가한 경우 82% 억제력을 나타내었다. 4-(2-pyridylazo)resorcinol(PAR)을 이용한 PAR assay 법으로 시드로포어의 Ni⁺², Zn⁺²과의 결합력은 500 nm에서, Co⁺², Cu⁺²와의 결합력은 514 nm에서 흡광도 감소를 측정된 결과, Zn⁺² 이온과의 결합력이 85%로 가장 강한 것으로 나타났으며, Cu⁺² 이온과의 결합력은 55%, Ni⁺² 이온과 Co⁺² 이온과의 결합력은 거의 없는 것으로 조사되었다. 시드로포어의 Zn⁺² 이온과의 결합력이 MMP-2 활성 억제와 관련된 것으로 사료된다.

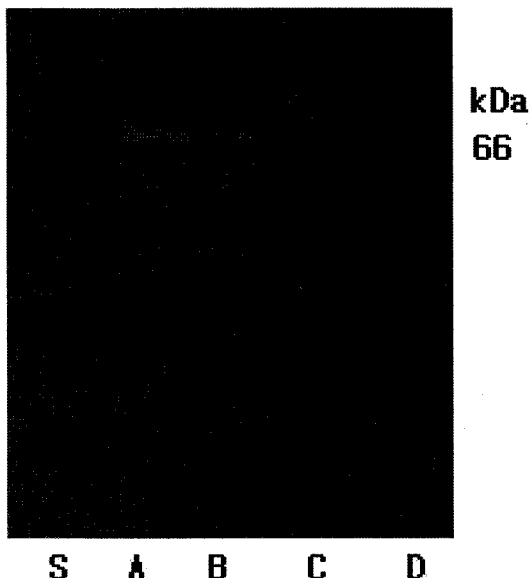


Fig. 7 - Effect of siderophore purified from supernatant of *Burkholderia* sp. CAS-5 on the gelatinase. Gelatin zymograms show (A) MMP-2, (B) MMP-2 plus methanol 10 μl (C) MMP-2 plus siderophore 5 μg (D) MMP-2 plus siderophore 10 μg.

젤라틴 zymography

MMP-2(0.5 U/u)와 시드로포어 5~10 μl을 함유한 MMP-2를 0.1% gelatin을 함유한 10% SDS-PAGE를 한 후 gelatinase의 활성 염색을 한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 투명한 밴드로 나타난 MMP-2(gelatinase)의 굵기와 비교했을 때 시드로포어를 함유한 MMP-2의 투명한 밴드의 굵기가 현저하게 감소되어 시드로포어의 MMP-2 억제 활성을 확인할 수 있었다. 분리된 시드로포어의 MMP-2 억제 활성을 이용하여 시드로포어를 항암제로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

시드로포어 탐색 고체 배지에서 분리, 동정한 *Burkholderia* sp. CAS-5 균을 asparagine함유 최소배지에 배양한 후 배양 상등액을 메탄올 추출, Sephadex LH-20 column chromatography와 HPLC로 시드로포어를 분리, 정제하였다. 정제한 시드로포어의 종류를 Arnow reaction과 Csaky test를 이용하여 조사한 결과 hydroxamate형으로 나타났다. 배지의 FeCl₃ 농도에 따른 시드로포어의 생산을 조사한 결과 5 μM 이상에서는 시드로포어가 생산되지 않는 것으로 나타났다. 분리, 정제된 시드로포어의 matrix metalloproteinase에 대한 억제 활성을 gelatin zymography로 확인하였으며 억제 활성 기작은 시드로포어의 금속 이온 결합력과 관련이 있는 것으로 조사되었다.

감사의 말씀

본 과제는 2005년도 순천향대 교내 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Chen, W. T. : Membrane proteases : roles in tissue remodeling and tumor invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 802 (1992).
- 2) Gehrmann, M., Briknarova, K., Bányai, L., Pathy, L. and Llinas, M. : The col-1 module of human matrix metalloproteinase-2 (MMP-2): structural/functional relatedness between gelatin-binding fibronectin type II modules and lysine-binding single domains. *Biol. Chem.* 383, 137 (2002).
- 3) Sternlicht, M. D. and Werb, Z. : How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463 (2001).
- 4) Visse, R. and Nagase, H. : Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92, 827 (2003).
- 5) Kai, H., Ikeda, H., Yasukawa, H., Kai, M., Seki, Y. and Kuwahara, F. : Peripheral blood levels of matrix metallopro-

- teases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 368 (1998).
- 6) Ye, S. : Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* **19**, 235 (2000).
 - 7) Riquelme, M. : Fungal siderophores in plant-microbe interactions. *Microbiologia Sem.* **12**, 537 (1996).
 - 8) Pyo, R., Lee, J. K., Shipley, J. M., Curci, J. A., Mao, D. and Ziporin, S. J. : Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **105**, 1641 (2000).
 - 9) Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. and Kleiner, D. E. : Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* **15**, 1434 (1993).
 - 10) Trexler, M., Briknarova, K., Gehrman, M., Llinas, M. and Patthy, M. : Peptide ligands for the fibronectin type II modules of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J. Biol. Chem.* **278**, 12241 (2003).
 - 11) Overall, C. M. and Lopez-Otin, C. : Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 657 (2002).
 - 12) Hoekstra, R., Eskens, F. A. and Verweij, J. : Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *The Oncologist* **6**, 415 (2001).
 - 13) Ramnath, N. and Creaven, P. J. : Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.* **6**, 96 (2004).
 - 14) Berton, A., Rigot, V., Huet, E., Decarme, M., Eeckhout, Y., Patthy, L. and Godeau, G. : Involvement of fibronectin type II repeats in the efficient inhibition of gelatinases A and B by long-chain unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **276**, 20458 (2001).
 - 15) Shinozaki, Y., Akutsu-Shigeno, Y., Nakjima-Kambe, T., Nakabara, T. and Uchiyama, H. : Inhibition of matrix metalloproteinase-2 activity by siderophore of *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 840 (2004).
 - 16) Jani, M., Tordai, H., Trexler, M., Bányai, L. and Patthy, L. : Hydroxamate-based peptide inhibitors of matrix metalloprotease 2. *Biochimie.* **87**, 385 (2005).
 - 17) Hofte, M. : Classes of microbial siderophores. In: L. L. Barton and B.C. Heming, Editors, *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*, Academic Press, New York, 326 (1993).
 - 18) Chincholkar, S. B., Chaudhari, B. L., Talegaonkar, S. K. and Kothari, R. M. : Microbial iron chelators: a tool for sustainable agriculture. In: R. K. Upadhyay, K. G. Mukherji and B. P. Chamola, Editors, *Biocontrol Potential and Their Exploration in Crop Disease Management vol. I*, Kluwer Academic, New York, 4970 (2000).
 - 19) Dave, B. P. and Dube, H. C. : Regulation of siderophore production by iron Fe(III) in certain fungi and fluorescent *Pseudomonads*. *Ind. J. Exptl. Biol.* **38**, 297 (2000).
 - 20) Jalal, M. A. F. and Helm, V. D. : Isolation and spectroscopic identification of fungal siderophores. In: G. Winkelmann, Editor, *Handbook of Microbial Iron Chelates*, CRC Press, Boca Raton, 235 (1991).
 - 21) Payne, S. : Detection, isolation and characterization of siderophores. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. NY. **235**, 329 (1994).
 - 22) Raaska, L. and Sandholm, T. M. : Effects of iron level on the antagonistic action of siderophores from non-pathogenic *Staphylococcus* spp. *Journal of Industrial Microbiology* **15**, 480 (1995).
 - 23) Handsley, M. and Edwards, D. R. : Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* **115**, 849 (2005).
 - 24) Kloepper, J. W., Leong, J. Teintz, M. and Schroth, M. N. : *Pseudomonas* siderophores : a mechanism explaining disease suppressive soil. *Curr. Microbiol.* **4**, 317 (2000).
 - 25) Milagres, A. M. F., Machuca, A. and Napoleao, D. : Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome Azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Meth.* **37**, 16 (1999).
 - 26) Schwyn, R. and Neiland, J. B. : Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 4756 (1987).
 - 27) Arnow, L. E. : Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxy phenylalanine tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**, 531 (1937).
 - 28) Csaky, T. Z. : An estimation of bound hydroxylamine in biological materials, *Acta Chem. Scand.* **2**, 450 (1937).
 - 29) Kerkvliet, E., Jansen, I., Schoenmaker, T., Docherty, A., Beertsen, W. and Everts, V. : Low molecular weight inhibitors of matrix metalloproteinases can enhance the expression of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A) without inhibiting its activation. *Cancer* **97**, 1582 (2003).
 - 30) Atkin, C., Neilands, J. and Phaff, H. : Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporodibolus*, and *Sporobolomyces* and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *J. Bacteriol.* **103**, 722 (1970).
 - 31) Kintu, K., Dave, B. P. and Dube, H. C. : Detection and chemical characterization of siderophores produced by certain fungi. *Ind. J. Microbiol.* **41**, 879 (2001).
 - 32) Loper, J. : Molecular and biochemical bases for activities of biological control agents: the role of siderophores. In: *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases* Alan R. Liss, New York, 735 (1990).