

Development of Doxorubin Overproducing *Streptomyces* Strain Using Protoplast Regeneration

박희섭, 박현주, 김응수*

인하대학교 공과대학 생물공학과 미생물분자생물공학 실험실
전화 (032) 860-8318 Fax (032) 872-4046

ABSTRACT

To establish an effective and reliable technique of mutation by protoplast regeneration in doxorubicin overproducing industrial strain, it is essential to optimize the conditions for protoplast regeneration. CaCO_3 as buffer, the negative effect of glucose was still evident without significant changes in pH, ruling out acidity as responsible for the suppression of anthracycline production and suggesting a direct effect of glucose on antibiotic biosynthesis. Production of doxorubicin was improved in doxorubicin overproducing industrial strain (BR-Dox) when protoplast regenerated. BR-Dox4 and BR-Dox6 of BR-Dox derivatives improved doxorubicin production by 25.2 % and 12.2 %, respectively.

서 론

방선균은 필라멘트 형태의 그람 양성 토양미생물로서, 항생제, 항암제, 면역억제제로 대표되는 다양한 종류의 이차대사산물을 생산하며, 현재까지 보고된 미생물 유래 유용생리활성물질 중 70% 이상이 방선균에서 유래되는 것으로 알려져 있다¹⁾. 특히 최근 폴리케타이드계 생리활성물질 생합성 유전자들의 유전공학적 변형 및 치환으로 가능해진 하이브리드 항생제 생산기술에 의한 신약개발 가능성으로 말미암아 방선균 균주개발기술의 중요성이 더욱 증가하고 있는 실정이다. 현재까지 산업적으로 유용한 방선균 유래 조절유전자를 이용한 고생산성 균주 개발 시도는 매우 부족한 실정인데, 그 이유는 우선 유용 방선균에 관한 분자생물학적 기법이 정립되지 않았고, 또한 고생산성 방선균 균주가 대부분 반복적 돌연변이로 인하여 유전적으로 매우 불안정하여 유전자 변형을 시도하는 과정에서 생산성의 현격한 감소가 발생하기 때문으로 추정되고 있다²⁾. 대표적인 고부가가치 항암제인 독소루비신 (doxorubicin)은 방선균 *Streptomyces peucetius*가 생산하는 폴리케타이드계 (polyketide) 방향족 화합물로서, 생합성 조절기작이 세포의 배양상태에 의해 조절을 받는다는 사실로부터 생산균주의

반복적인 돌연변이 방법에 의한 고생산성 균주의 개발 및 발효조건 최적화시도가 꾸준히 진행되고 있다. 최근 발표된 방선균 유전체 연구결과, 그람 양성 세균인 방선균은 세포벽이 제거된 원형질체 상태의 인위적 유도 및 세포벽 재생으로도 유전적 변이를 포함한 돌연변이체가 생성된다고 밝혀졌다. 본 연구에서는 인위적 원형질체 도입과 세포벽 재생을 통한 새로운 개념의 방선균 균주개량 방법을 제시하고, 이를 이용한 독소루비신 고생산성 균주개발의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서는 이미 반복적인 돌연변이 방법으로 개량된 독소루비신 고생산성 산업균주 (BR-Dox라 명명함)를 이용하였으며, 20% glycerol stock으로 -20℃에 보관하였다.

배지 및 배양방법

실험에 사용한 균주의 배양에는 R2YE 배지 (sucrose 103 g; K₂SO₄ 250 mg; MgCl₂ · 6H₂O 10.12 g; glucose 10 g; casamino acid 100 mg; yeast extract 5 g; N-Tris (hydroxymethyl-2- aminoethane-sulfonic acid(TES) 5.73 g; KH₂PO₄ 25 mg; CaCl₂ · 2H₂O 14.702 g; NaOH 1.4 g; L-proline 1.5 g; trace element solution (ZnCl₂ 40 mg; FeCl₃ · 6H₂O 200 mg; CuCl₂ · 2H₂O 10 mg; MnCl₂ · 4H₂O 10 mg; Na₂B₄O₇ · 10H₂O 10 mg; (NH₄)Mo₇O₂₄ · 4H₂O 10 mg; H₂O 1,000 ml) 2 ml; H₂O 1,000 ml)와 2CM 배지(corn starch 10 g; NaCl 1 g; (NH₄)₂SO₄ 2 g; K₂HPO₄ 1 g; CaCO₃ 2 g; MgSO₄ 2 g; tryptone 2 g; FeSO₄ · 7H₂O 1 mg; MgCl₂ · 6H₂O 1 mg; ZnSO₄ · 7H₂O 1 mg; H₂O 1,000 ml)를 추가적으로 사용하였고³⁾, BR-Dox 균주는 25 ml의 seed 배지에 접종하여 72 시간동안 30℃, 250 rpm 조건하에서 진탕 배양한 후, 15 ml의 main 배지로 seed 배양액의 5% (0.75 ml)를 옮겨 접종하여 7일 동안 배양하였다.

분석조건

Thin-Layer Chromatography (TLC) 분석으로 BR-Dox의 독소루비신 생산의 정성분석을 수행하였으며, 배양액의 일정량을 취해 pH 8.5로 맞추고 1 ml을 취하여 추출액 (Chloroform: Methanol = 9 : 1) 1 ml과 섞어 교반한 후 원심 분리하여 바닥의 유기용매층만을 취하여 1일 hood안에서 말린 뒤 50 μl의 methanol에 재현탁하였다. 추출액 시료 4 μl를 silica gel (Aldrich Co., Milwaukee, USA)에 집적하여 전개용매 (chloroform:

methanol: acetic acid: water = 80 : 20 : 16 : 6)로 전개하고 건조시킨 후 UV light (365 nm)에서 형광을 나타내는 것을 확인하였다. BR-Dox의 독소루비신 생산의 정량분석은 C-18 reverse phase (250×4.6 mm) column (Waters, Ireland)을 사용하여 high-performance liquid chromatography (HPLC)로 분석하였다. 추출조건은 배양액의 일정량을 취하여 1 vol.의 추출액 (Iso-propyl alcohol: HCl (30 %) = 50 : 1)을 섞고 30분 교반한 후 15,000 rpm에서 10 min 원심 분리하여 상등액만을 취하여 Acetonitrile/water (1 : 1 v/v) 혼합액에 sodium (lauryl) sulfate (1.327 g/L)와 phosphoric acid (0.68 ml/L)를 섞어 mobile phase 로 사용하였고, 유속은 1 ml/min로 column 온도는 상온으로 유지하여 UV detector로 254 nm에서 독소루비신의 생산량을 정량분석 하였다.

방선균의 원형질체 도입 및 세포벽 재생

방선균 BR-Dox를 CaCO₃를 0.2% 첨가한 R2YE배지에서 30°C, 200 rpm에서 40 시간 배양하여 원심분리(8000 rpm, 5 분)로 세포를 얻어낸 후, 10.3% sucrose 용액으로 2회 세척하여 배지성분을 제거하고 P buffer (sucrose 103 g; K₂SO₄ 250 mg; MgCl₂ · 6H₂O 2.02 g; KH₂PO₄ 5 mg; CaCl₂ · 2H₂O 368 mg; MOPS(pH 7.2) 573 mg; H₂O 1,000 ml)에 lysozyme을 1 mg/ml 되게 하여 만든 lysozyme solution 5 ml을 넣고 30°C에서 1 시간 처리하였다. 이어서 솜이 들어간 주사기로 원형질체만을 걸러내고 5 ml의 P buffer로 두 번 세척하여 정제된 원형질체만을 얻어내었다. 원형질체는 남은 buffer drop으로 재현탁 하였으며, 25% PEG1000 (Sigma Co., St. Louis, USA)과 P buffer를 각각 500 µl 넣어주어 1분간 상온에서 정제한 후 300 µl씩 R2YE 배지에 도말하였다.

결과 및 고찰

방선균 BR-Dox 균주에 의한 독소루비신 생산

방선균 BR-Dox의 독소루비신 생산능력을 검증하기 위하여 4일 동안 진탕 배양실험 으로부터 배양액을 추출하여 TLC로 분석하였다 (Fig. 1). BR-Dox는 배양시 독소루비신과 이의 전구체인 다나루비신(daunorubicin)을 비슷한 정도로 생산하였으며, 독소루비신을 생산한다고 보고 된 야생균주(e.g. *S. peucetius* ATCC29050, ATCC27952)와 비교하여 월등히 우수한 생산성을 확인할 수 있었으며(Fig. 1 (B)), 2CM 배지에서 배양하여 비교한 HPLC 분석에서도 월등히 우수한 생산성을 나타내었다(Fig. 2). 또한 Fig. 1에서 볼 수 있듯이, seed 배지 및 main 배지에서는 독소루비신과 다나루비신이 거의 비슷한 정도로 생산되는 반면, 2CM 배지에서 배양하였을 경우 다나루비신의 생산능

력이 현저히 감소되고 독소루비신만이 특이적으로 생산하는 것으로 관찰되었다. 이는 BR-DOX의 경우 배양조건에 따라 독소루비신 생합성이 매우 민감하게 조절됨을 암시하고 있다.

방선균 BR-Dox의 원형질체 재생에 의한 독소루비신 고생산성 균주 선별

그럼 양성 세균인 방선균은 세포벽이 제거된 원형질체 상태의 인위적 유도 및 세포벽 재생 (protoplast regeneration)으로도 유전적 변형을 포함한 돌연변이체가 생성된다. 특히, 반복적인 돌연변이 과정을 통해 선별되어 유전적으로 매우 불안정한 산업 균주의 경우에는 단순한 원형질체 재생 방법만으로도 쉽게 추가적인 돌연변이가 유도되리라 예상되었다. 따라서 본 연구에서는 BR-Dox의 인위적인 원형질체 재생을 유도함으로써, 독소루비신 생산성이 향상된 고생산성 균주를 선별하고자 하였다. BR-Dox의 경우 잘 알려진 *S. lividans* TK21에 비하여 증식속도가 상대적으로 낮아 실험을 수행하기 충분한 양의 세포를 얻기 위하여 2CM 배지의 각 성분별로 R2YE에 첨가하여 배양하여 보았다. 3일간의 배양 결과 CaCO_3 0.2 %가 R2YE 배지에 첨가되었을 때 BR-Dox가 가장 잘 자랐으며, 세포가 pellet을 형성하지 않고 작아 원형질체 유도를 위한 세포포집에 적합한 것으로 예상되었다. 이는 glucose가 포함된 배지에서 배양 중 생기는 유기산에 의해 일어나는 산성도를 CaCO_3 가 buffer로 작용하여 배지 내 pH의 변화를 억제했기 때문으로 사료된다. BR-Dox 균주의 인위적인 원형질체 도입 및 세포벽 재생 과정을 거쳐 형성된 파생균주들을 2CM 고체배지에 도말하여 3일간 배양한 후, 이중 특이적으로 독소루비신으로 추정되는 붉은 색의 색소를 많이 내는 콜로니 6개를 선별하여 BR-Dox1, BR-Dox2, BR-Dox3, BR-Dox4, BR-Dox5, BR-Dox6이라 명명하였다.

원형질체 재생된 방선균 BR-Dox 파생균주들의 독소루비신 생산

방선균 BR-Dox 및 6개의 파생 균주들을 seed 배지에서 4일 배양 후 추출하여 TLC로 분석한 결과, BR-Dox4와 BR-Dox6의 경우가 BR-Dox보다 독소루비신의 spot이 진한 것으로 보아 정성적으로 독소루비신의 생산성이 증가한 것으로 예측되었다 (Fig. 3). BR-Dox 균주를 seed 배지에서 main 배지까지 배양한 후 독소루비신의 생산성을 HPLC로 분석하였다. 독소루비신 생산성이 BR-Dox2, BR-Dox4, BR-Dox6은 각각 6.4 %, 25.2 %, 12.2 %씩 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 4). 4일간의 seed 배양액을 추출한 TLC 분석결과(Fig. 3)와 main 배양액을 추출한 HPLC 분석결과(Fig. 4)를 비교해 보면 BR-Dox4와 BR-Dox6은 TLC 분석에서의 예상대로 HPLC 분석에서도 BR-Dox에 비해 독소루비신의 생산성이 증가한 패턴을 보였다. 반면 BR-Dox2의 경우 BR-Dox에 비해

TLC 분석과 HPLC 분석에서의 차이점이 생긴 이유는 TLC 분석을 위해 seed 배지에서 BR-Dox2를 배양하였을 때 독소루비신 생산성의 재현성이 일관되게 나타나지 않았던 것으로 추측되었다. 결론적으로 방선균 원형질체 재생 과정을 거친 6개의 파생균주 중에서 4일간의 seed 배양 및 간단한 TLC 분석결과를 통해 BR-Dox보다는 높은 생산성을 지닌 독소루비신 고 생산성 균주를 효과적으로 선별할 수 있었다. 따라서 이와 같은 원형질체 재생 방법은 BR-Dox와 같이 반복적 돌연변이 방법으로 선별된 균주에도 추가적인 생산성 향상을 유도할 수 있는 효과적인 균주개량 방법이라 사료되며, 특히 원형질체 재생 및 선별작업을 반복적으로 수행할 경우 더욱 효과적인 생산성 향상을 기대할 수 있으리라 예상된다.

References

1. Chater, K. F. (1979) (Editor) Genetics of industrial microbiology. 123.
2. Champness WC, Chater KF (1994) Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp. In: Piggot P, Moran CP, Youngman P (eds) Regulation of bacterial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 61-93
3. Hwang YS, Lee JY, Kim ES & Choi CY (2001) Optimization of transformation procedures in avermectin high-producing *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnology Letters* **23**: 457-462 .
4. Kang MJ, JK Kang, ES Kim (1999) Isolation and characterization of soil *Streptomyces* involved in 2,4-dichlorophenol oxidation. *J. Microbiol Biotechnol.* **9**: 877-880

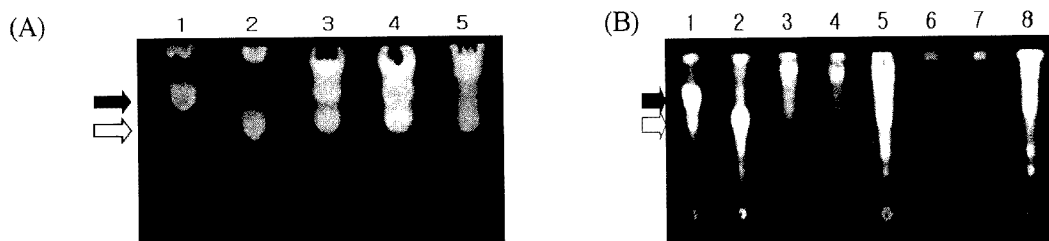


Figure 1. The BR-Dox products were compared to authentic standards cochromatographed or run in parallel on TLC plate. (A)lane 1 is daunorubicin standard. lane 2 is doxorubicin standard. lane 3 is cultured at seed media. lane 4 is cultured at main media. lane 5 is cultured at 2CM media. lane 3-5 are that showing the separation aglycone by extracts. (B)lane 1 is daunorubicin standard. lane 2 is doxorubicin standard. lane 3-5 are cultured at seed media. lane 6-8 are cultured at 2CM media. lane 3, 6 is ATCC29050 culture extracts. lane 4, 7 is ATCC27952 culture extracts. lane 5, 8 is BR-Dox culture extracts : (■) Daunorubicin spot, (□) Doxorubicin spot.

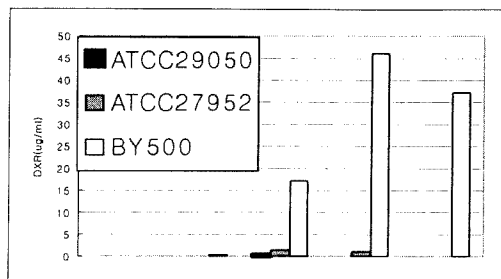


Figure 2. Doxorubicin production in *S. peucetius* ATCC29050 (■), *S. peucetius* var. casius ATCC27952 (▨), BR-Dox (□).

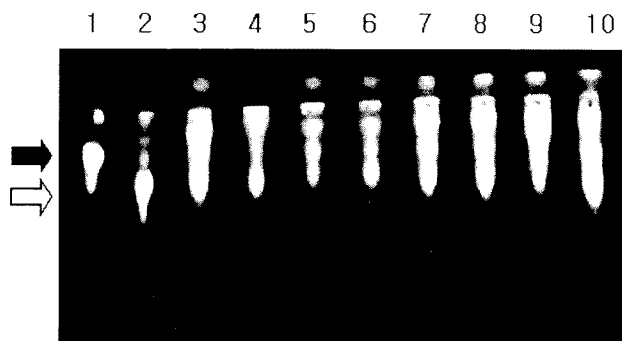


Figure 3. The BR-Dox products were compared to authentic standards cochromatographed or run in parallel on TLC plate. lane 1 is daunorubicin standard. lane 2 is doxorubicin standard. lane 3 is BR-Dox cultured at seed media, lane 4 is BR-Dox cultured at 2CM media, lane 5-10 are cultured at seed media, lane 5: BR-Dox1, lane 6: BR-Dox2, lane 7: BR-Dox3, lane 8: BR-Dox4, lane 9: BR-Dox5, lane 10: BR-Dox6. : (■) Daunorubicin spot, (□) Doxorubicin spot.

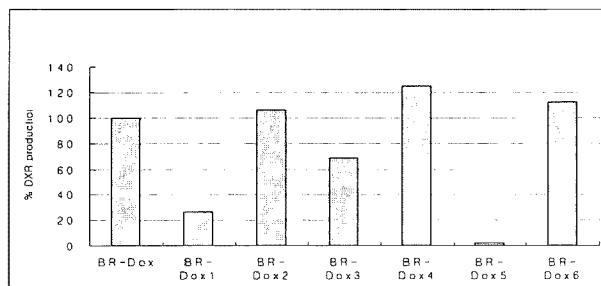


Figure 4. Doxorubicin titers of BR-Dox, BR-Dox1, BR-Dox2, BR-Dox3, BR-Dox4, BR-Dox5, BR-Dox6.