

분산변이주 *Archangium gephyra* KYC5002의 자실체 발달과 포자 형성에 대한 정량적 분석

김지하 · 유익상 · 박서희 · 조경연* 

호서대학교 생명공학과

Quantitative analysis of the fruiting body development and sporulation of the dispersion mutant *Archangium gephyra* KYC5002

Jiha Kim, Uisang Yu, Seohui Park, and Kyungyun Cho* 

Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Republic of Korea

(Received October 11, 2022; Revised November 24, 2022; Accepted November 27, 2022)

Fruiting body development and glycerol spore formation of the myxobacterium *Archangium gephyra* have been quantitatively analyzed using the KYC5002 strain, which grows in a dispersed manner in liquid media. KYC5002 formed many fruiting bodies that are smaller in size than those of the wild-type strain on various agar media and developed the most intact fruiting bodies on MMC agar plates composed of 10 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, 8 mM MgSO₄, 0.015% casitone, and 3% agar. Fruiting bodies developed when the cell suspension concentration was 5×10^8 – 5×10^9 cells/ml, but no fruiting bodies were formed at cell suspension concentrations higher or lower than that. The long and thin vegetative cells transformed into thick and short fruiting body spores in the fruiting bodies. Transformation into glycerol spores was possible at all time points in liquid culture, but it was achieved with high efficiency during the period of vigorous cell growth, yet with low efficiency during the stationary phase. The produced glycerol spores were morphologically similar to the fruiting body spores, and showed resistance to ultrasound and heat; however, its heat resistance was lower than that of the spores of the fruiting body.

Keywords: *Archangium gephyra*, fruiting body, glycerol spore, myxobacteria

일부 세균 종류들은 영양분을 이용하여 성장하다 영양분이 고갈되면 여러 물리, 화학적인 환경 인자에 저항성을 가진 포자를 생성한다. 가장 잘 알려진 예로 *Bacillus*와 *Clostridium* 속들은 내생포자를 생성하며(Higgins and Dworkin, 2012), 방선균들은 기균사에 포자를 형성한다(Flårdh and Buttner, 2009). 점액세균도 영양분이 고갈되면 포자를 형성한다(Shimkets, 1990). 하지만 점액세균의 포자 형성 방식은 다른 세균들과 다르다. 점액세균은 가늘고 긴 간균 형태의 세균으로 주변에 이용 가능한 영양분이 풍부하면 다른 세균들과 마찬가지로 영양 성장을 한다. 그러다 영양분이 고갈되면 운동성을 가진 수십만 마리의 세균들이 한 점으로 모여 다세포 자실체 구조물을 형성하고, 각각의 세포들이 구조물 안에서 환경에 저항성이 있는 구형, 타원형, 또는 굵고 짧은 간균 형태의 자실체 포자로 변형된다. 자실체의 형성과 자실체 포자로의 변형에는 최소한 24-48시간이 필요하며 성숙에는 더 긴 시간이 필요하다. 자실체의 포자 집단은 주변의 영양분이 풍부해지면 동시에 발아하여 다시 영양세포 집단을 이루어 생활하게 된다(Reichenbach, 2005; Shimkets *et al.*, 2006). 점액세균은 종(species)에 따라 다양한 형태의 자실체를 형성한다(Dawid, 2000; Reichenbach, 2005; Shimkets *et al.*, 2006).

점액세균은 자실체 포자 형성 외에 다른 방식으로도 포자를 생성한다고 알려져 있다. 점액세균의 배양액에 글리세롤(glycerol) 또는 다이메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 첨가해 주면 개별 영양세포들이 2-8시간 만에 독립

*For correspondence. E-mail: kycho@hoseo.edu;
Tel.: +82-41-540-5627; Fax: +82-41-540-9538

적으로 포자로 변형되는데, 이를 글리세롤 포자라 부른다 (Dworkin and Gibson, 1964; Reichenbach *et al.*, 1969; Galván *et al.*, 1992). 글리세롤 포자의 형성에는 자실체 포자 형성과는 달리 영양분 고갈이 필요하지 않아 세포들이 왕성히 성장하는 시기에 포자 형성이 잘 이루어진다(Dworkin and Sadler, 1966). 글리세롤 포자는 외형적으로 자실체 포자와 유사하여 일반 광학현미경으로는 구분되지 않는다. 하지만 투과전자 현미경 관찰에 의하면 자실체 포자의 외피는 글리세롤 포자의 외피 보다 더 두껍고 정교하며(Inouye *et al.*, 1979; Galván *et al.*, 1992), 단백질 발현 양상도 다르다(Komano *et al.*, 1980; O'Connor and Zusman, 1992). 글리세롤 포자는 자실체 포자에 비해 열, 자외선 조사, 초음파에 저항성이 조금 약하지만 영양세포보다는 저항성이 훨씬 강한 것으로 알려져 있다(Sudo and Dworkin, 1969).

점액세균을 연구할 때 겪게 되는 어려움 중 하나는 액체배지에서 세포들이 응집되어 성장하므로 정량적 분석이 어렵다는 점이다. 세포들이 응집하는 경우 배양액의 세포농도 측정이 어렵게 되는데, 흡광도 측정에 의한 세포농도 측정은 물론이고 희석에 의한 생균수 계수도 곤란하게 된다. 세포의 농도를 측정하지 못하면 배양 중인 세포의 상태에 대해서도 알기 어렵다. 이에 더해, 세포들이 응집되어 있으면 형질전환, 선별 등에 장애가 발생하므로 균주의 유전자 조작이 어려워진다. 점액세균 중 가장 연구가 많이 된 *Myxococcus xanthus*의 경우에는 액체배지에서 분산 성장하면서도 온전한 자실체를 형성하는 분산변이주인 FB 균주를 이용하게 되면서 이러한 문제들이 해결되었다(Dworkin, 1962).

*Archangium gephyra*는 *Myxococcales* 목(order)의 *Cystobacterineae* 아목(suborder)에 속하는 점액세균 종(species)이다. *Cystobacterineae* 아목 내에서 *Myxococcus* 속(genus)은 *Myxococcaceae* 과(family)에 속하며, *Archangium* 속은 *Cystobacteraceae* 과에 속한다. *Archangium gephyra*는 포자 덩어리가 무질서하게 쌓인 산등성이 형태의 자실체를 형성하며, 포자는 굵고 짧은 간균 형태이다(Reichenbach, 2005). *Archangium gephyra* 유래 이차대사 생리활성물질로는 gephyronic acid (Sasse *et al.*, 1995), melithiazol (Sasse *et al.*, 1999), tubulyisin (Sasse *et al.*, 2000), argyirin (Sasse *et al.*, 2002), archazolid (Sasse *et al.*, 2003), aurafuron (Kunze *et al.*, 2005) 등이 있다. *Archangium gephyra* KYC2615는 국내 토양에서 분리된 균주로 argyirin과 tubulyisin을 생산한다(Hyun *et al.*, 2021). *Archangium gephyra* KYC5002는 KYC2615 균주의 자연 분산변이주로 액체배지에서 분산하여 성장하므로(Choi *et al.*, 2021) 세포 농도에 대한 정량적인 분석이 가능하다. 따라서 본

연구에서는 *A. gephyra* KYC5002를 대상으로 자실체와 글리세롤 포자 형성의 정량적 조건에 대해 조사하고 생성된 포자의 형태와 열저항성을 조사하여 보았다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지, 배양 조건

Archangium gephyra KYC5002 (MEHO_002) 균주는 국내 토양에서 분리된 *A. gephyra* KYC2615의 분산변이주이다(Choi *et al.*, 2021). *Archangium gephyra*의 일반적 배양을 위해서는 CYS 배지(Shin *et al.*, 2013)를 사용하였다. 자실체 형성 유도를 위해서는 CHM (Hyun *et al.*, 2019), CF (Shi *et al.*, 1994), WC와, WCE (Lee *et al.*, 2014), 그리고 MMC 배지를 사용하였다. MMC 배지는 10 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS, pH 7.6), 8 mM MgSO₄, 0.015% casitone을 함유하고 있었다. 자실체 형성 유도를 위해 사용된 모든 한천배지는 3.0% 한천을 넣어 제조하였다. WCE 제조를 위해 사용된 먹이 미생물로는 *Eshcherichia coli* K-12를 사용하였다. *Archangium gephyra*는 32°C에서 배양하였다.

자실체 포자 형성 유도

Archangium gephyra KYC5002 균주를 CYS 액체배지에서 600 nm에서의 흡광도(OD₆₀₀)가 1.0이 될 때까지 배양한 다음, 원심분리하여 상등액을 제거하고, 10 mM MOPS 용액에 5 × 10⁹ cells/ml 농도로 현탁하였다. 그리고 1 × 10⁸ 세포를 20 μl 반점으로 한천평판배지 위에 올려놓고 32°C에서 4일 동안 배양함으로써 자실체 형성을 유도하였다.

글리세롤 포자 형성 유도

CYS 배지에서 OD₆₀₀이 1.0이 될 때까지 배양한 *A. gephyra* KYC5002 균주 배양액을 50:1로 새로운 CYS 배지에 접종하고, 0~96시간 동안 배양한 다음, 최종 농도가 0.5 M이 되도록 글리세롤을 첨가하고, 추가로 20시간 배양함으로써 글리세롤 포자 생성을 유도하였다.

형태학적 특성 조사

자실체의 관찰에는 SMZ1000 입체현미경(Nikon)을 사용하였으며, 포자의 관찰에서는 Eclipse E600 위상차현미경(Nikon)을 사용하였다. 촬영에는 DS-Fi1 디지털카메라(Nikon)를 사용하였다. 자실체 포자와 글리세롤 포자들은 응집되어 있는

경우가 많으므로 초음파 파쇄로 포자를 분산시킨 후 관찰하였다. 초음파 파쇄는 microtip을 장착한 Sonifier 250 (Branson Ultrasonics)을 사용하여 20% 출력으로 20초씩 3회 처리하였다.

열에 대한 저항성 조사

1.0×10^8 cells/ml 농도의 영양세포 또는 포자액 1 ml을 50°C와 55°C에서 30분간 처리한 후, 희석하고, CYS 한천평판배지에 도말하여 배양한 다음, 생성된 집락수를 계수하였다.

결 과

Archangium gephyra KYC2615와 KYC5002의 자실체 비교

Archangium gephyra KYC5002는 국내 토양에서 분리한 KYC2615 균주의 자연 분산변이주로 액체배지에서 분산하여 성장하므로 정량적인 실험이 가능하였다. 하지만 KYC5002가 분산변이주 선별 과정에서 자실체 형성능을 상실하였을 가능성이 있었으므로 먼저 KYC5002 균주가 야생균주인 *A. gephyra* KYC2615와 유사한 자실체를 형성하는지 조사하여 보았다. 이를 위해 먹이 미생물로 살아있는 *E. coli*가 도말되어 있는 WCE 한천평판배지에 KYC2615와 KYC5002 균주를 접종하고 배양하여 자실체 형성을 관찰하였다. 점액세균들은 WCE 한천평판배지에서 *E. coli*를 먹이로 자라다 먹이가 고갈되면 수십만 마리 이상의 세포들이 활주운동으로 한 점으로 모여 자실체를 형성한다. 따라서 정량적인 분석은 할 수 없지만 정성적으로 어떤 형태의 자실체를 형성하는지 조사할 수 있다. 야생형 균주인 KYC2615를 WCE 한천평판배지에서 4일 동안 배양하였을 때 *A. gephyra*의 전형적 자실체 형태인 포자 덩어리가 무질서하게 쌓인 큰 산등성이 형상의 자실체를

형성하였다(Fig. 1A). 동일 조건에서 분산변이주 KYC5002도 유사한 형상의 자실체를 형성하였지만 야생형 균주에 비해 크기가 작은 다수의 자실체를 형성하였다(Fig. 1B).

분산변이주 KYC5002는 활주운동성 중 S-운동성(Social-motility)에 결함이 있는 균주로 선별되었다(Choi et al., 2021). 점액세균은 S-운동성에 결함이 있으면 액체배지에서 분산하여 성장하는데, 이런 경우 대부분 자실체 형성 능력을 상실한다. 그런데 KYC5002 균주는 집단운동성이 약화되어 있기는 하지만 완전히 잃어버린 것은 아니며 자실체 형성 능력도 상실하지 않은 것으로 보인다. 다만 운동성이 약화되어 넓은 지역에 퍼져 있는 영양세포들이 한 곳으로 모여 큰 자실체를 쌓아 올리는 대신 지역적으로 적은 수의 세포들이 모여 크기가 작은 다수의 자실체를 형성하는 것으로 사료된다. 한편, KYC2615와 KYC5002의 자실체 포자는 형태가 동일하였다.

정량적인 자실체 형성 유도를 위한 배지 최적화

분산변이주인 KYC5002 균주가 야생형에 비해 크기는 작지만 온전한 포자를 담은 자실체를 형성하므로 이를 대상으로 정량적으로 자실체 형성을 분석할 수 있는 배지조성을 조사하여 보았다. 정량적 자실체 형성 분석을 위해서는 점액세균의 성장을 최소화 하면서도 온전한 자실체 형성을 유도할 수 있는 조성이 필요하다. CYS는 *A. gephyra*의 일반적인 배양에 사용하는 배지로 0.5% casitone을 함유하고 있으며(Shin et al., 2013), CHM은 *Myxococcus stipitatus*의 자실체 형성 유도에 사용하는 배지로 0.25% casitone을 함유하고 있다(Hyun et al., 2019). CF 배지는 *M. xanthus*의 자실체 형성을 유도할 때 사용하는 배지로 0.015% casitone을 함유하고 있다(Shi et al., 1994). WC 배지는 여러 야생 점액세균들의 자실체를 관찰할 때 사용되는 배지로 유기물을 함유하고 있지 않다(Lee et al., 2014). 이러한 배지에서의 자실체 형성 여부를 조사하기 위해, KYC5002 균주를 CYS 액체배지에서 OD₆₀₀이 1.0이 될 때까지 배양한 다음, 1×10^8 세포를 20 µl 반점으로 CYS, CHM, CF, WC 한천평판배지 위에 올려놓고 32°C에서 4일 동안 배양함으로써 자실체 형성을 유도하였다. 그 결과, casitone과 같은 유기물을 많이 함유한 CYS와 CHM 한천평판배지에서는 자실체 형성이 이루어지지 않았지만 casitone 함량이 적거나 없는 CF와 WC 한천평판배지에서 자실체가 형성되었다(Fig. 2). 그러나 CF 배지에 형성된 자실체는 형태가 *A. gephyra*의 전형적 자실체 형태와 달랐으며, WC 배지에 형성된 자실체는 생성 효율이 낮았다.

CF 배지는 10 mM MOPS, 1 mM KH₂PO₄, 8 mM MgSO₄, 0.02% (NH₄)₂SO₄, 0.015% casitone, 0.2% sodium citrate, 0.1%

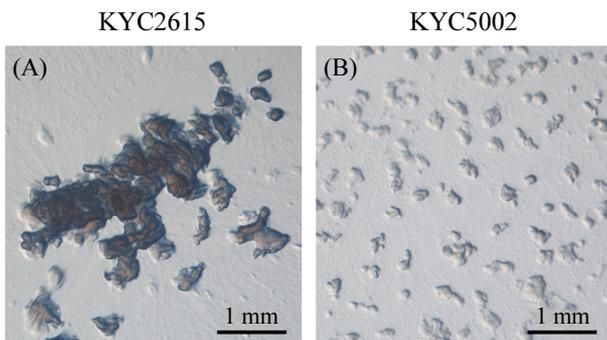


Fig. 1. Fruiting body development of *Archangium gephyra* KYC2615 and KYC5002 on WCE agar plates.

sodium pyruvate를 함유하고 있으며, WC 배지는 10 mM MOPS, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (= 6.8 mM)를 함유하고 있다. 두 배지 성분을 다양하게 조합하여 실시한 이후의 실험에서 KYC5002 균주는 10 mM MOPS, 8 mM MgSO_4 , 0.015% casitone, 3% 한천을 함유한 평판배지에서 가장 온전한 자실체를 형성하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 이 배지를 MMC 배지라 명명하고 이후의 자실체 형성 유도에 사용하였다.

세포 농도가 자실체 형성에 미치는 영향

Archangium gephyra KYC5002의 자실체 형성을 위해 필

요한 세포 농도를 알아보기 위해, CYS 액체배지에서 OD_{600} 이 1.0이 될 때까지 배양한 다음, 5×10^6 cells/ml, 5×10^7 cells/ml, 5×10^8 cells/ml, 5×10^9 cells/ml, 5×10^{10} cells/ml 농도의 세포를 20 μl 반점으로 MMC 한천평판배지 위에 올려놓고 32°C에서 4일 동안 배양함으로써 자실체 형성을 유도하였다. 그 결과, 5×10^6 cells/ml과 5×10^7 cells/ml 농도의 세포를 올려놓은 경우에는 자실체를 형성하지 않았으며(Fig. 3A, B), 5×10^8 cells/ml 농도의 세포를 올려놓은 경우에는 5×10^9 cells/ml 농도의 세포를 올려놓은 경우에 비해 상대적으로 적은 수의 자실체를 형성하였다(Fig. 3C, D). 한편, 5×10^{10} cells/ml 농도의

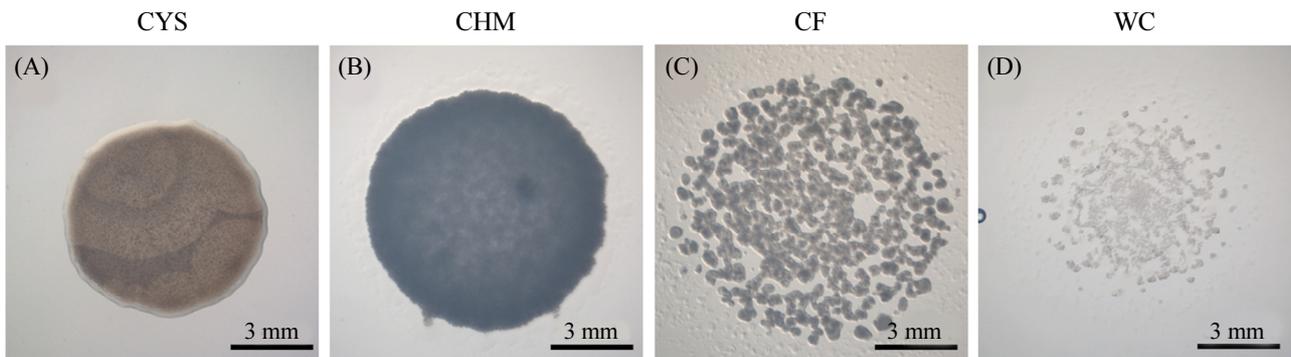


Fig. 2. Fruiting body development of *A. gephyra* KYC5002 on CYS, CHM, CF, and WC solid media. 1×10^8 cells of *A. gephyra* KYC5002 were placed on agar plates as a 20 μl spot and incubated for four days.

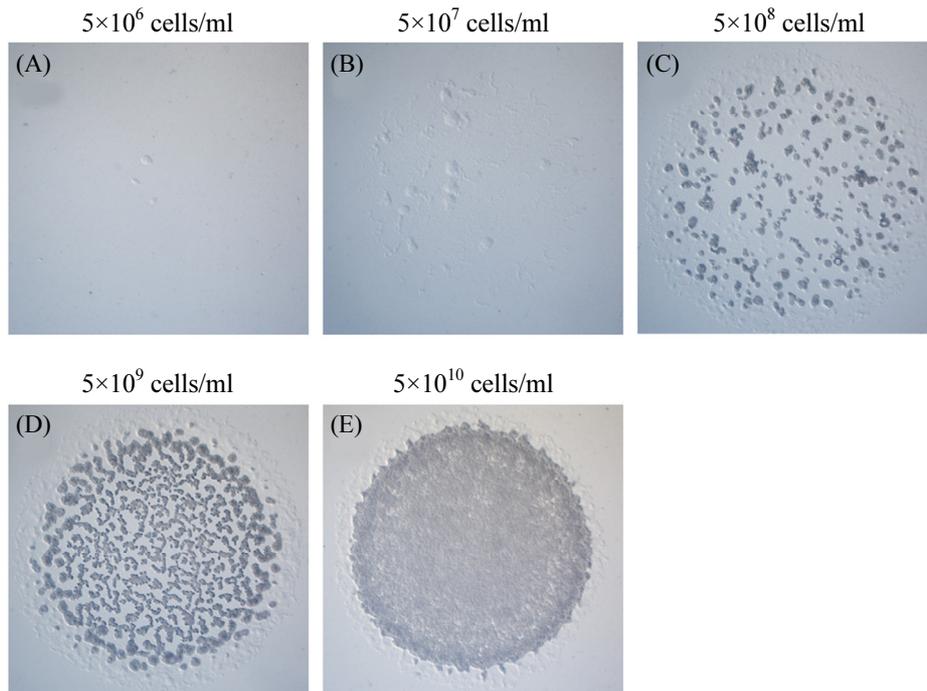


Fig. 3. Effects of cell density on the fruiting body development of *A. gephyra* KYC5002. Twenty-microliter spots of cells at the concentration of 5×10^6 cells/ml (A), 5×10^7 cells/ml (B), 5×10^8 cells/ml (C), 5×10^9 cells/ml (D), and 5×10^{10} cells/ml (E) were placed on MMC plates and incubated at 32°C for four days.

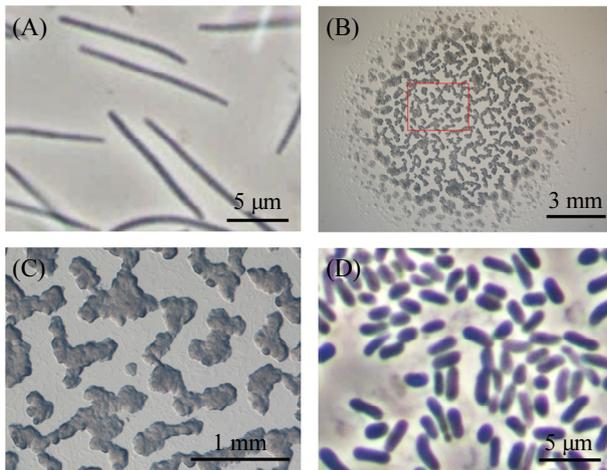


Fig. 4. Fruiting bodies and fruiting body spores of *A. gephyra* KYC5002 developed on MMC agar plates. 1×10^8 cells of *A. gephyra* KYC5002 were placed on an MMC agar plate as a 20 μ l spot and incubated for four days. (A) shows the vegetative cells of *A. gephyra* KYC5002. (B) shows the 20 μ l spot, (C) shows the fruiting bodies marked with a rectangle in (B), and (D) shows the spores in the fruiting body. (A) and (D) were photographed at 1,000 \times using a phase-contrast microscope. (B) and (C) were photographed at 8 \times and 40 \times , respectively, using a stereomicroscope.

세포를 올려놓은 경우에는 독립된 자실체 구조를 형성하지 않고 반점 내 세포 전체가 포자로 변화되었다(Fig. 3E). 따라서 *A. gephyra* KYC5002의 자실체 형성을 위해서는 5×10^9 cells/ml이 최적 농도인 것으로 나타났다.

왕성히 성장하고 있는 *A. gephyra* KYC5002 균주의 영양세포는 직경 0.6~1.0 μ m, 길이 5~15 μ m의 긴 바늘 형태이다(Fig. 4A). OD₆₀₀ 1.0까지 배양한 5×10^9 cells/ml 농도의 세포를 20 μ l 반점(1×10^8 cells)으로 MMC 한천평판배지 위에 올려놓고 32°C에서 4일 동안 배양하였을 때 200~400개의 자실체를 형성하였다(Fig. 4B). 각각의 자실체는 점액질 물질과 함께 응집된 포자 덩어리가 무질서하게 쌓인 산등성이 형태이었으며(Fig. 4C), 자실체 안에 있는 포자는 직경 1.0~1.5 μ m, 길이 2.2~3.2 μ m로 영양세포에 비해서 두께는 두껍고 길이는 짧으며 끝은 동그란 형태이었다. 20 μ l 반점 안에서 생성된 포자수는 3.4×10^8 개이었다. 포자수가 처음 MMC 배지에 올려놓은 세포수보다 증가한 것은 세포들이 배지에서 조금 성장한 까닭으로 사료되었다. 한편, CYS 액체배지에서 OD₆₀₀이 3.0까지 배양한 세포들은 동일 조건에서 5×10^9 cells/ml 농도의 세포를 올려놓아도 자실체를 제대로 형성하지 않았다.

글리세롤 포자 형성 조건 분석

점액세균은 배양액에 0.5 M 글리세롤이 존재하면 자실체 형성 없이 개별 영양세포들이 2~8시간 만에 글리세롤 포자라

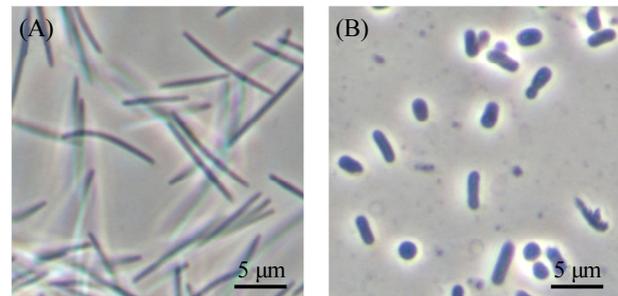


Fig. 5. Vegetative cells (A) and glycerol spores (B) of *A. gephyra* KYC5002.

불리는 독립적으로 존재하는 포자로 변형된다(Dworkin and Gibson, 1964). *Archangium gephyra* KYC5002 균주가 액체 배지에서 분산되어 성장하므로 이 균주를 대상으로 글리세롤 포자 생성 여부와 생성한다면 어떤 성장단계에서 생성하는지 조사하여 보았다. 이를 위하여 KYC5002 균주를 CYS 액체배지에서 진탕배양하면서 0, 24, 48, 72, 96시간 후에 0.5 M 글리세롤을 첨가하고, 추가로 20시간 동안 진탕배양한 다음, 세포들을 위상차현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 가늘고 긴 영양세포들이 직경 1.0~2.0 μ m, 길이 2.0~4.4 μ m의 짧고 두툼한 형태로 완전히 다른 모습으로 변형된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 점액세균의 영양세포들은 초음파에 의해 파쇄되는 반면, 포자들은 파쇄되지 않는다. 변형된 세포들이 글리세롤 포자인지 확인하기 위하여 배양액을 초음파파쇄기로 처리하여 보았다. 그 결과, 남아있는 영양세포들은 모두 파쇄되었으나 변형된 세포들은 파쇄되지 않았다. 따라서 변형된 세포들은 모두 글리세롤에 의해 형성이 유도된 글리세롤 포자인 것으로 판단하였다.

글리세롤 포자는 배양 0, 24, 48, 72, 96시간 모두에서 생성되었는데, 24시간 배양하였을 때(OD₆₀₀ \approx 0.21, 약 1.1×10^8 cells/ml) 1.3×10^8 spores/ml의 농도로 포자를 생성하여 효율이 약 118%이었으며, 48시간 배양하였을 때(OD₆₀₀ \approx 2.57, 약 1.3×10^9 cells/ml) 6.7×10^8 spores/ml의 농도로 포자를 생성하여 효율이 약 52%인 것으로 분석되었다(Fig. 6). 그리고 72시간 배양하였을 때(OD₆₀₀ \approx 3.32, 약 1.7×10^9 cells/ml) 5.8×10^8 spores/ml의 농도로 포자를 생성하여 효율이 약 34%로 낮아졌으며, 96시간 배양하였을 때는 포자생성 효율이 3%로 낮아졌다. 따라서 세포들이 왕성히 성장하는 때에 글리세롤 포자 형성이 잘되며, 정지기에 들어간 노쇠한 세포들은 글리세롤 포자 형성 효율이 매우 낮음을 알 수 있었다. 한편, 글리세롤 포자로의 변형은 글리세롤을 첨가해준 후 7시간 후부터 관찰되었으며, 글리세롤 농도를 0.25~1.0 M로 해준 경우 모두 생성되었다.

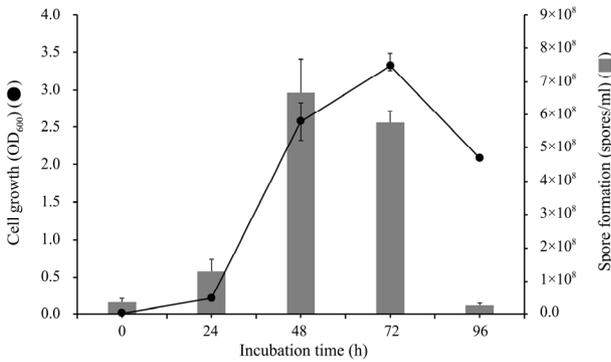


Fig. 6. Effect of the time at which glycerol is added on the formation of glycerol spores by *A. gephyra* KYC5002. 0.5 M glycerol was added to the culture broth of *A. gephyra* KYC5002 at various time points and the number of spores was counted after 20 h of additional incubation. The results are presented as the mean ± SD of three independent experiments.

자실체 포자와 글리세롤 포자의 열저항성 비교

자실체 포자와 글리세롤 포자의 열에 대한 저항성을 조사하기 위하여 1.0×10^8 spores/ml 농도의 포자 현탁액을 50°C와 55°C에서 30분간 열처리한 후, 희석하고, CYS 한천평판배지에 도말하여 생성된 집락을 계수하였다(Table 1). 대조구로는 1.0×10^8 cells/ml 농도의 영양세포 현탁액을 사용하였다. 그 결과, 영양세포는 두 온도에서 모두 사멸하여 집락 형성이 전혀 관찰되지 않았다. 하지만, 자실체 포자 현탁액의 경우 50°C에서 열처리하였을 때 평균 1.8×10^6 개의 집락을 형성하였으며, 55°C에서 열처리하였을 때 평균 3.4×10^4 개의 집락을 형성하였다. 글리세롤 포자 현탁액의 경우 50°C에서 열처리하였을 때 평균 6.5×10^6 개의 집락을 형성하였으나, 55°C에서 열처리하였을 때는 형성된 집락이 전혀 없어 모두 사멸한 것으로 나타났다. 50°C에서 열처리하였을 때 글리세롤 포자 현탁액이 자실체 포자 현탁액보다 더 많은 집락을 형성한 것은 글리세롤 포자는 분산하여 존재하는 반면, 자실체 포자들은 서로 응집하여 존재한 결과로 사료되었다. 따라서 자실체 포자와 글리세롤 포자 모두 영양세포가 사멸하는 50°C에서는 저항성을 갖지만 글

Table 1. Heat resistance of spores from *Archangium gephyra* KYC5002

Temperature (°C)	Number of colonies formed after heat treatment (CFU/ml)		
	Vegetative cells	Fruiting body spores	Glycerol spores
50	0	$1.8 \pm 0.3 \times 10^6$	$5.6 \pm 1.1 \times 10^6$
55	0	$3.4 \pm 1.0 \times 10^4$	0

Spore solutions with a concentration of 1.0×10^8 spores/ml were heat-treated at 50°C and 55°C for 30 min, diluted, and spread on CYS agar plates to count the number of colonies produced. Vegetative cells were used at a concentration of 1.0×10^8 cells/ml as a control. The results are presented as the mean ± SD of three independent experiments.

리세롤 포자는 55°C에서 모두 사멸하므로 자실체 포자가 글리세롤 포자에 비해 높은 열저항성을 가진 것으로 분석되었다.

고찰

*Archangium gephyra*는 포자 덩어리가 무질서하게 쌓인 산등성이 형태의 자실체를 형성하는 것으로 알려져 있다(Reichenbach, 2005). 그런데, 야생균주들은 액체배지에서 응집하여 성장하므로 정량적인 자실체 형성과 글리세롤 포자 형성에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않았다. *Archangium gephyra* KYC5002는 국내에서 분리된 *A. gephyra* KYC2615의 변이주로 S-운동성에 결함이 있어 액체배지에서 분산하여 성장하는 분산변이주로 선별되었다(Choi et al., 2021). 하지만 S-운동성을 완전히 잃어버린 것이 아니며 자실체 형성 능력도 간직한 것으로 나타났다. 다만 야생형 균주와 달리 운동성이 약화되어 있어서 넓은 지역의 세포들이 모여 큰 자실체를 쌓아 올리는 대신 지역적으로 적은 수의 세포들이 모여 크기가 작은 다수의 자실체를 형성하는 것으로 추정되었다. KYC5002 균주는 자실체 내부에 야생형 균주와 동일한 형태의 포자를 생성하였다. 따라서 *A. gephyra* KYC5002는 액체배지에서 분산 성장하면서도 포자를 가진 자실체를 형성하여 정량적 자실체 형성 분석에 적합한 균주로 사료된다. 또한, 액체배지에서 분산하여 성장하므로 글리세롤 포자 형성 연구에도 적합한 균주로 판단된다.

점액세균이 자실체를 형성하기 위해서는 지지대, 충분한 세포농도, 건강한 세포 상태, 그리고 영양분 고갈이 필요하다. *Archangium gephyra* KYC2615는 MOPS와 CaCl₂로만 구성된 WC 한천평판배지 위에서 자실체를 형성하였으며, 0.015%의 casitone을 함유한 MMC 한천평판배지에서는 더 온전한 자실체를 형성하였다. 하지만 casitone 농도가 0.25% 이상 함유한 배지들에서는 자실체를 형성하지 않아 영양분 고갈이 자실체 형성에 필수적임을 보였다. 세포 현탁액을 20 μl 반점으로 MMC 한천평판배지 위에 올려놓고 자실체 형성을 유도하는 경우, $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ cells/ml 농도에서만 자실체를 형성하고 세포 농도가 이보다 낮거나 높으면 자실체를 형성하지 못하였는데, 이는 자실체 형성에 세포의 농도가 중요함을 보여주었다. 한편, OD₆₀₀ 3.0까지 배양한 세포들은 자실체를 제대로 형성하지 못한 반면, OD₆₀₀ 1.0까지 배양한 세포들은 온전한 자실체를 형성하여 세포의 상태도 자실체 형성에 중요한 인자로 나타났다. 본 연구에서 사용한 MMC 배지와 자실체 형성 조건은 향후 *A. gephyra*의 자실체 연구에 유용하게 사용될 것으로 기대한다.

Mycococcaceae 과에 속하는 점액세균들이 구형 또는 타원형의 자실체 포자를 형성하여 이에 속한 *M. xanthus*는 구형의 자실체 포자와 글리세롤 포자를 형성한다. *Cystobacteraceae* 과에 속하는 점액세균들은 대부분 굵고 짧은 간균형 포자를 형성하는 것으로 알려져 있는데(Reichenbach, 2005), *A. gephyra* KYC5002 역시 굵고 짧은 간균형 자실체 포자를 형성하였으며, 글리세롤 포자의 형태도 이와 유사하였다. 다만, 자실체 포자의 형태가 대체로 일정한 반면, 글리세롤 포자는 타원형에서 간균형까지 여러 형태가 섞여있는 것으로 관찰되었다.

포자의 형성은 세균이 영양분 고갈, 독성 물질의 존재 등과 같은 여러 유해한 환경에 저항하기 위함이다. 점액세균은 집단으로 존재하는 것이 경쟁력이므로 상황이 호전되면 포자집단이 동시에 발아하여 곧바로 영양세포 집단을 형성하기 위하여 포자의 집단인 자실체를 형성하는 것으로 생각되고 있다. 하지만 갑자기 유해한 물질 또는 환경에 접해 시간적으로 여유가 없는 경우에는 세포들이 개별적으로 반응하여 글리세롤 포자로 변형하는 것으로 생각되고 있다. 글리세롤 포자 형성을 유도하는 물질들이 모두 β -lactamase의 유도를 유발하므로 글리세롤 포자의 형성은 펩티도글리칸 구조를 손상시키는 물질에 대한 세포의 적응일 수 있다는 주장이 제기되기도 하였다(O'Connor and Zusman, 1997).

점액세균의 포자들은 다양한 환경인자에 저항성을 보인다(Sudo and Dworkin, 1969). *Archangium gephyra* KYC5002가 생성하는 자실체 포자와 글리세롤 포자 역시 초음파와 열에 대해 저항성을 보였다. 다만, *M. xanthus*에서 이미 알려진 바와 같이 글리세롤 포자가 자실체 포자에 비해 열에 대한 저항성이 조금 약하였다. 하지만, 자실체 포자는 형성 유도가 번거롭고 시간이 많이 소요되는 반면, 글리세롤 포자의 형성 유도는 액체배양에 글리세롤만 첨가하고 추가적으로 몇 시간만 배양하면 되므로 간편하게 대량 제조할 수 있다. 따라서 글리세롤 포자는 균주의 장기보관과 접종액의 제조에 좋은 방법이 될 수 있다. 특별히 *A. gephyra* KYC5002는 생리활성물질인 argyirin과 tubulyisin을 생산하므로 본 연구에서 조사한 글리세롤 포자 유도 조건은 향후 KYC5002를 기반으로 개량이 이루어진 균주들의 장기보관과 접종액의 제조에 유용하게 사용될 것으로 기대한다.

적 요

액체 배지에서 분산하여 성장하는 KYC5002 균주를 이용하여 점액세균 *Archangium gephyra*에 의한 자실체 발달과 글

리세롤 포자 형성을 정량적으로 분석하였다. KYC5002 균주는 야생형 균주에 비해 크기가 작은 다수의 자실체를 형성하였는데, 10 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, 8 mM $MgSO_4$, 0.015% casitone, 3% 한천으로 구성된 MMC 한천평판배지에서 가장 온전한 자실체를 형성하였다. 자실체는 세포 현탁액의 농도가 $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ cells/ml인 경우에만 형성하였으며 이보다 낮거나 높은 농도에서는 자실체를 형성하지 않았다. 가늘고 긴 영양세포들은 자실체 내에서 굵고 짧은 자실체 포자로 변형되었다. 글리세롤 포자로의 변형은 액체배양 시 모든 시점에서 가능하였지만 세포들이 왕성히 성장하는 시기에는 높은 효율로 이루어졌고, 정지기에 들어간 노쇠한 세포들의 경우에는 낮은 효율로 이루어졌다. 생성된 글리세롤 포자는 형태적으로 자실체 포자와 유사하였으며, 초음파와 열에 저항성을 보였다. 하지만 열저항성이 자실체 포자에 비해 낮았다.

감사의 말

이 논문은 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2021R111A3044432).

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Choi J, Park T, Kang D, Lee J, Kim Y, Lee P, Chung GJY, and Cho K. 2021. Discovery of argyirin-producing *Archangium gephyra* MEHO_001 and identification of its argyirin biosynthetic genes. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**, 493–500.
- Dawid W. 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 403–427.
- Dworkin M. 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**, 250–257.
- Dworkin M and Gibson SM. 1964. A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. *Science* **146**, 243–244.
- Dworkin M and Sadler W. 1966. Induction of cellular morphogenesis in *Myxococcus xanthus* I. General description. *J. Bacteriol.* **91**, 1516–1519.
- Flårdh K and Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev.*

- Microbiol.* **7**, 36–49.
- Galván A, Marcotegui MA, de Castro F.** 1992. Ultrastructure of natural and induced myxospores of *Archangium gephyra*. *Can. J. Microbiol.* **38**, 130–134.
- Higgins D and Dworkin J.** 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 131–148.
- Hyun H, Choi J, An D, and Cho K.** 2019. Formulation of a medium for the fruiting body development of *Myxococcus stipitatus*. *Korean J. Microbiol.* **55**, 117–122.
- Hyun H, Choi J, Kang D, Kim Y, Lee P, Chung GJY, and Cho K.** 2021. Screening of myxobacteria carrying tubulysin biosynthetic genes. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**, 32–38.
- Inoue M, Inouye S, and Zusman DR.** 1979. Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development-specific protein of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 209–213.
- Komano T, Inouye S, and Inouye M.** 1980. Patterns of protein production in *Myxococcus xanthus* during spore formation induced by glycerol, dimethyl sulfoxide, and phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.* **144**, 1076–1082.
- Kunze B, Reichenbach H, Müller R, and Höfle G.** 2005. Aurafuron A and B, new bioactive polyketides from *Stigmatella aurantiaca* and *Archangium gephyra* (Myxobacteria). *J. Antibiot.* **58**, 244–251.
- Lee C, Shin H, and Cho K.** 2014. Development of a quantitative induction method for *Chondromyces crocatus* fruiting body formation. *Korean J. Microbiol.* **50**, 179–178.
- O'Connor KA and Zusman DR.** 1992. Analysis of *Myxococcus xanthus* cell types by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **173**, 3334–3341.
- O'Connor KA and Zusman DR.** 1997. Starvation-independent sporulation in *Myxococcus xanthus* involves the pathway for β -lactamase induction and provides a mechanism for competitive cell survival. *Mol. Microbiol.* **24**, 839–850.
- Reichenbach H.** 2005. Myxococcales, pp. 1059–1144. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, and Garrity GM. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Bergey's Manual Trust, East Lansing, Michigan, USA.
- Reichenbach H, Voelz H, and Dworkin M.** 1969. Structural changes in *Stigmatella aurantiaca* during myxospore induction. *J. Bacteriol.* **97**, 905–911.
- Sasse F, Böhlendorf B, Herrmann M, Kunze B, Forche E, Steinmetz H, Höfle G, and Reichenbach H.** 1999. Melithiazols, new β -methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from myxobacteria. *J. Antibiot.* **52**, 721–729.
- Sasse F, Steinmetz H, Heil J, Höfle G, and Reichenbach H.** 2000. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **53**, 879–885.
- Sasse F, Steinmetz H, Höfle G, and Reichenbach H.** 1995. Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukaryotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (myxobacteria). *J. Antibiot.* **48**, 21–25.
- Sasse F, Steinmetz H, Höfle G, and Reichenbach H.** 2003. Archazolids, new cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). *J. Antibiot.* **56**, 520–525.
- Sasse F, Steinmetz H, Schupp T, Petersen F, Memmert K, Hofmann H, Heusser C, Brinkmann V, von Matt P, Höfle G, et al.** 2002. Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. *J. Antibiot.* **55**, 543–551.
- Shi W, Köhler T, and Zusman DR.** 1994. Motility and chemotaxis in *Myxococcus xanthus*, pp. 258–269. In Adolph, K.W. (ed.), *Molecular Micro-biology Techniques*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Shimkets LJ, Dworkin M, and Reichenbach H.** 2006. The Myxobacteria, pp. 31–115. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, and Stackebrandt E. (eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, USA.
- Shimkets LJ.** 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **54**, 473–501.
- Shin H, Youn J, An D, and Cho K.** 2013. Production of antimicrobial substances by strains of myxobacteria *Corallocooccus* and *Myxococcus*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 44–51.
- Sudo SZ and Dworkin M.** 1969. Resistance of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **98**, 883–887.