Korean J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 39, No. 2, 119–125 (2011)

KOREAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

© The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Egr-1 유전자의 발현 유도물질을 생산하는 항균성 저 영양 세균의 분리 및 동정

윤상홍[1]* · 김동관[3] · 이영한[4] · 신순영[4] · 권순우[2] · 이창묵[1] · 강한철[1] · 구본성[1]
[1]농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, [2]농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부
[3](주)비트로시스 생명공학연구소, [4]건국대학교 의생명과학과

Received: April 21, 2011 / Revised: May 27, 2011 / Accepted : May 30, 2011

Isolation and Identification of Three *Pseudomonas koreensis* Strains with Anti-microbial Activities Producing Inducers of the Expression of Egr-1 Gene. Yoon, Sang-Hong[1]*, Dong-Gwan Kim[3], Young-Han Lee[4], Soon-Young Shin[4], Soon-Woo Kwon[2], Chang-Muk Lee[1], Han-Chul Kang[1], Bon-Sung Koo[1]. *[1]Dept. of Agricultural. Biotechnol., National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707 Korea, [2]Dept. of Agricultural. Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea, [3]Institute of Biotechnology, Vitrosys Inc., Yeongju 750-804, Korea, [4]Dept. of Biomedical Science & Technology, Research Center for Transcription Control, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea* – The Egr-1 gene is known to be a transcription factor for activating the expression of many tumor-repressing genes. In this study, three strains activating the promoter of the Egr-1 gene were selected, through the use of Egr-1 luciferase reporter assay and western blotting, from amongst approximately 3,800 oligotrophic bacteria isolated from the cultivated soils of various regions within Korea. These strains were identified as *Pseudomonas koreensis* on the basis of phylogenetic tree analysis of their 16S ribosomal DNA sequences and biochemical characteristics analyses using a variety of commercial kits (API 20NE, ID 32GN, API ZYM kits). In addition, we discovered that these strains produced anti-bacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

Key words: oligotrophic bacteria, Egr-1 gene, anti-bacterial activity, *Pseudomonas koreensis*

서 론

자연계에 존재하는 전체 미생물 종들 중에서 실제로 인공적으로 용이하게 배양되는 미생물 종은 1% 미만이고 나머지 99%에 이르는 다양한 미생물들은 현 기술상 인공배양이 되지 않거나 매우 어려운 난 배양미생물로 알려져 있다. 특히 이제까지 미생물 기능 탐색 연구는 비교적 고농도 영양조건에서 급속히 증식하는 인공배양이 잘되는 미생물을 대상으로 대부분 이루어졌으나 십 여 년 전부터 매우 낮은 저농도 영양조건하에서 느리게 증식하는 세균이 자연환경 중에 다수 존재한다는 사실이 밝혀지면서 이들 저 영양 세균(oligotrophic bacteria)자원을 대상으로 분류, 생태 및 기능탐색 연구가 다양하게 진행되고 있다[7, 8, 14, 19]. 이들 저영양성 세균자원을 대상으로 한 기능 탐색 연구는 새로운 기능 물질이나 신종 세균의 발견 가능성을 기존 미생물자원보다 대폭 높여준다.

우리는 국내의 경작지 토양으로부터 3,800여 주의 저 영양 미생물을 분리하여 이를 각각 배양하여 물질은행을 제작하고 이로부터 암 억제 유전자 발현을 유도하는 물질을 생산하는 저 영양미생물을 선발하고자 하였다. 본 연구의 항암 선발을 위한 목표 작용점은 세포의 성장과 죽음, 세포분화를 조절하는 전사 인자(transcription factor)인 Early Growth Response-1(Egr-1)[1, 4, 11]과 Egr-1 표적 유전자로서 세포주기 진행을 억제하는 $p21^{Waf1/Cip1}$ [3] 이다.

따라서 본 연구는 기존의 용이하게 배양되는 미생물 자원이 아니라 아직 탐색이 미진한 저 영양에서 자라는 미생물 자원을 대상으로 Egr-1 전사인자 발현을 증가시키는 물질을 생산하는 저영양세균들을 선발하여 항균기능을 분석하고 이들 균들을 동정하여 새로운 항암제 개발 및 친환경적인 미생물 유래 항균제 개발 등의 기초자료로 활용하기 위한 목적으로 연구를 수행하였다

재료 및 방법

사용 배지 및 균주

저 영양 세균의 분리를 위해 R2A 배지를 사용하였으며, R2A배지의 조성은 다음과 같다(Yeast extract 0.5 g; proteose peptone 0.5 g; casamino acids 0.5 g; glucose 0.5 g; soluble

*Corresponding author
Tel: +82-31-299-1691, Fax: +82-31-299-1672
E-mail: shyo556@korea.kr

starch 0.5 g; Na-pyruvate 0.3 g; K_2HPO_4 0.3 g; $MgS0_4{\cdot}7H_2O$ 0.05 g; distilled water 1000 mL; pH7). 항균성 검정을 위한 지시균으로 사용된 포도상구균(*Staphylococcus aureus* KACC13236)과 고초균(*Bacillus subtilis* KACC11247)의 증식은 tryptic soy broth 배지(TSB), 식중독 균(*Listeria monocytogenes* LMG13305)은 LEM배지(listeria enrichment media; Difco BRL)를 사용하였다.

저 영양 세균 분리, 물질은행 제작, 선발

충북 충주, 음성, 괴산, 충남 안면, 태안, 경북 안동 지역 경작지의 근권 토양을 채취하였다. 수집된 토양시료 1 g에 멸균수 9 mL을 넣고 실온에서 30분간 진탕 한 후 10^{-3}과 10^{-4} 별로 희석하여 R2A 배지에 도말 하였고 28°C에서 1주일간 배양하여 집락을 생성하는 세균만을 분리하였다. 분리된 저 영양 세균은 최종 20% 글리세롤이 첨가된 R2A배지에 넣어 -70°C에 넣어 보관하여 사용하였다. 항암, 항균력을 가진 저 영양 세균을 선발하기 위해 개개의 균주를 단독 배양하여 기능검색을 할 경우 시간이나 경비 측면에서 매우 비효율적이므로 한정된 기간 내에 막대한 수의 클론을 검색하기가 사실상 불가능하다. 따라서 384개의 균주를 10 mL의 R2A 액체배지에 개별 접종하고 28°C에서 3일간 진탕 배양하여 원심분리하였다. 각 배양액을 5 mL씩 모두 모아서 약 2 L의 ethylacetate로 추출, 감압 농축한 것을 최종 5 mL의 DMSO(dimethyl sulphoxide)로 용해하여 하나의 그룹 물질은행으로 하였다. 동시에 각 48개의 균주 배양액 2 mL씩을 모두 모아서 ethylacetate로 추출하여 감압농축한 것은 2 mL의 DMSO로 용해하여 아그룹 물질은행 시료로 한다. 또한 개개의 균주 배양액은 일회용 0.45 μm 제균 필터로 균을 제거하여 각 배양 여액을 1 mL씩 보관하여 개별 물질은행으로 -20°C 냉동고에 보존하고 항암 후보 균의 최종 선발 자원으로 사용하였다.

항암 후보물질 생산 균주의 선발 단계는 다음과 같다. 우선 384개 균주 배양액이 동시 함유된 그룹 물질은행에서 1차, 여기서 1차 선발된 그룹에 속하는 8개의 아그룹 물질은행에서 2차, 마지막으로 2차 선발된 아그룹 물질은행에 해당하는 개별 균주의 제균 배양액 48개에서 최종적으로 균주를 선발하였다.

항균활성 검정

항암 후보 균주의 항균성을 검정하기 위해 Bioscreen C 기기를 사용하였다. 사전 배양된 *S. aureus* KACC13236을 $O.D_{600nm}$(optical density at 600nm)가 0.1이 되도록 현탁시켜 Bioscreen C기기의 100well plate에 well 당 3×TSB 70 μL 접종하고 검색 대상의 1× 제균배양액 140 μL 분주한 뒤 37°C에서 흔들어 주면서 90분 간격으로 O.D. 600 nm에서 13시간 동안 균체 성장률을 경시적으로 측정하였다. 13시간 배양 후 성장이 대조군에 비해 현저히 적게 자란 것을 선발하였다.

선발된 균주 배양액의 항균성을 확인하기 위한 또 하나의 방법은 다음과 같다. 200 mL의 R2A 액체배지에 균을 접종하고 28°C에서 2일간 진탕 배양하였다. 이들 액체 배지들은 2배의 ethylacetate로 1시간 진탕 추출하여 분획 깔대기로 유기용매 층을 모아서 회전감압농축기로 농축하였다. 농축된 펠릿은 원래 배양액 부피의 1/100의 메탄올로 용해하여 항균성 검정의 시료로 사용하였다. 지시세균에 대한 항균 스펙트럼을 확인하기 위하여, 포도상구균(*S. aureus*), 고초균(*B. subtilis*)은 LB, 식중독 균(*L. monocytogenes*)은 LEM 액체배지 10 mL에 접종하고 37°C에서 하룻밤 진탕 배양한다. 그리고 200 mL의 해당 고체배지를 멸균기에서 꺼내 50°C로 식혀서 이들 배양액을 첨가, 혼합한 뒤 페트리 디시에 분주하여 각 지시균의 항균검정용 배지를 만들었다, 이들 검정용 고체배지 위에 멸균 디스크(φ 7 mm)를 얹고 해당 시료를 50 μL 접종하여 37°C 하루 밤 배양 한 후 디스크 주변 내 균 성장 저해환의 크기를 확인하는 방법으로 항균력을 확인하였다.

p21 및 Egr-1 luciferase 프로모터 리포터 활성 분석

Egr-1과 세포 주기 억제 단백질인 p21 유전자 발현에 대한 미생물 배양액의 활성 증가 효과 여부를 관찰하기 위하여, 발광성 유전자(luciferase)가 포함되어 있는 pGL3 벡터에 Egr-1과 p21유전자의 promoter 부위를 삽입한 pGL3-Luc/egr-1(-780/+1)과 pGL3-Luc/p21(-2400/+1)를 사용하였다[17]. 12-well 세포배양판에 HEK293 인간배아 신장세포를 첨가하고 0.5 μg 농도의 이들 reporter plasmid를 세포에 주입(transfection)하였다. 이때 renillar luciferase를 발현시키는 50 ng 농도의 pRL-null 플라스미드(Promega Co.)를 같이 주입하였다. 플라스미드 주입 24시간 후에 저 영양미생물 그룹 및 아그룹 물질은행 배양액를 처리하고 8-12 시간 후에 세포를 수확하였다. 세포 추출액에 luciferase 기질인 luciferin을 반응시켜 발광되는 형광을 측정함으로써, p21 및 Egr-1 유전자 프로모터 활성 정도를 분석하였다[18]. luciferase 효소 활성 측정은 dual glo-luciferase assay kit (Promega Co.)로 firefly luciferase activity를 renilla luciferase activity로 normalize한 비율로 계산하였다. 리포터 효소 활성 재현성을 위해 실험을 두 번 반복하였다.

Western blotting

Egr-1의 발현 정도는 Egr-1 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 법으로 Egr-1의 단백질 변화량을 분석하였다. 웨스턴 블롯팅을 실시하기 위하여 5×10^5개의 인간 대장암 세포주인 HCT116 세포를 60-mm 배양접시에 분주하고 10% 소의 혈청이 첨가된 DMEM(Dubcco's modified eagle's medium) 세포배양액에서 24시간 배양한 후, 각각의 균주 배양액 2 μL를 암세포에 처리하였다. 이때 Egr-1의 발현을 증가시킨

다고 알려져 있는 20 nM PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 양성 대조군으로 사용하였다. 처리 1시간 후 원심분리하여 세포를 수확하고, 1% Triton X-100, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol이 함유된 세포용해 완충액으로 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 세포질 용액을 추출하였다. 15 μg의 세포질 용액을 8% SDS-polyacrylamide(SDS-PAGE) 겔에서 전기영동하고, 분리된 단백질을 Hybond™-P(Amersham Biosciences Co.) 막에 전기적으로 부착시킨 후, 5% 탈지분유에 30분간 반응시켰다. Egr-1을 특이적으로 인지하는 항체(Santa Cruz Biotechnology Co)를 1 μg/mL의 농도가 되도록 희석한 후, 단백질이 이동 부착된 막에 각각 첨가하여 상온에서 2시간 이상 반응시켰다. GAPDH 항체(Santa Cruz Biotechnology Co.)는 SDS-PAGE 젤에 첨가한 시료의 단백질 양을 상대적으로 보정하기 위하여 사용하였다. 25 mM Tris-HCl(pH7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20이 함유된 TTBS 완충액으로 10분간 3회 세척 후, 고추냉이 페록시다아제(Horseradish peroxidase)가 결합되어 있는 anti-rabbit IgG 항체를 가하고 1시간 30분 동안 반응시켰다. TTBS 완충액으로 10분간 5회 세척 한 후 ECL(enhanced chemiluminescence; Amersham-Pharmacia Biotechnol. Co.) 기질용액을 1분간 처리한 후 X-선 필름에 노출시켜 세균 배양액에 의해 발현되는 Egr-1 단백질 양을 분석하였다.

생화학적 분석에 의한 균 동정

선발된 저 영양 세균의 생화학적 분류, 동정을 위해 상업적으로 생산되는 API 20NE, ID 32GN, API ZYM kit를 이용하였다. 또한, 선발된 길항균의 생리, 생화학적 실험을 위한 표준균주로써 2003년 본 연구원에서 신종으로 최초로 보고한 *Pseudomonas koreensis*(KACC10848)를 한국 농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양 받아 사용하였다. tryptic soy 고체배지에 시험균을 streaking하여 37°C에서 키운 균의 집락을 한 loop씩 따서 0.85% NaCl 40 mL에 현탁하여 각 키트 plate에 제공된 매뉴얼에 따라 반응시킨 뒤, 그 생화학적 반응 결과를 API사에서 제공하는 웹(www.API.com)의 database를 통해 분석하였다.

16S rDNA 분리 및 염기서열 분석

16S rDNA 증폭을 위한 기질로 사용될 Chromosomal DNA 분리는 benzyl chloride 방법으로 수행하였다. 균체에 500 μL TE buffer(100 mM Tris HCl, 40 mM EDTA pH 8.0)를 첨가하여 현탁 시킨 후 10% sodiumdodecylsulfate(SDS) 100 μL와 benzyl chloride(Katayama chemicals Co.) 300 μL 를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 이 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 상등 액에 3 M sodium acetate(pH 5.2) 10 μL를 첨가하여 잘 혼합한 후 2회에 걸쳐 phenol/chloroform/isoamyalcohol(25:24:1)로 추출하였다. 최종적으로 얻어진 상등액에 동량의 2-propanol을 첨가한 후 4°C, 30분간 원심분리 하여 DNA를 침전시키고 70% ethanol로 2회 세척한 뒤 진공건조 시켰다. 최종적으로 50 μL의 멸균수를 첨가하여 DNA를 용해하였으며 0.8% agarose gel에서 전기영동(Mupid-2, Takara Co.)하여 확인하였다. 분리한 각 시험균의chromosomal DNA로부터 16S rDNA gene을 증폭하기 위하여 fD1(5'-AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3')과 rP2(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용하여 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 30°C에서 1분30초, 72°C에서 2분간, 34 cycle로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물 중 1.5-1.6 Kb에 해당하는 단편을 0.8% agarose gel, 0.5×TAE buffer에서 100 V로 30분간 전기영동 한 후 PCR Purification Kit(Qiagen Co.)로 정제하였다. 분리된 DNA단편은 PCR 2.1 Topo TA Vector system(Invitrogen Co.)에 subcloning하여 ABI 3700(Perkin Elmer Co.) 기기로 염기서열 분석을 수행하였다.

얻어진 16S rDNA들의 염기서열 상동성은 DDBJ/NCBI/GenBank database의 Blast program을 이용하여 비교하였다. 이들의 alignment는 DNA plus version 3.0 sequence alignment program(Scientific and Educational Software)을 이용하여 병렬로 정렬하였고, MEGA version 3.0 근린 결합법에 의거하여 선발된 실험균의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

결과 및 고찰

암 억제유전자의 발현 촉진 물질 생산 균주의 선발

5개 지역의 경작지 토양시료를 평판희석법으로 저 영양 배지인 R2A 배지에 도말한 결과, 총 3,840개의 균주가 분리되어 이들을 배양하여 10개의 그룹, 80개의 아그룹 물질은행이 제작되었다. 이로부터 프로모터 reporter assay를 통해 p21과 Egr-1의 promoter를 활성화시키는 것으로 알려진 adriamycin과 근사한 활성을 나타내는 YSTC229그룹이 선발되었으며 계속하여 이것의 8개 아그룹을 대상으로 Egr-1의 promoter 활성을 분석한 결과 YSTC229-GH가 양성 대조물질인 adriamycin에 못지않은 우수한 활성을 보였다(Fig. 1). Fig. 2는 GH 아그룹에 속하는 48균주의 제균된 배양액을 시료로 처리하여 인간 대장암 세포주인 HCT116 에 처리하여 Egr-1 단백질의 발현을 웨스턴 블로팅으로 검정한 결과이다. Fig. 2에서 보는 바처럼 소수면에서 분리한 YSTC229-SSG5, SSG6, SSG10균주의 배양액을 처리한 암세포에서 음성대조군과 비교하였을 때 Egr-1 단백질 발현이 유의하게 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. Egr-1의 발현은 많은 종류의 암세포의 성장을 현저하게 감소시키며, 발암성(tumorigenesis)을 저해시킨다고 보고되었다[2]. 다양한 암세포에서 Egr-1의 발현이 감소되거나 상대적으로 부족하게 되면 암 형성이 촉진될 수 있다[5]. 또한, 사람 섬유육종 HT1080 세포

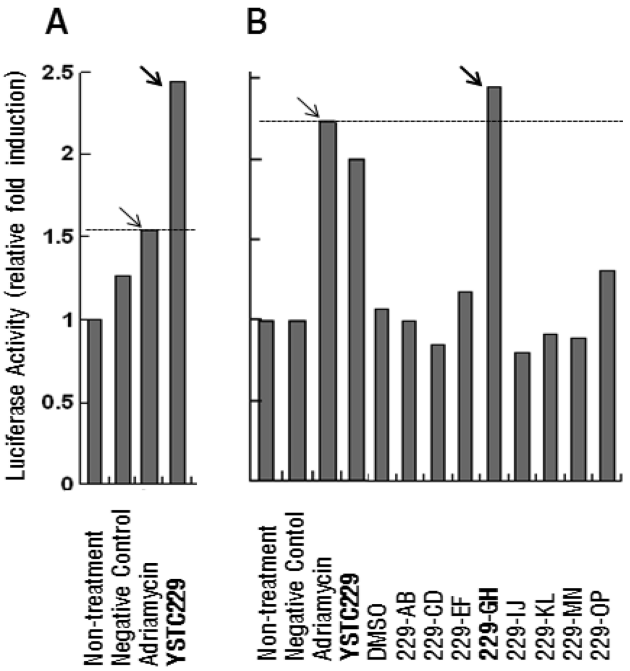

Fig. 1. Effect of YSTC229 sub-groups on the stimulation of p21 and Egr-1 promoters. HEK293 cells were transfected with 0.5 μg pGL3-Luc/p21(-2400/+1) (A) or pGL3-Luc/egr-1(-780/+1) (B), along with 50 ng of pRL-null vector endocing renilla luciferase. At 24 h post-transfection, cells were treated with culture broths of YSTC229 sub-groups for 8-12 h. Adriamycin was used as a positive control. The firefly luciferase activity was normalized to renilla activity, and the luciferase activity in the untreated cells was designated as a relative activity of it.

와 골육종 SaOS2 세포, 신경 교아세포종 U251 세포, 유방암 ZR75-1 세포 등에 Egr-1을 과다 발현시키면 암세포에서의 DNA 합성능이 감소되고 세포성장 속도가 억제되며[4], 인간 섬유성 육종 세포인 HT1080에 Egr-1 유전자를 도입시키면 TGFβ1, fibronectin, PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1) 등의 유전자 발현이 증가되어 암세포 성장이 정지되고 전이 능이 감소된다[13]. 카레의 성분인 커큐민은 Egr-1 유전자의 발현을 증가시켜 인간 뇌 암세포인 U87MG 세포의 성장을 억제시킨다고 보고되었다[3]. 이 외에도 어떤 대사물질에 의해 Egr-1의 발현이 증가되면 세포의 종류와 신호 자극 종류에 따라 세포주기 진행을 억제하는 p21유전자, 세포사멸을 유도하는 p53과 Bax 유전자, 손상된 DNA 수복에 관여하는 Gadd45 유전자, 세포 성장 억제에 관여하는 PTEN 유전자 등의 다양한 암 억제 유전자 발현을 전사 수준(transcriptional level)에서 조절함으로써, 비정상적으로 과도하게 성장하는 세포의 성장 비율을 억제하거나 과다한 DNA 손상을 받은 세포에서 세포사멸을 유도하여, 궁극적으로 암 발생 과정을 억제하는 암 억제(tumor suppressor)기능을 가지는 것으로 보고된 바 있다[1, 9]. 따라서, Egr-1 발현을 유도하는 활성 물질은 암세포 성장을 억제하는 암 치료제 개발에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 추정된다.

선발 균주의 항균효과 검정

본 실험에서 선발된 세 균주의 배양액에서 항균 물질이 존재하는가를 알기 위해 바이오스크린 C 기기를 이용해 검정하였다. 세 균주의 동정 결과에서 동일한 종으로 확인된 표준 균주인 *P. koreensis* KACC10848의 배양액과 TSB배지만을 첨가시킨 대조구에 비해 배양 13시간 후에도 이들 선발 균의 제균 배양액이 *S. aureus* 균의 생육을 Fig. 3에서 보는 바와 같이 현저히 저하시킴을 알 수 있었다. 이 사실은 선발된 세 균주의 배양액에서 *S. aureus*의 균 생육을 저해하는 항균물질이 포함되어 있음을 의미하며 이 균주들이 이를 생산한다는 것을 지적해 준다. 특히 SSG6와 SSG10균주의 배양액은 13시간 이후에도 전혀 균이 자라나오지 못함을 볼 때 배양시간이 경과함에 따라 어느 정도 균 생육이 증가하는 SSG5와는 달리 종류가 다른 강력한 항균물질이 포함되어 있거나 만약에 동일한 항균물질이라면 SSG6와 SSG10균주에서 그것의 생산량이 상대적으로 매우 높다고 추정할 수 있다. 한편 이들 균주들의 배양액으로부터 ethylacetate로 추

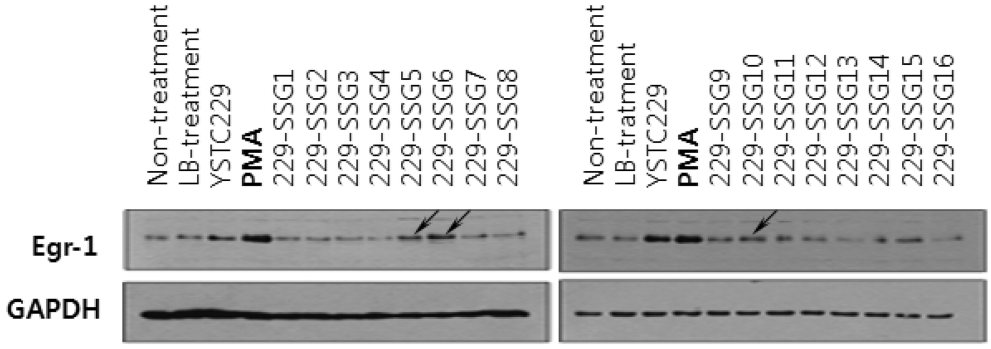

Fig. 2. Effect of individual culture broths of YSTC229-GH-subgroup on the expression of Egr-1. HCT116 cells were treated with culture broths of individual oligotrophic bacteria belonging to YSTC229-GHsubgroup. Egr-1 gene expression was analyzed by Western blotting against rabbit anti-Egr-1 antibody. PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) was used as a positive control for the expression of Egr-1. An arrow indicates the Erg-1 protein. GAPDH was used as an internal control for protein content per lane.

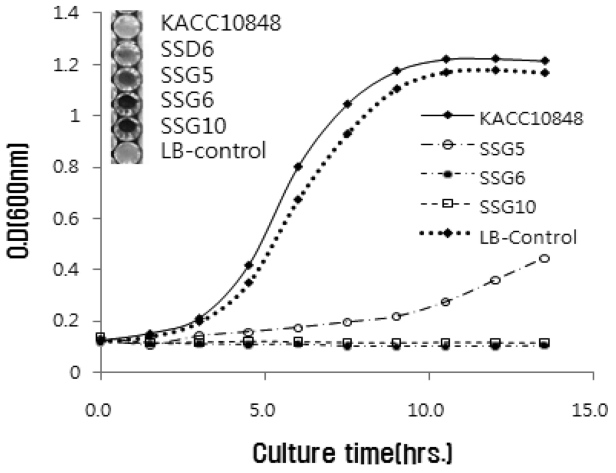

Fig. 3. Growth inhibition assay of broth cultures of three oligotrophic bacteria against *S. aureus* by Bioscreen C. The inside picture shows the growth situation of *S. aureus* in wells after 13 hours of culture time. KACC10848: *Pseudomonas koreensis* standard strain.

출하여 감압 농축한 시료를 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 식중독 균(*Listeria monocytogenes*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)이 사전 함유된 항균검정용 고체 배지 상에서 이들 지시 균에 대한 성장저해환의 크기를 확인하는 방법으로 항균력 정도를 분석한 결과, 표준 균주인 *P. koreensis* KACC10848와는 달리 선발 균주들은 세 지시 균 모두에 항균 활성을 나타내는 저지대를 보였다. 여기서 SSG5의 경우 *S. aureus*에 대한 항균활성이 Fig. 3에서 보는 바처럼 다른 두 균주에 비해 상대적으로 활성이 적게 나타났다. 그러나 *L. monocytogenes*와 *B. subtilis*에 대해서는 그 활성이 떨어지지 않음을 보여준다(Fig. 4. 화살표로 표시됨). 이 사실은 SSG5 균주가 SSG6와 SSG10과는 전혀 다른 종류의 항균물질을 생산할 가능성을 암시해준다.

선발 균주의 동정

선발된 균주를 동정하기 위해 분자생물학적 방법과 생화학적 분석을 병행했으며, 최종 확인을 위해서 2003년 본 연

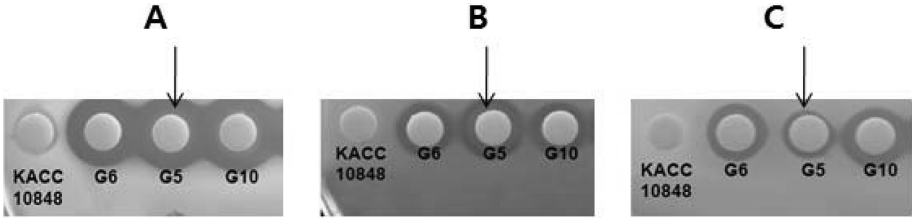

Fig. 4. Inhibitory effects of ethyl acetate extracts of broth cultures of the selected bacteria against the growth of three indicator bacteria. Indicator bacteria: A: *Bacillus subtilis,* B: *Listeria monocytogenes,* C: *Staphylococcus aureus*. Test bacteria: KACC10848: *Pseudomonas koreensis* standard strain, G5; YSTC229-SSG5, G6; YSTC229-SSG5 G10; YSTC229-SSG10.

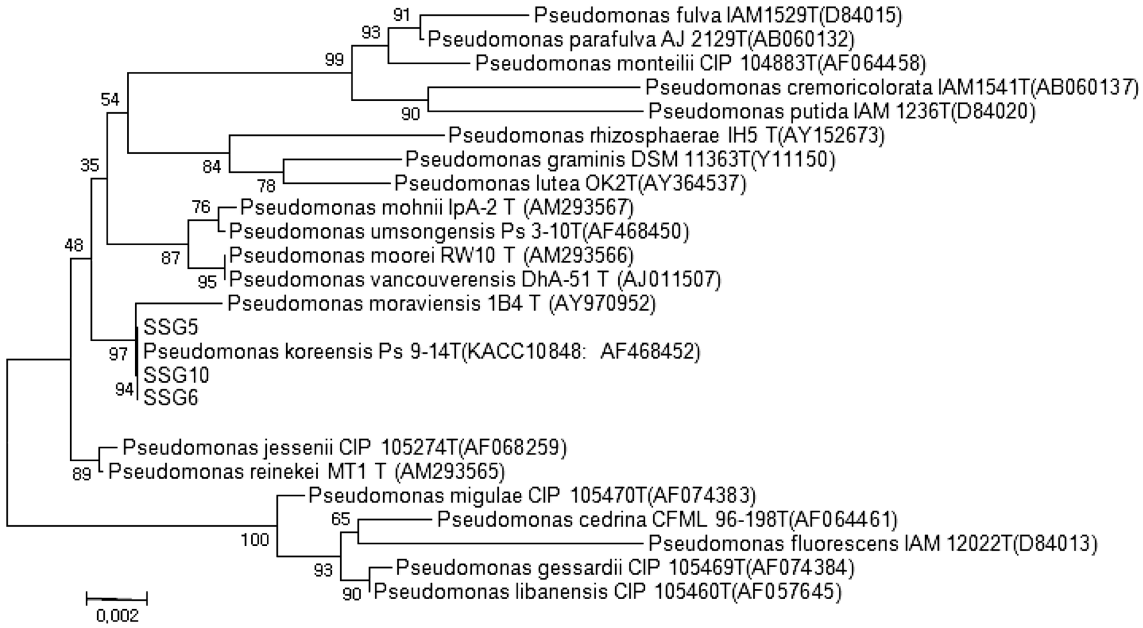

Fig. 5. Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of the *Pseudomonas* genus, showing the phylogenetic position of three oligotrophic bacteria (SSG5, SSG6, SSG10). The branching pattern was produced by the neighbour-joining method. Bootstrap values above 50% are indicated. A tree containing additional reference sequences is available as supplementary material in IJSEM Online (http://ijs.sgmjournals.org/).

구원에서 신종으로 최초로 보고된 본 발명의 균주 종의 표준균주인 *Pseudomonas koreensis* KACC10848을 대조구로 사용하였다[10]. 우선 분자생물학적 동정을 위해 시험 균주들의genomic DNA로부터 약 1.5 kb 크기의 16S rDNA를 PCR로 증폭하여 순수 정제하고 이를sequencing하였다. 이들의 염기서열들을 Blast search하여 비교 분석한 결과, 선발된 세 개의 균주들 모두가 계통분류학적으로 *P. koreensis*와 가장 유연관계가 밀접한 것으로 나타났다(Fig. 5). 이러한 결과를 바탕으로 이들의 생화학적 특성을 표준 균주인 *P. koreensis* KACC10848를 대조구로 하여 API 20NE와 API ZYM 키트에 의한 생화학적 반응을 조사하였다. API 20NE 키트의 생화학반응에서 표준 균주와 비교하였을 때 gelatin 이용성을 제외한 나머지 18종의 반응에서 일치하였고. API ZYM 키트에 의한 19종의 효소반응 검정에서는 모든 반응이 표준 균주와 동일하였다. 또한 ID 32GN 키트를 이용한 탄소원 이용성 조사에서도 itaconic acid를 제외한 31종의 탄소원 기질 이용성에도 표준 균주와 같았다(Table 1, 2, 3). 위의 결과를 최종 종합해 볼 때, 이들 선발된 세 균주는 모두 *P. koreensis*에 속하는 것으로 동정되었다. 그러나 항균활성이 거의 없는 표준 균주와 달리 이들 균주 모두가 뛰어난 항균활성을 보이는 것은 매우 흥미롭다. 현재까지 2003년 신종으로 *P. koreensis*가 처음 보고된 이후, 이 종에서 항암성이나 항균성을 가진다는 보고는 아직까지는 없다.

Table 1. Comparison of biochemical characteristics of three oligotrophic bacteria with *P. koreensis* KACC10848 of standard specie by API 20NE kit.

Active ingredients	KACC 10848	SSG5	SSG6	SSG10
Potassium nitrate	−	−	−	−
L-tryptophane	−	−	−	−
D-glucose	−	−	−	−
L-arginine	−	+	+	−
Urea	±	±	±	±
Esculin ferric citrate	−	−	−	−
Gelatin(bovine origine)	−	+	+	+
p-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	−	−	−	−
D-glucose	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	+
D-maltose	−	−	−	−
Potassium gluconate	+	+	+	+
Capric acid	+	+	+	+
Adipic acid	−	−	−	−
malic acid	+	+	+	+
Trisodium citrate	+	+	+	+
Phenylacetic acid	−	−	−	−

Table 2. Comparison of carbon sources availability of three oligotrophic bacteria with *P. koreensis* KACC10848 of standard specie by API ID32N kit

Carbon sources	KACC 10848	SSG5	SSG6	SSG10
L-Rhamnose	−	−	−	−
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	−
Inositol	−	−	−	−
D-Saccharose (sucrose)	−	−	−	−
D-Maltose	−	−	−	−
Itaconic acid	+	−	−	−
Suberic acid	-	−	−	−
Sodium Malonate	+	+	+	+
Sodium Acetate	+	+	+	+
Lactic acid	+	+	+	+
L-Alanine	+	+	+	+
Potassium 5-Ketogluconate	−	−	−	−
Glycogen	−	−	−	−
3-Hydroxybenzoic acid	−	−	−	−
L-Serine	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
Salicin	−	−	−	−
D-Melibiose	−	−	−	−
L-Fucose	−	−	−	−
D-Sorbitol	−	−	−	−
L-Arabinose	+	+	+	+
Propionic acid	+	+	+	+
Capric acid	+	+	+	+
Valeric acid	+	+	+	+
Trisodium-Citrate	+	+	+	+
L-Histidine	+	+	+	+
Potassium 2-Ketogluconate	+	+	+	+
3-Hydroxy Butyric acid	+	+	+	+
4-Hydroxy Benzoic acid	+	+	+	+
L-Proline	+	+	+	+

Table 3. Comparison of enzyme activities of three oligotrophic bacteria with *P. koreensis* KACC10848 of standard specie by API ZYM kit

Enzymes	KACC 10848	SSG5	SSG6	SSG10
Control	0	0	0	0
Alkaline phosphatase	0	1	0	0
Esterase (C4)	2	1	2	1
Esterase lipase (C8)	3	4	4	3
Lipase (C14)	0	0	0	0
Leucine arylamidase	4	3	4	4
Valine arylamidase	0	0	0	1
Cystine arylamidase	0	0	0	0
Trypsin	0	0	0	0
α-chymotrypsin	0	0	0	0
Acid-phosphatase	3	5	5	5
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	2	2	2	2
α-Galactosidase	0	0	0	0
β-Galactosidase	0	0	0	0
β-Glucuronidase	0	0	0	0
α-Glucosidase	0	0	0	0
β-Glucosidase	0	0	0	0
N-Acetyl-β-glucosaminidase	0	0	0	0
α-Mannosidase	0	0	0	0
α-Fucosidase	0	0	0	0

요 약

전국 경작지 토양에서 분리한 저 영양 세균 3,800주를 대상으로 암 억제유전자의 작동과 관여하는 전사인자인 Egr-1의 promoter 활성화를 유도하는 세 균주(SSG5, SSG6, SSG10)가 Egr-1 reporter assay와 western blotting 분석으로 최종 선발되었다. 이들 선발 균주들은 16S rDNA와 상업용 생화학적 키트(API 20NE, API ZYM, ID 32GN) 분석에 의해 모두 *Pseudomonas koreensis*인 것으로 최종 동정되었다. 이들 균주들은 Egr-1 발현을 유도하는 물질뿐만 아니라 다양한 세균의(*B. subtilis*, *S. aureus,* and *L. monocytogenes*) 성장을 저해하는 항균물질도 생산하는 것을 확인하였다.

Acknowledgment

This study was supported by the BioGreen 21 grant PJ007084, and the National Academy of Agricultural Science grant PJ006703 of Rural Development Administration.

REFERENCES

1. Baron, V., E. Adamson, A. Calogero, G. Ragona, and D. Mercola. 2005. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFb1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther.* **13**: 115 doi:10.1038/sj.cgt.7700896.
2. Calogero, A., V. Lombari, G. De Gregorio, A. Porcellini, S. Ucci, A. Arcella, R. Caruso, F. M. Gagliardi, A. Gulino, G. Lanzetta, L. Frati1, D. Mercola, and G. Ragona1. 2004. Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int.* **4**: 1-12.
3. Choi, B. H., C. G. Kim, Y. S. Bae, Y. H. Lim, Y. H. Lee, and S. Y. Shin. 2008. p21Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: Role of early growth response-1 expression. *Cancer Res.* **68**: 1369-1377.
4. Huang, R.-P., C. Liu, Y. Fan, D. Mercola, and E. Adamson. 1995. Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res.* **55**: 5054-5062.
5. Huang, R. P., Y. Fan, I. de Belle, C. Niemeyer, M. M. Gottardis, D. Mercola, and E. Adamson. 1997. Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int. J. Cancer.* **72**: 102-109.
6. Ishida, Y. and H. Kadota. 1981. Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. *Microbiol. Ecol.* **7**: 123-130.
7. Kim, D. G., Y. S. Yeo, S. W. Kwon, K. S. Jang, C. M. Lee, M. H. Lee, S. J. Kim, B. S. Koo, and S. H, Yoon. 2010. Identification of the oligotrophic bacteria strain 7F biocontrolling *Phytophthora* blight disease of Red-pepper. *Res. Plant Dis.* **16**: 41-47.
8. Kim, S. J., M. Y Kim, B. S. Koo, S. H Yoon, Y. S. Yeo, I. C. Park,. Y. J Kim, J. W. Lee, and K. S. Whang. 2005. Isolation and phylogenetic characterization of chitinase producing oligotrophic bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **41**: 293-299.
9. Krones-Herzig, A., S. Mittal, K. Yule, H. Y. Liang, C. English, R. Urcis, T. Soni, E. D. Adamson, and D. Mercola. 2005. Early growth response 1 protein, early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Research*. **65**: 5133-5143.
10. Kwon, S. W., J. S. Kim, I. C. Park, S. H. Yoon, D. H. Park, C. K. Lim, and S. J. Go. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 21-27.
11. Liu, C., A. Calogero, G. Ragona, E. Adamson, and D. Mercola. 1996. EGR-1, the reluctant suppression factor. *Crit. Rev. Oncog.* **7**: 101-125.
12. Liu, C., V. M. Rangnekar, E. Adamson, and D. Mercola. 1998. Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther.* **5**: 3-28.
13. Liu, C., J. Yao, I. de Belle, R. P. Huang, E. Adamson, and D. Mercola. 1999. The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* **274**: 4400-4411.
14. Ohta, H. and T. Hattori. 1980. Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil Sci. Plant Nutr.* **26**: 99-107.
15. Ragione, F. D., V. Cucciolla, V. Criniti, S. Indaco, A. Borriello, and V. Zappia. 2003. p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *J. Biol. Chem.* **278**: 23360-23368.
16. Shin, S. Y., Y. Y. Bahk, J. S. Ko, I. Y. Chung, Y. S. Lee, J. Downward, H. Eibel, P. M. Sharma, J. M. Olefsky, Y. H. Kim, B. H. Lee, and Y. H. Lee. 2006. Suppression of Egr-1 transcription through targeting of the serum response factor by oncogenic H-Ras. *EMBO J.* **25**: 1093-1103.
17. Shin, S. Y., Y. Y. Bahk, J. S. Ko, I. Y. Chung, Y. S. Lee, J. Downward, H. Eibel, P. M. Sharma, J. M. Olefsky, Y. H. Kim, B. H. Lee, and Y. H. Lee. 2006. Suppression of Egr-1 transcription through targeting of the serum response factor by oncogenic H-Ras. *Cellular Signalling*. **25**: 1093-1103.
18. Shin, S. Y., S. Y. Kim, J. H. Kim, D. S. Min, J. Ko, U.-G. Kang, Y. S. Kim, T. G. Kwon, M. Y. Han, Y. H. Kim, and Y. H. Lee. 2001. Induction of early growth response 1 gene expression by calmodulin antagonist trifluoperazine through the activation of Elk-1 in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 7797-7805.
19. Whang, K. and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leewenhoke.* **54**: 19-36.