

# Identification of Potential Target Genes Involved in Doxorubicin Overproduction Using *Streptomyces* DNA Microarray Systems

Seung-Hoon Kang, Eung-Soo Kim

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea.

TEL: +82-32-860-8825, FAX: +82-32-872-4046

## Abstract

Doxorubicin is a highly-valuable anthracycline-family polyketide drug with a very potent anticancer activity, typically produced by a Gram-positive soil bacterium called *Streptomyces peucetius*. Thanks to the recent development of *Streptomyces* genomics-based technologies, the random mutagenesis approach for *Streptomyces* strain improvement has been switched toward the genomics-based technologies including the application of DNA microarray systems. In order to identify and characterize the genomics-driven potential target genes critical for doxorubicin overproduction, three different types of doxorubicin overproducing strains, a *dnrI* (doxorubicin-specific positive regulatory gene)-overexpressor, a *doxA* (gene involved in the conversion from daunorubicin to doxorubicin)-overexpressor, and a recursively-mutated industrial strain, were generated and examined their genomic transcription profiles using *Streptomyces* DNA microarray systems. The DNA microarray results revealed several potential target genes in *S. peucetius* genome, whose expressions were significantly either up- or down-regulated comparing with the wild-type strain. A systematic understanding of doxorubicin overproduction at the genomic level presented in this research should lead us a rational design of molecular genetic strain improvement strategy.

## Introduction

독소루비신은 *Streptomyces peucetius*에 의해 생산되는 anthracycline계 typeII polyketide계 화합물로서, 유전체에 클러스터 되어있는 약 40여개의 유전자들이 암호화한 다양한 효소반응을 거쳐 생합성되는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. *S. peucetius*에서의 독소루비신 생합성 과정과 관련된 조절기작은 DnrO, DnrN, DnrI를 통한 cascade형태

로 이루어졌으며, 이러한 조절기작 중 DnrI는 독소루비신 생합성 관련 유전자들의 promoter부분에 직접적으로 결합함으로써 독소루비신 생합성 유전자의 발현을 촉진시키는 역할을 한다고 보고 되었다<sup>2)</sup>.

일반적으로 독소루비신을 포함한 산업적으로 유용한 2차 대사산물의 생산성을 높이기 위해서는 DNA microarray system을 통해 전체 유전자의 발현을 종합적으로 비교분석함으로써 보다 체계적이고 효과적인 분자수준에서의 균주개량 전략이 필요하다고 할 수 있다<sup>3)</sup>. 따라서 본 연구에서는 독소루비신 경로 특이적 조절유전자(*dnrI*) 및 전구체 전환에 관여하는 특정 생합성 경로유전자(*dox4*)의 발현을 통한 독소루비신 생산성 향상을 시도하였으며, DNA microarray system을 이용하여 야생형 균주와 독소루비신 고생산 균주의 성장에 따른 유전자 발현 패턴을 비교분석 함으로써 독소루비신 생산성 향상에 결정적인 역할을 하는 유전자들을 선별 및 분석하였다.

## Material and Method

### 사용균주 및 배양조건

본 연구에서는 독소루비신 생산 균주인 *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 균주와 wild-type 균주인 *S. peucetius* ATCC29050을 사용하였다. 배양에 사용된 균주는 20% glycerol이 포함된 stock으로 -20℃에 보관되었고, 이 stock을 25ml의 NDYE 배지 (4.5% maltose, 0.5% yeast extract, 0.48% HEPES, 0.43% NaNO<sub>3</sub>, 0.023% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.012% MgSO<sub>4</sub>, 0.2% 10X trace element solution pH7.4)에 접종하여 30℃, 200rpm으로 배양 후 HPLC 분석을 통해 독소루비신 생산성을 확인하였다.

### HPLC를 이용한 독소루비신 정량분석

*S. peucetius* ATCC27952 및 고생산성 균주가 생산하는 독소루비신은 C-18 reverse phase (250×4.6 mm) column (Waters, Ireland)을 사용하여 high-performance liquid chromatography (HPLC)로 정량분석 되었다. 추출은 배양액의 일정량을 취하여 1 vol.의 추출액 (Iso-propyl alcohol : 30% HCl = 50 : 1)을 섞고 30분 교반한 후 15000 rpm에서 10min 원심분리하여 상등액을 filtration 하였다. HPLC 분석을 위한 mobile phase는 acetonitrile/water (1 : 1 v/v) 혼합액에 sodium dodecyl sulfate (1.327 g/l)와 phosphoric acid (0.68 ml/l)를 섞어 사용하였고, 유속은 1 ml/min, column 온도는 상온으로 유지하여 UV detector로 254 nm에서 독소루비신의 생산량을 정량분석 하였다.

### DNA microarray 시스템을 이용한 유전자 발현패턴 분석

독소루비신 고 생산성 균주 (*S. peucetius*/pESK403, *S. peucetius*/pESK404, industrial strain)과 야생형 균주의 성장에 따른 2차 대사관련 유전자의 발현 패턴분석을 위해, 각 균주의 성장에 따라 특정 시간대에서의 total RNA를 분리하였다. 독소루비신이 생합성 되기 이전인 lag phase(O.D<sub>600</sub> 1)를 T0 time point로 정하였고 fluorescent dye인 Cy3로 labeling 하였다. 그 이후의 time point(T1-T4)는 각각 Cy5로 labeling하였고, T0 point의 Cy3 labeled-cDNA와 T1, T2, T3, T4 point의 Cy5-labeled cDNA를 각각 1:1로 섞어 경쟁적으로 DNA chip에 hybridization 시켰다.

## Results and Discussions

### 경로 특이적 조절유전자(*dnrI*) 및 전구체 전환 생합성 유전자(*doxA*)의 과발현

본 연구에서는 *ermE*<sup>\*</sup> 프로모터를 포함하는 방선균용 발현 vector인 pSE34에 경로 특이적 조절유전자 *dnrI*와 전구체 전환 생합성 유전자 *doxA*를 각각 RBS(ribosome binding site)를 포함한 전체 ORF를 클로닝 하여 *S. peucetius*에 도입함으로써 세포내에서 안정적이고 효율적으로 각 유전자가 발현될 수 있도록 유도하였다. 각 유전자의 도입에 의한 독소루비신 생산성의 증가를 관찰하기 위하여 NDYE 배지에 진탕 배양하여 성장에 따른 독소루비신 생산량을 HPLC로 분석한 결과, 경로 특이적 조절 유전자인 *dnrI*가 도입된 *S. peucetius*/pESK404의 경우 대조군으로 vector만 포함된 *S. peucetius*/pSE34에 비해 약 5.5배의 생산성 증가가 이루어진 것으로 확인되었고, 전구체 전환 생합성 유전자인 *doxA*가 도입된 *S. peucetius*/pESK403의 경우 대조군에 비해 약 2.5배의 독소루비신 생산성 증가가 이루어진 것으로 확인되었다.

### DNA microarray 시스템을 이용한 유전자 발현패턴 분석

Doxorubicin-biosynthetic DNA chip을 이용하여 야생형 균주와 독소루비신 고생산 균주의 성장에 따른 독소루비신 생합성 유전자군의 발현 패턴을 분석한 결과 독소루비신 생산성 증가에 따라 독소루비신 생합성 유전자군의 발현이 유사하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히 그 중에서도 내성관련 유전자의 발현이 두드러지게 증가했으며, 반면에 deoxysugar 생합성과 관련된 *dnmL* 유전자의 발현이 상대적으로 억제되어 있음을 알 수 있었다.

*S. coelicolor* whole genome chip을 이용하여 야생형 균주와 산업균주의 성장에 따른 전체 유전자의 발현 패턴을 비교 분석한 결과, 야생형 균주에 비해 산업균주에서

특이적으로 발현이 증가되거나 억제된 유전자들을 선별할 수 있었다. 이렇게 발현 패턴의 차이를 보이는 유전자들은 야생형 균주와 산업 균주간의 독소루비신 생산성 차이를 유발하는 데 관여하는 주요 유전자일 가능성을 제시해 주고 있다.

## References

1. Grimm, A., K. Madduri, A. Ali and C. R. Hutchinson, Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase(1994), *Gene*, **151**, 1-10.
2. Otten, S. L., C. Olano and C. R. Hutchinson, The *dnrO* gene encodes a DNA-binding protein that regulates daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by controlling expression of the *dnrN* pseudo response regulator gene(2000), *Microbiology*, **146**, 1457-1468.
3. Rodriguez, E., Z. Hu, S. ou, Y. Volchegursky and C. R. Hutchinson, Rapid engineering of polyketide overproduction by gene transfer to industrially optimized strains(2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 480-488.