

# *Rahnella aquatilis* AY2000균 유래의 항 효모물질의 작용양상

박해지<sup>1</sup> · 강민정<sup>1</sup> · 이종환<sup>2</sup> · 김광현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 자연과학대학 생명응용학과, <sup>2</sup>동의대학교 공과대학 생명공학과

## Action Pattern of Anti-Yeast Substance Originated from *Rahnella aquatilis* Strain AY2000

Hae-Ji Park<sup>1</sup>, Min-Jung Kang<sup>1</sup>, Jong-Hwan Lee<sup>2</sup>, and Kwang-Hyeon Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science and Biotechnology,

<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Republic of Korea

(Received March 15, 2011 / Accepted May 27, 2011)

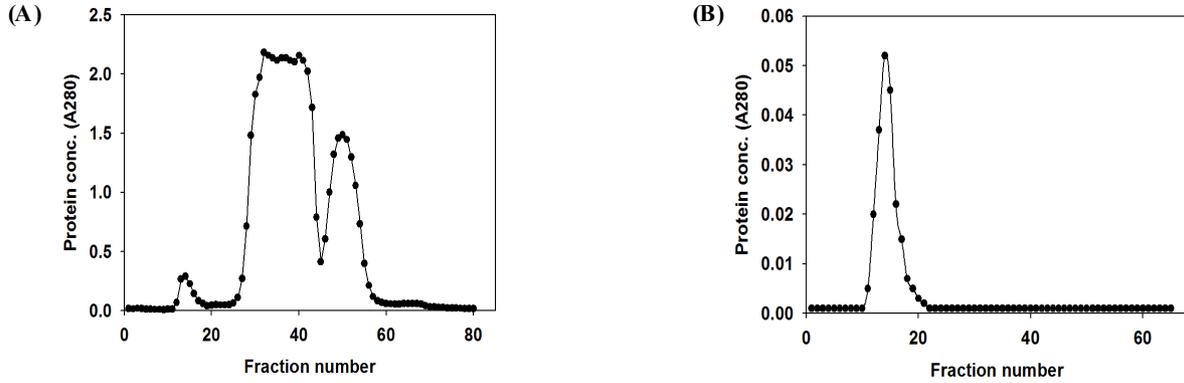
For reduction of side effects by anti-fungal agents, a less toxic anti-fungal substance or a synergistic substance with a new mechanism is needed. The anti-yeast substance (AYS) originated from *Rahnella aquatilis* strain AY2000 is like to be a heterogeneous protein. The AYS inhibited the growth of *Candida albicans* in culture broth, and AYS-treated cells were arrested in each phase during cell cycle. Among AYS-treated cells, the population of the cells belonging to sub-G1 phase was not increased during cell cycle. Therefore, AYS has rather yeaststatic than yeasticidal effect to *C. albicans*. Moreover, with combination of itraconazole or fluconazole, AYS had a synergistic anti-yeast activity against *Saccharomyces cerevisiae* based on the analysis of fractional inhibitory concentration index.

**Keywords:** *Rahnella aquatilis*, anti-fungal substance, anti-yeast, cell cycle, synergistic activity

오늘날 사용되는 항 진균제는 화학적으로 안정한 저 분자 물질(2, 14, 17)로서 그 수가 제한되어 있으며(10, 17), 내성 균의 출현과 인체에 많은 부작용 유발(3, 12) 때문에 비교적 부작용이 적은 새로운 항 진균제의 개발이 끊임없이 진행되고 있다(1, 5, 6, 9). 이런 관점에서 *R. aquatilis* AY2000 유래의 항 효모물질(Anti-yeast substance; AYS)(18)은 고분자 물질(8)로서 새로운 개념의 항 진균제로 인체에 대한 부작용이 적을 가능성이 있다. 또한 만일 AYS가 기존의 항 진균제와 혼용할 경우 상승효과를 가진다면 기존 항 진균제의 양을 줄일 수 있어 인체에 대한 부작용도 완화시킬 가능성이 있다. 따라서 본 연구의 목적은 1) AYS의 효모생육억제 현상을 세포주기 및 연계시켜 해석하고, 2) 또한 AYS가 기존의 항 진균제와 혼용하면 상승효과를 나타내는지를 검토코자 하였다. 먼저 AYS를 더욱 정제하기 위해 Kang 등(8)이 기술한 AYS 시료(중량 80 mg)를 10 mM acetate buffer (pH 4.1) 4 ml에 용해시킨 후 AYS에 함유된 1 mg 당에 대해 100 unit pectinase (Fluka 17389)를 가하여 효소반응(50°C, 20 min)을 행하였다.

이어서 4°C에서 Sephacryl S400HR gel filtration (Φ1.6×60 cm, Pharmacia, Flow rate 44 ml/h)을 행한 결과 3개의 peak (Fig. 1A) 중 peak 1 (fraction no.12-18)에서만 항 효모활성(15)이 있었다. 이 peak 1에 속한 분획만을 모아서 동결 건조시킨 후 동일한 column에 2차 gel filtration을 행하여 정제된 AYS를 얻었다(Fig. 1B). 또한 정제된 AYS의 당과 단백질의 비율은 sugar/protein=15.2/1-14.6/1로 당이 단백질에 비해 약 15배 정도 많았으며, *S. cerevisiae*에 대한 MIC는 2.5-5.2 µg/ml (protein 기준)로 산출되었다. 이때 당과 단백질은 각각 phenol-sulfuric acid법(4)과 Lowry법(13)으로 측정하였으며, 각각 glucose와 bovine serum albumin (BSA)을 기준으로 산출하였다. 정제된 AYS는 native PAGE (16)를 행한 결과 분자량이 너무 커서 front line에서 전혀 이동하지 못하였으나(Fig. 2A), SDS-PAGE (11)를 행한 결과 43 kDa와 150 kDa인 2개의 polypeptide를 확인하였다(Fig. 2B). 또한 AYS를 20 unit proteinase K로 처리(37°C, 1 h, 10 mM Tris-HCl buffer; pH 7.5)하면 효소처리 전 AYS의 MIC는 5 µg/ml에서 효소처리 후에는 MIC가 125 µg/ml 이상을 나타내었으나, 여러 가지 당 가수분해 효소들(β-glucosidase, cellulase, inulinase, invertase

\* For correspondence. E-mail: kimkh@deu.ac.kr; Tel: +82-51-890-1533; Fax: +82-51-890-1532

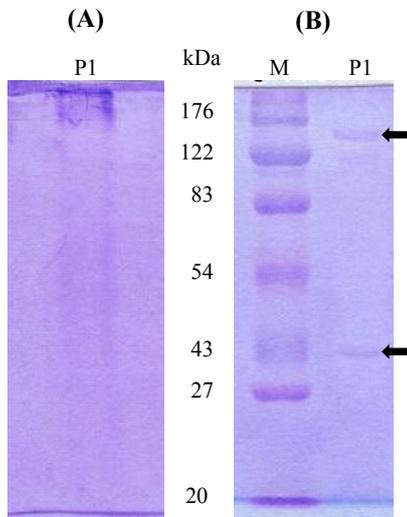


**Fig. 1.** Sephacryl S400HR gel filtration after pectinase treatment (A) and the 2<sup>nd</sup> Sephacryl S400HR gel filtration from peak 1 (B).

와 pectinase)로 처리한 AYS의 MIC (5 µg/ml)는 그대로 유지되어 AYS 활성과 직접 관련된 물질은 protein임을 확인하였다. 한편 AYS는 *S. cerevisiae* 뿐만 아니라 병원체인 *C. albicans* 생육도 저해한다(18). 그러나 AYS의 항 효모작용이 살균작용인지 혹은 정균작용인지 명확하지 않아서 AYS의 생육저해현상을 세포주기와 연관시켜 해석하고자 AYS가 *C. albicans*의 cell cycle에 미치는 영향을 Stover 등(19)이 기술한 방법에 따라 행하였다. 그 결과 처음 cell cycle 단계는 AYS처리 세포(G1; 51.63%, S; 16.12%, G2/M; 31.76%)나 미처리 세포(G1; 65.61%, S; 13.84%, G2/M; 20.33%) 모두 G1 > G2/M > S기에 속하는 세포들의 순서로 많았다(Fig. 3A). AYS 미처리 세포인 경우 2시간 후에는 G1기(67.54%)와 S기 세포(17.99%)는 약간 증가하였으나, G2/M기 세포

(12.73%)는 오히려 감소하였다(Fig. 3B). 또한 4시간 후에는 G1기 세포(36.67%)가 많이 줄었고, S기 세포(17.35%)는 거의 동일하였으나, G2/M기에 속하는 세포(44.54%)는 오히려 증가하였으며(Fig. 3C), 6시간 후에는 각 세포주기에 속하는 세포들의 분포는 G1기(63.24%), S기(17.55%), G2/M기(17.70%)로 G1 > G2/M = S의 순으로 세포주기가 진행되고 있음을 나타내었다(Fig. 3D). 한편 AYS처리 세포는 6시간이 경과된 후에도 G1기(49.28%), S기(17.37%), G2/M기(31.79%)의 분포로 거의 변화 없이 처음 cell cycle 단계에서 그대로 머물러 있었다(Figs. 3B-D). 이 현상은 AYS가 *C. albicans*의 세포주기를 정지시키는 작용을 행하고 있음을 나타내고 있으며, 또한 대수증식기에 있는 *C. albicans*에 AYS를 첨가한 시점에서 곧 바로 세포생육이 정지되는 현상(Fig. 4)이 설명되고 있다. 그러나 cell cycle 진행 과정에서 AYS로 처리된 세포는 모두 세포주기가 정지되었지만, 사멸세포(sub G1기)에서 수적인 변화(1.19-2.19%)는 극히 미미한(Figs. 3A-D) 결과로 보아 AYS는 효모를 직접 사멸시키기 보다 그 생육을 억제시키거나 지연시키는 작용을 가진 물질이라고 사료된다. 정제된 AYS와 기존 항 진균제의 병용효과는 Johnson 등(7)이 기술한 방법으로 행하였다. 즉, 각 항 진균제 단독에 대한 MIC와 각 항 진균제와 AYS 혼합액에 대한 MIC를 측정 후 이들MIC값에서 각 항 진균제들에 대한 FIC (fractional inhibitory concentration)를 산출한 후  $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B$  (A and B are the two drugs in the well)을 사용하여 FIC index 분석을 행하였으며, AYS의 MIC값은 protein 함량으로 나타내었다. 그 결과 amphotericin B와 AYS의 혼합이나 nystatin과 AYS의 혼합실험에서 측정된 MIC를 근거로 FIC index를 산출한 결과는 각각 1.000과 1.036으로 이들 2약제는 AYS와 서로 상승이나 억제효과를 나타내지 않았다. 한편, itraconazole과 AYS의 혼합이나 fluconazole과 AYS의 혼합실험에서 측정된 MIC를 근거로 FIC index를 측정된 결과는 각각 0.394와 0.500으로 itraconazole이나 fluconazole은 단독사용보다 AYS와 병용하면 항 효모 활성이 더욱 증가되었다(Table 1).

결론적으로 AYS는 효모에 대한 살균작용(yeastcidal action)



**Fig. 2.** Pattern on none SDS-PAGE (A) and SDS-PAGE (B) of AYS after the 2<sup>nd</sup> Sepharose S400HR gel filtration. Electrophoresis was performed on 8% separation gel and 4% stacking gel. P1 and M was indicated AYS purified and a molecular marker (ProSieve color protein marker; MW10<sup>3</sup>176 kDa, Lonza Rockland Inc.) on SDS-PAGE respectively.

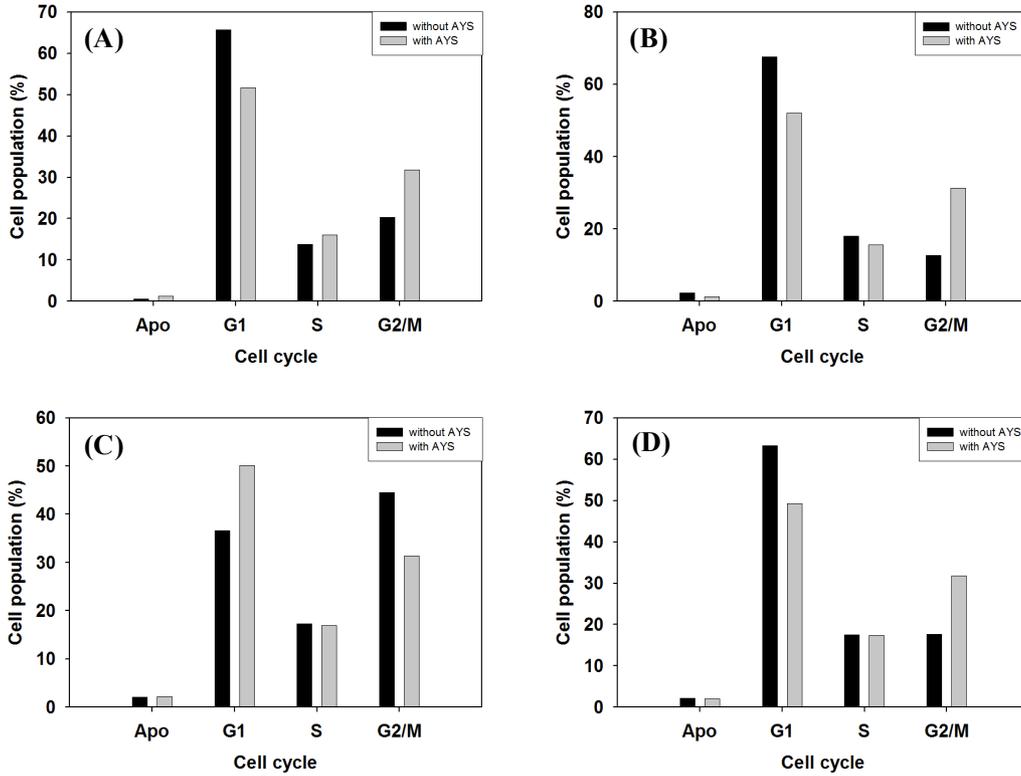


Fig. 3. Flow cytometric analysis of *C. albicans* by AYS treatment. Cell population was analyzed at 0 h (A), 2 h (B), 4 h (C) and 6 h (D).

보다 정균작용(yeaststatic action)을 가진 일종의 단백질성 물질로 구성된 새로운 항 진균 물질이며, 기존 azole계의 항 진균제와 병용하면 상승효과를 가짐으로 인체에 적용 시 부작용을 최소화 할 수 있을 것이라고 생각된다.

### 적요

항 진균제의 인체에 대한 부작용을 완화시키는 방법은 부작용이 적은 새로운 항 진균제 개발이나 기존 항 진균제와 혼

용하여 상승효과를 나타내는 물질이 필요하다. 이를 위해 *Rahnella aquatilis* AY2000가 생산하는 항 효모물질은 일종의 단백질성 고분자 물질이란 점에서 기존 항 진균제와 차이가 있다. 이 항 효모물질은 유도기나 대수증식기에 있는 효모생육을 억제시켰으며, cell cycle 분석에서 sub-G1기에 속하는 세포수의 증가 없이 세포를 arrest시켰다. 따라서 항 효모물질은 *Candida albicans*에 정균작용을 나타내었다. 또한 *in vitro* 실험에서 이 항 효모물질과 itraconazole이나 fluconazole을 병용한 후 fractional inhibitory concentration index 분석을 행한 결과 항 효모활성이 더욱 상승되었다. 결론적으로 이 항 효모물질은 정균 작용을 가질 뿐만 아니라 azole계의 항 진균제와 혼용하면 상승효과를 가짐으로 부작용이 적은 새로운 개념의 항 진균제로 개발할 가치가 있을 것이라고 생각된다.

### 감사의 말

이 논문은 2010학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(과제번호 2010AA104).

### 참고문헌

1. Brooker, N.L., Y. Kuzimichev, J. Laas, and R. Pavlis. 2007. Evaluation of coumarin derivatives as anti-fungal agents against soil-borne fungal pathogens. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 72, 785-793.

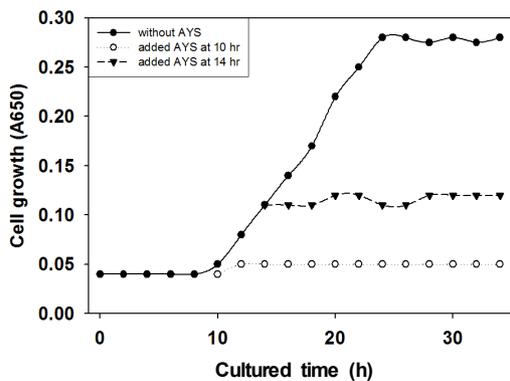


Fig. 4. Growth inhibition of *C. albicans* by AYS in YM broth.

**Table 1.** Effect of anti-yeast activity by combination of the AYS and a commercial fungicide

|         | Fungicide6         | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |             |       | $\Sigma\text{FIC}^a$ |
|---------|--------------------|--------------------------|-------------|-------|----------------------|
|         |                    | Alone                    | Combination | FIC   |                      |
| Group 1 | Amphotericin B (A) | 2.500                    | 1.250       | 0.500 | 1.000                |
|         | AYS (B)            | 5.000                    | 2.500       | 0.500 |                      |
| Group 2 | Nystatin (A)       | 5.000                    | 0.180       | 0.036 | 1.036                |
|         | AYS (B)            | 5.000                    | 5.000       | 1.000 |                      |
| Group 3 | Itraconazole (A)   | 1.250                    | 0.180       | 0.144 | 0.394                |
|         | AYS (B)            | 20.000                   | 5.000       | 0.250 |                      |
| Group 4 | Fluconazole (A)    | 20.000                   | 5.000       | 0.250 | 0.500                |
|         | AYS (B)            | 20.000                   | 5.000       | 0.250 |                      |

Each commercial fungicide (20  $\mu\text{g/ml}$ , w/v) and AYS (40  $\mu\text{g/ml}$ , protein conc.) were applied in this experiment. <sup>a</sup> The FIC index is the sum of the FICs of each of the drugs, which in turn is defined as the MIC of each drug when it is used in combination divided by the MIC of the drug when it is used alone. The interaction was defined as synergistic if the FIC index was less than or equal to 0.50, indifferent if the FIC index was greater than 0.50 and less than or equal to 4.0, and antagonistic if the FIC index was greater than 4.0.

- Cohen, B.E. 1998. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int. J. Pharm.* 162, 95-106.
- Collazos, J., J. Mayo, E. Martínez, and F. Díaz. 1995. Unusual liver toxicity due to the new antifungal agents fluconazole and itraconazole. *Inter. Hepatol. Commun.* 3, 112-115.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1951. A colorimetric method for determination of sugars. *Nature* 168, 167.
- Garibotto, F.M., A.D. Garro, M.F. Masman, A.M. Rodriguez, P.G.M. Luiten, M.R.S.A. Zacchino, C. Somlai, B. Penke, and R.D. Enriz. 2010. New small-size peptides possessing antifungal activity. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 158-167.
- Hou, X., S.M. Boyetchko, M. Brkic, D. Olson, A. Ross, and D. Hegedus. 2006. Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 644-653.
- Johnson, M.D., C. MacDougall, L. Ostrosky-Zeichner, J.R. Perfect, and J.H. Rex. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 693-715.
- Kang, M.J., B.K. Lee, E.-W. Lee, and K.H. Kim. 2008. Physicochemical properties of an anti-yeast substance produced by *Rahnella aquatilis* strain AY2000. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 285-290.
- Kim, H.S. and Y.I. Park. 2008. Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 418-421.
- Kirchgessner, M., DVM. 2008. Therapeutic review amphotericin B. *J. Exotic Pet Medicine.* 17, 54-56.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LeBrun, M., L. Grenier, P. Gourde, M.G. Bergeron, G. Labrecque, and D. Beauchamp. 1996. Nephrotoxicity of amphotericin B in rat: Effects of the time of administration. *Life Sci.* 58, 869-876.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Menegola, E., M.L. Broccia, F.D. Renzo, and E. Giavini. 2006. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reprod. Toxicol.* 22, 186-195.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Tentative standard M27-T. NCCLS, Vilanova, PA, USA.
- Otto, M. and M. Snejdarkova. 1981. A simple and rapid method for the quantitative isolation of proteins from polyacrylamide gels. *Anual. Biochem.* 111, 111-114.
- Patton, L.L., A.J. Bonito, D.A. Shugars, and C. Hill. 2001. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Radiol. Endod.* 92, 170-179.
- Ryu, E.J., H.W. Kim, B.W. Kim, H.J. Kwon, and K.H. Kim. 2006. *Rahnella aquatilis* strain AY2000 produces an anti-yeast substance. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 1597-1604.
- Stover, A.G., L. Witek-Janusseck, and H.L. Mathews. 1998. A method for flow cytometric analysis of *Candida albicans* DNA. *J. Microbiol. Methods* 33, 191-196.