Strain Improvement and Genetic Characterization of Tautomycetin Biosynthesis in *Streptomyces* spp.

Choi Si Sun[1], Kim Myung Gun[2], Eung-Soo Kim[2]

[1]ForHuman Tech co., Ltd., Suwon University, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea

[2]Department of Biological Engineering, Inha university, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-31-222-5922, FAX : +82-31-222-5962

Abstract

TMC (Tautomycetin) is a liner polyketide immunosuppressive antifungal compound produced by *Streptomyces* spp. Inhibition of T cell proliferation with TMC was observed highly efficient at 100-fold lower than those needed to achieve maximal inhibition with cyclosporin A. To elucidate the biosynthetic pathway of TMC, a genomic DNA library was constructed using a *E. coil-Streptomyces* shuttle cosmid vector, pOJ446. The DNA libraries were screened by colony blot hybridization using several polyketide ß-ketosynthase (KS) probes amplified from TMC-producing *Streptomyces* genomic DNA using polymerase chain reaction (PCR), of which the degenerate primers were designed based on the highly conserved sequences present in KS domains of various type I polyketide synthase genes in *Streptomyces* species. This library construction and screening approach led to the isolation of several positive cosmid clones representing type I polyketide biosynthetic gene clusters. In addition, a *Streptomyces* regulatory gene called *afsR2* (a global regulatory gene stimulating antibiotic production in both *S. coelicolor* and *S. lividans*) was successfully integrated into the TMC-producing *Streptomyces* chromosome *via E. coil-Streptomyces* heterologous conjugation mehtod. The more detailed results of production improvement and genetic characterization of TMC-producing *Streptomyces* spp. will be discussed.

서 론

Streptomyces spp.에서 생산되는 TMC (tautomycetin)는 선형의 폴리케타이드 구조를 가지고 있으며 항진균 기능과 면역 억제의 기능을 가지고 있는 생리활성 물질이다. 특히 TMC는 현재까지 밝혀진 사이클로스포린이나 FK506과 같은 기존의 면역억제

제보다 높은 활성 및 낮은 독성을 나타내며 또한 작용 기작도 기존 면역억제제와 다르기 때문에 향후 유용한 신규 면역억제제로 기대되는 물질 중에 하나이다. 본 연구에서는 TMC의 생합성 유전자 군을 확보하고 TMC의 생산성을 최적화하기 위하여, 생합성 유전자를 클로닝 하기 위한 genomic cosmid library를 제작하였고 KS region의 conserved sequence를 degenerated primer로 제작하였다. Degenerated primer로 얻은 probe를 이용하여 colony hybridization 방법을 수행하여 PKS gene cluster를 찾아내었다. 또한 TMC의 생산량을 증대시키기 위해서 *S. coelicolor*와 *S. lividans*에서 항생제의 생산을 증가시키는 글로벌 조절 유전자 *afsR2*를 이용하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용한 균주는 TMC를 생산하는 *Streptomyces* spp.로 R2YE배지에서는 genomic DNA를 분리하기 위해 사용하였고 conjugaion은 MS배지를 사용하였다. 클로닝에는 *E. coli* DH5α를 사용했고 conjugation에는 *E. coli* ET12567(pUZ8002)을 사용하였다. TMC 생합성 유전자를 찾기 위해 TMC 생산균주의 genomic library를 *E. coli-Streptomyces* shuttle cosmid인 pOJ446 vector에 만들었고 이중 1400개 정도를 colony hybridization에 사용하였다. Hybidization에 사용한 probe는 polyketide 항생제의 KS region의 conserved sequence를 이용하여 degenerated primer를 제작하였고 PCR.결과 얻어진 product probe로 사용하였다. antifungal activity는 *Aspergillus niger*를 사용하여 24시간 후의 inhibition정도를 관찰하였다. HPLC분석에는 C18 column을 사용하였고, 273nm에서 흡광측정 하였다.

결과 및 고찰

TMC 생합성 gene cluster를 cloning 하기위해 제작한 degenerated primer를 가지고 genomic DNA로부터 PCR을 수행하여 11개의 PCR product를 분리해 낼 수 있었다. sequencing결과 KS로 확인된 product 10개를 probe로 colony hybridization을 수행한 결과 candidate cosmid 46개를 분리해 내었고 이중 PKS module을 가지고 있는 cosmid를 sequencing 하였다. 현재 sequencing 된 cosmid와 TMC 생합성 유전자와의 연관성을 유전자 파쇄를 통해 검증하고 있다. TMC의 생산량을 높이기 위한 연구로 tip promotor를 가지고 있는 integrating plasmid인 pIJ8600에 *afsR2* 조절 유전자를 cloning

한 후 이 plasmid를 chromosome 안에 안정적으로 도입시켰고 PCR 방법으로 이를 확인하였다. Wild type과 conjugant의 TMC의 antifungal activity를 측정한 결과, TMC 자체의 antifungal activity가 매우 높아서 *A. niger*의 clear zone의 크기로는 차이를 확인할 수 없어, 현재 좀 더 정량적인 분석을 위한 HPLC 분석을 수행 중이다.

References

1. J.-H Shim, H.-K Lee, E.-J Chang, W.-J Chae, J.-H. Han, D.-J. Han, Tomohiro Morio, J.-J. Yang, Alfred Bothwell, and S.-K. Lee.,(2002) Immunosuppressive effects of tautomycetin in vivo and in vitro via T cell-specific apoptosis induction. *PNAS* 99(16) pp. 10617-10622.
2. Andreas Rascher, Zhihao Hu, Nina Viswanathan, Andreas Schirmer, Ralph Reid, William C. Nierman, Matthew Lewis, C. Richard Hutchinson(2003) Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS microbiology letters* 218 pp 223-230.