

Isolation of Novel *Pseudocardia* Polyene Biosynthetic Genes via Genomics-based PCR Screening

Mi-Yeon Lee¹, Young-Bin Hwang¹, Hyun-Joo Park², Kyu-Boem Han³, Eung-Soo Kim^{1*}

Department of Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea¹

SongWon Envichem Inc., Kangnam-gu, Seoul, 135-010, Korea²

Hanson Biotech Co., Ltd. 201 IACRI, Han Nam Univ. Daeduk-gu, Daejeon 306-791, Korea³

TEL : +82-32-860-8318, FAX : +82-32-872-4046

Abstract

The polyene antibiotics are a family of most promising antifungal polyketide compounds, typically produced by actinomycetes species. Using the polyene CYP-specific PCR screening with several actinomycetes genomic DNAs, *Pseudocardia autotrophica* strain was identified to contain a unique polyene-specific CYP gene. The genomic DNA library screening using the polyene-specific CYP gene probe revealed the positive cosmid clone containing an approximately 34.5 kb DNA fragment revealed a total of seven complete and two incomplete open reading frame (ORFs), which are highly homologous but unique to previously-known polyene biosynthetic genes. These results suggest that the polyene-specific screening approach should be an efficient way of isolating potentially-valuable cryptic polyene biosynthetic gene cluster from various rare actinomycetes.

서론

항진균 및 항바이러스 활성을 지닌 polyene 계열의 항생물질은 일반적으로 20-40 개의 탄소로 이루어진 거대한 macrolide 링 구조를 지니며, 분자 내에 약 3-8개의 conjugated double bond를 갖는 전형적인 type I polyketide macrolide 화합물이다. Polyene 화합물은 곰팡이 및 효모와 같은 진균류에 대한 우수한 항진균 활성을 갖는다고 알려져 있으며, 탁월한 항진균 및 항바이러스 활성의 우수성으로 인하여 신규 및 개량된 polyene macrolide 항생물질의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황이다. 본 연구에서는 polyene 생산여부가 확인되지 않은 희소 방선균 *P. autotrophica*의 유전체에 존재하는 cryptic polyene gene cluster를 탐색함으로써, 궁극적으로는 미생물 유전체 검색을 통한 polyene 계열의 신규 항진균제 및 항바이러스제의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구에서는 *Pseudonocardia autotrophica* KCTC9441 균주를 사용하였으며 이 균주로부터 cosmid library를 제작하고 신규 polyene 생합성 유전자를 스크리닝 하였다. Polyene 화합물의 생산을 확인하기 위하여 HPLC를 이용한 정량 분석 실험을 수행하였다. 배양액 추출 시 사용된 용매는 buthanol, ethylacetate, methanol이고, 용매에 따라 evaporation, sonication 과정을 첨가하기도 하였다. HPLC 분석시 C-18 reverse phase (150×4.6mm) column을 사용하였으며, 0.05M ammonium acetate (pH3.8)과 acetonitrile을 3:2로 섞어 mobile phase로 사용하였다. 유속은 1ml/min, UV detector를 사용하여 295 nm에서 polyene화합물의 정량분석을 하였다. 또한 항진균 활성도를 알아보기 위하여 다양한 균주를 사용하여 bioassay 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

Colony hybridization 방법과 PCR-based screening 방법을 통하여 *P. autotrophica*의 cosmid library로부터 polyene macrolide 생합성 유전자 cluster 포함한 cosmid를 찾아내었다. 약 34.5kb DNA 단편의 염기서열 분석을 한 결과 기존에 밝혀진 여러 polyene 생합성 유전자 cluster와 매우 유사하지만 구조적으로 다른 화합물을 생산할 것이라는 가능성을 예측할 수 있었다. *P. autotrophica*에서 polyene macrolide 화합물을 실제로 생산하는지 확인하기 위하여 HPLC 정량분석 실험을 수행한 결과 polyene 화합물을 탐지할 수 있는 특정 UV파장에서 피크가 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *P. autotrophica*에서 생산되는 화합물의 항진균 활성도를 알아보기 위하여 *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* 등의 다양한 균주를 이용하여 bioassay 실험을 수행하였다.

References

1. T. Brautaset, O. N. Sekurova, H. Sletta, T. E. Ellingsen, A. R. Strom, S. Valla, and S. B. Zotchev, "Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455 : analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway"(2000), *Chem. Biol.* 7, 395-403
2. S. B. Zotchev, "Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy"(2003), *Current Medical Chemistry* 10, 211-223
3. E. Jonsbu, M. McIntyre and J. Nielsen, "The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*"(2001), *Journal of Biotechnology* 95, 133-144