항생물질 생합성 유도인자

계명대학교 자연과학대학 미생물학과 **김 현 수**

I. 서 론

Gram 양성 세균인 방선균은 항생물질을 비롯하여 효소,효소저해제,색소등 다양한 생리활성물질을 2차 대사 산물로서 생산하며, 공업적으로 대단히 유용한 균으로서 널리 알려져 있다. 이들 방선균에 있어서 기균사,포자형성등의 형태분화와 2차 대사산물생산이 자기가 생산하는 극미량의 다면형질 발현성(pleiotropic)화학물질인 자기조절인자(Autoregulator)(Fig. 1)에 의해 제어되고 있는것이 근년에들어 밝혀지고 있다.

자기조절인자의 역사적 배경은 1970년초 소련의 Khokhlov 등이 *Streptomyces griseus*로부터 Streptomycin 생산과 포자형성등 형태분화를 제어하는 물질로서 발견하여 분리,구조(1, 2) 결정한 A-factor (Autoregulating factor)를 시작으로하여, 최근에 Beppu 등은 A-factor 생합성 유전자로서 afs A(3) 및 afs A의 발현을 조절하는 유전자 afs B 와 afs C(4)를 cloning 하여 A-factor 의 형질발현 제어기구에 관해 괄목할 만한 연구결과를 보고 하였다.

또한 서독의 Gräfe 등은 anthracyclin 계 항생물질 결손변이주의 항생물질 생산및 기균사 회복 조절인자로서 *S. viridochromogens*로부터 factor I(5) 및 *S. cyaneofuscatus*와 *S. bikiniensis*로부터 3종류의 factor(6)를 분리,구조 결정하였으며, 1971 년 Yanagimoto 등은 *S. virginiae*로부터 virginiamycin (staphylomycin) 생산 유도인자로서 IM(inducing material)(7, 8) 및 청색색소 유도인자로서 *Streptomyces* sp. FRI-5로부터 IM-2를 발견한후, Yamada등이 구조,결정하여 명명한 Virginiae Butanolide A - E (VB A-E)(9, 10) 및 IM-2(11)가 알려져 있다. 그외, rifamycin 생산유도인자로서 B-factor(12), *S. venezulae*로부터의 sporulating factor(13), *S. alboniger* 로부터 mikamycin(14) 등이 자기조절인자로서 밝혀져 있다.

이들 자기조절인자의 구조적 특징은 Fig.1에서와 같이 공통점으로서 γ-lactone 환을 비롯하여 2 위의 측쇄 및 3위의 hydroxymethyl 기를 가지며, 2, 3위의 입체배열 및 2 위의 측쇄의 길이 및 구조가 상이하게 밝혀져 있다. 또한 이들 자기 조절인자가 수 ng/ml의 극 미량의 농도에서 조절능을 발휘하는 점으로 보아 진핵생물에 비해 원핵생물인 미생물에서의 호르몬 물질로서 추정되어, signal 전달에 관여한다고 예상되는 receptor성 결합 단백질로서 VB와 관련한 VB receptor가 본 필자에 의해 처음으로 분리, 정제(15, 16)되었고, 뒤이어 A-factor receptor의 존재(17)가 입증되어 이들 자기조절인자가 원핵 세포유래의 호르몬 물질로서 새로운 2차 대사산물생산의 대사제어계의 연구가 시작되었다. 최근 Okamoto등(18)이 처음으로 VB receptor 유전자인 vbr A의 cloning 및 vbr A의 *E. coli* 유래의 필수 유전자인 Nus G와의 높은 상동성(36%)으로 부터 전사, 번역기구의 필수 유전자로서 가능성의 보고와, Miyake등(19)은 A-factor receptor의 repressor로서의 기능을 보고함에 따라 이들 자기조절인자의 항생물질등 2차 대사산물의 생합성에 있어서 signal전달에 따른 전사조절의 switch on-off 기구 연구에 박차를 가하게 되었으며 본고에서는 VB를 중심으로한 유도인자의 기능면 및

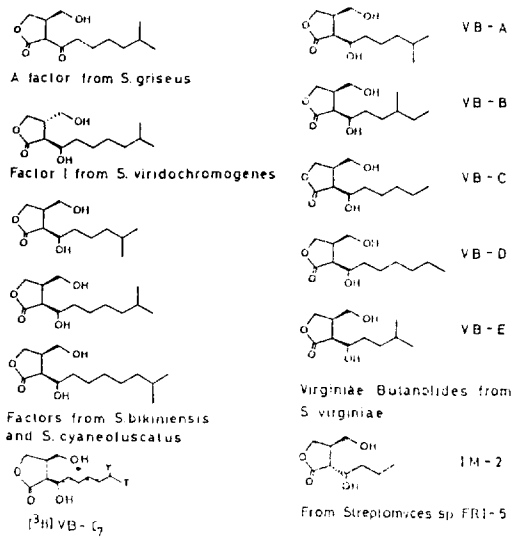

Fig. 1. Structures of signal molecules isolated from *Streptomyces* spp.

응용면을 소개하고자 한다.

II. Autoregulators관련 생산균의 분포

항생물질, 색소등 2차 대사산물의 생산및 포자착생등의 형태분화를 조절하는 유도인자에 대해 旣知의 유도인자 생산 *Streptomyces*속 균주를 시험균으로 하여 보고된 각종 유도인자 생산균을 Table 1에 요약하였다. Hara등(20)은 A-factor생산균의 경우, 175 *Streptomyces* spp.중 26 株, 14 *Actinomyces spp.* 중 3 株, 11 *Nocardia* spp.중 1 株등 전체 방선균중 약 15%가 A-factor생산을 보고하였으며, Eritt등(21)은 기균사및 anthracycline계 항생물질 (leukaemomycin)생합성 유도인자생산의 경우, *S. griseus*의 40 strains중 37 strains인 92.5%가 생산하며, 다른 *Streptomyces* spp. 304 株중 26.3%인 80 strains, 기타 *Actinomyces* spp., fungi 등 77 strains중 12%인 12 strains가 유도인자(Gräfe's factors)를 생산한다고 보고하였으며, virginiamycin 생산유도 인자 VB및 청색색소 생산유도인자인 IM-2의 경우, Ohashi등(22)은 *Streptomyces* spp. 11 株중 3 株인 27%가 VB류를 생산하며, Hashimoto등(23)은 *Streptomyces* spp. 62 株중 11 株인 17.7%가 VB및 IM-2를 생산한다는 보고에서 볼때, 이들 autoregulator가 *Streptomyces*속 균의 30-40%에서 생산되는점에서 유도인자와 2차 대사산물생성과의 관계가 상당히 주목되며, 이들 유도인자의 pleiotropic(다면형질 발현성)한 기능면에서 볼때 유도인자의 signal전달에 따른 다양한 물질의 유도가 예상된다.

III. VB의 항생물질 유도능

Autoregulators중 VB의 경우, *S. virginiae*의 배양액중 5가지 type(VB-A, B, C, D, E, Fig. 1)이 2,3위가 cis형인 천연물질로서 생산되며, VB-C type의 virginiamycin (staphylomycin) 생산유도에 관여하는 부분 구조로서는 Nihira등(24)이 보고한 2, 3위가 cis형, 5, 6위의 수산기가 필수적이며, 2위의 측쇄의 길이가 C7혹은C8이 최대유도활성을 가지며, 이들 VB류의 유도인자로서의 기능은 Fig. 2에서와 같이 VB첨가에의해 4시간 정도의 virginiamycin생산시기가 미 첨가시에 비해 단축되는 유도능을 가지면서 또한, VB첨가농도의 증가에따라 항생물질 생산량도 증대하는 결과를 필자가 확인하였다(결과 미발표). 이들 유도인자의 유도능및 생산종류에 대해 대상균주에 대한 특이성은 A-factor및 Gräfe factors에서 보고하였으나, VB의 경우 他 VB생산균에서 다양한 VB류가 HPLC분석에의해 생산되는 결과(22, 23)에

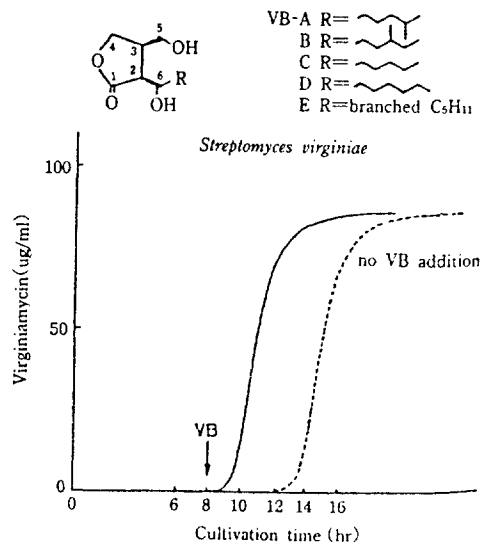

Fig. 2. Induction profile of virginiamycin production by VB.

Table 1. The list of natural autoregulators producing strains.

	Strains		
A-factor production(20)	*S. albus* IFO 3195	*S. griseinus* IFO 12869	
	S. antibioticus IFO 3126	*S. griseoflavus* IFO 12372	
	S. aureus IAM 0092	*S. griseoluteus* IAM 0060	
	S. bikiniensis IFO 13350	*S. griseus* IFO 3102	
	S. blastmyceticus 295	*S. hirsutus* IFO 12786	
	S. caelesceus ISP 5421	*S. parvus* IFO 3388	
	S. coelicolor A3	*S. sindenensis* IFO 12915	
	S. cyaneofuscatus IFO 13190	*S. viridis* IFO 13373	
	S. flaveolus IAM 0117	*S. zaomyceticus* IFO 13348	
	S. fradiae ATCC 19609	*A. cyanoalbus* IFO 12857	
	S. globisporus IFO 12208	*A. fluorescens* IFO 12861	
	S. viridochromogenes IFO 12338	*N. brasiliensis*	
	A. citreofluorescens IFO 12853		
Gräfe factor production(21)	*S. acrimycini* IMET 40159	*S. flaveolus* IMET JA 2629	
	S. albus ATCC 3005	*S. globisporus* " JA 4812	
	S. ambofaciens IMET JA 4297	*S. gobitricini* " JA 8011	
	S. anulatus ATCC 3307	*S. lateritius* " JA 4808	
	S. antibioticus ATCC 10382	*S. lipmanii* " JA 4649	
	S. badius IMET JA 4817	*S. litmocidini* " JA 4847	
	S. bikiniensis IMET JA 8031	*S. luteolutescens* " 40341	
	S. bobili IMET JA 4578	*S. longisporoflavus* " 40338	
	S. californicus IMET JA 2640	*S. misroflavus* ATCC 13231	
	S. cellulosae IMET 40229	*S. novaecaesareae* IMET 40348	
	S. chrysomallus IMET JA 1449	*S. olivochromogenes* IMET JA 8012	
	S. coelicolor ATCC 10147	*S. phaeochromogenes* ATCC 3338	
	S. cremeus IMET 40147	*S. rubiginosohelvolus* ATCC 19926	
	S. cyneofuscatus ATCC 19746	*S. viridochromogenes* IMET 40381	
	S. diastatochromogenes IMET JA 10081		
	S. parvullus IMET JA 3616	*S. roseoflavus* IMET JA 5068	
	S. erythraeus IMET 40276	*S. roseoviolaceus* IMET 40135	
	S. variabilis IMET JA 4842	*S. violaceorectus* IMET JA 4846	
		VB	IM-2
VB & IM-2 production (22,23)	*S. lincolnensis* IFO 13054	+	?
	S. antibioticus IFO 12838	+ + + +	?
	S. griseus IFO 3430	+	?
	Bacillus brevis IFO 3331	−	?
	S. canus IFO 12752	−	+
	S. celluloflavus IFO 13780	+	+ +
	S. clavuligerus IFO 13307	+	−
	S. lividans IFO 13787	−	+
	S. longwoodensis IFO 14251	+ + + +	−
	S. narbonensis IFO 12801	−	+ +
	S. phaeofaciens IFO 13372	+ + +	−
	S. sclerogranulatus IFO 14301	+	+
	S. sioyaensis IFO 12820	−	+ +
	S. toyocaensis IFO 12824	+ + +	−
	S. tubercidicus IFO 13090	+ + + +	+ +

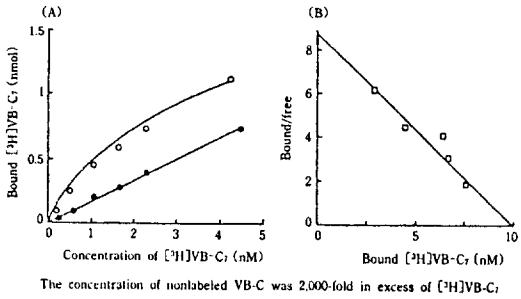

Fig. 3. Concentration dependence of the [^{3}H]VB-C_7 binding in the absence (●) and presence of nonlabeled VB-C (○) (A), Scatchard plots of specific [^{3}H]VB-C_7 binding (B).

서 각각 유도인자에 대해 동일 signal전달 기구를 소유한 균주에서는 2차 대사산물의 유도가능성이 강하게 시사되어 본 연구실에서는 VB를 중심으로 연구가 진행중에 있으며 몇몇 결과도 이루어져 있다.

IV. VB의 signal전달 기구

이들 자기조절인자가 원핵생물인 미생물에 있어서 호르몬성 물질이라는 가설아래 signal전달과 관련하여 본 필자는 처음으로 receptor성 결합단백질의 존재및 정제를 수행하였다. [^{3}H] label한 합성 VB-C7(VB-D)를 ligand로하여 세포질내 존재하는 VB receptor의 존재를 확인하여 Fig. 3에서 보인 바와 Kd=1.1 nM의 극히 높은 친화력및 *S. virginiae*의 genome DNA당(cell당) 극히 적은 30-40개의 receptor가 존재하는 사실로부터 receptor의 recycle이 예상되었으며(15), 분자량 약 36,000인 단일의 polypeptide임을 추정하였으며(16), 최근 Yamamoto등(18)에 의해 VB receptor 유전자인 vbr A가 cloning되어 분자량 34,676(amino acid-319)임이 재 입증되었다. 뒤이어 A-factor receptor도 Miyake등(17)에 의해 존재가 입증되어 Kd=0.8 nM, 분자량 26,000으로 추정하였으며, VB receptor를 介在한 signal전달기구와 관련하여 본인에 의해 VB receptor의 recycle 기능, VB의 DNA와의 결합및 VB receptor의 [γ-^{32}P] ATP에 의한 인산화로부터 인산화에의한 signal전달기구가 예상되었으며(25), A-factor의 경우, Horinouchi등(26)은 afs A(A-factor 생합성 유전자)의 조절 유전자인 afs BC(afs R)산물인 'Afs BC단백질의 인산화(autophosphorylation)에 의해 방선균의 2차 대사 switch로서 기능을 예상하였으며, Miyake등(19)은 A-factor receptor결손 변이주를 이용한 실험으로부터 receptor가 streptomycin(Sm)생합성 조절유전자인 promotor에 결합하여 Sm생산을 억제하며 A-factor 와 결합에 의해 promotor로부터 분리되어 Sm생합성이 개시되는 repressor로서의 가설을 보고하였다. 따라서 이들 유도인자의 signal전달 기구와 관련하여 receptor protein과 유도인자 생합성 조절유전자 산물등의 기능 연구가 대단히 기대되고 있다.

V. Autoregulators 의 응용면

방선균이 생산하는 자기조절인자중 A-factor를 중심으로 VB등의 분자 생물학적 연구가 근년들어 활발하게 진행되고 있으며 대단히 흥미있는 연구결과가 나오고 있다. 특히 2차 대사산물 생산과 관련하여 이들 유도인자의 pleiotropic(다면형질 발현성)기능으로부터 A-factor의 경우, i) Horinouchi등(27)은 afs A(A-factor 생합성 유전자)의 발현을 조절하는 조절유전자인 afs B가 近緣의 균인 *S. lividans*에 대해 휴면상태인 항생물질 생합성 유전자(silent gene)를 발현시켜 대량의 항생물질(actinorhodin)생산을 유도한다는 보고와 ii) A-factor존재에 따른 protein합성 pattern의 변화가 1차원,2차원 acrylamide 전기영동에의해 확인되었다는 보고로부터 유도인자 첨가에 따른 silent gene의 발현으로부터 새로운 물질생산의 시도가 가능하며, iii) 대사제어 기구확립에 따른 응용면으로서는 Miyake등(19)은 Fig. 4에서 보고한 바와 같이 A-factor receptor 결손 변이주의 경우 wild type보다 Sm생산시기의 단축및 생산량이 10배 정도 증가한다는 결과로부터 유사한 signal전달기구를 소유한 방선균에 대해 유도인자 첨가에 따른 repressor해제및 대사조절로부터 2차 대사산물 생산의 새로운 산업적 응용이 가능하리라 기대된다. 본 연구실에서는 VB 생산균의 다양한 VB류 생산성으로부터 특정 VB 혹은 VB류를 他 항생물질 생산균에 첨가하여 항생물질등 2차 산물 생산성을 연구하고 있으며, Fig. 5에서 보인 바와 같이 VB류를 생산하는 lysocellin생산균에 VB-C를 첨가한 결과 항생물질생산의 유도가 입증되었으며,

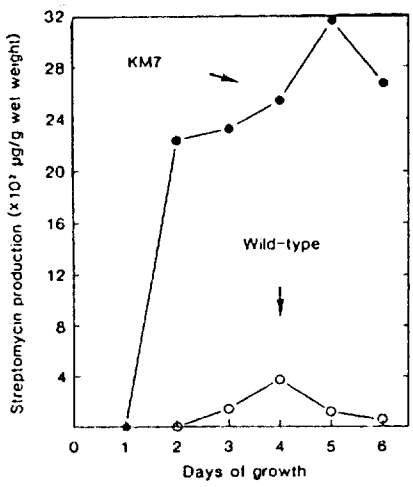

Fig. 4. Time courses of Streptomycin production by *S. griseus* IFO 13350 (○) and *S. griseus* KM7 (●). *S. griseus* strins were grown in liquid medium for 3 days at 28℃. The mycelium was homogenized with a glass homogenizer,and 0.01 m*l* of the homogenate with transferred into 10 m*l* of fresh medium. Strptomycin in the culture broth was bioassayed with *B. subtilis* as the indicator. A calculation curve was obtained with paper disks containing authentic streptomycin and *B. subtilis*. Each plot is the mean of the values obtained from two independent experiments.

첨가농도에 의한 유도시기 단축및 청색색소의 유도가 시사되어 앞으로 유용한 물질의 생산성에 유도인자의 이용이 擡頭되리라 전망한다.

VI. 결 언

원핵 생물중 진화의 最 先端에 있는 방선균의 2가지 특징인 형태분화및 2차 대사산물생산에 있어서 생산을 조절하는 유도인자에 대해 소개를 하였다. 특히 항생물질 생산에 있어서 고생산성을 위한 생산조건의 다양화, 변이주 개발,세포융합에의한 균주개량및 유전공학 기술을 이용한 hybrid항생물질생산등의 방법이외 위에서 소개한 다면형질 발현성의 유도인자를 이용한 대사제어계의 확립에 따른 생산성 증대및 생산시기의 단축, silent gene 발현에 따른 신규항생물질 생산, 다양한 항생물질의 동시생산, 효소,색소,생리활성 물질등의 생산가능성, 그리고, 새로운 조절 유전자 도입에의한 전사조절로부터의 물질생산등 방선균을 이용한 새로운 물질생산계가

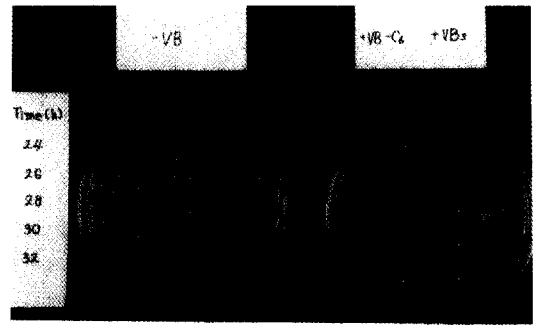

Fig. 5. Inducing effect of synthetic VB-C_6 on lysocellin production of *S. longwoodensis*.

확립되리라 확신한다.

참고문헌

1. Khokhlov, A.S., I.I. Tovarova, L.N. Borisova, S.A. Pliner, L.A. Shevchenko, E.Ya. Konitskaya, N.S. Ivkina & I.A. Rapoport, Dokady *Akad. Nauk.* SSSR, **177**, 232(1967).
2. Khokhlov, A.S., L.N. Anisova, I.I. Tovarova, E. M. Kleiner, I.V. Kovalenko, D.I. Krasilnikova, E. Ya. Kornitskaya & S.A. Pliner, *Z. Allg. Mikrobiol.*, **13**, 645(1973).
3. Horinouch, S., O. Hara & T. Beppu, *J. Bacteriol.*, **155**, 1238(1983).
4. Horinouch, S., S.Y. Kumada & T. Beppu, *J.Bacterol.*, **158**, 481(1984).
5. Gräfe, U., W. Shade, I. Eritt, W.F. Fleck & L. Radics, *J. Antibiot.*, **35**, 1722-1723(1982).
6. Gräfe, U., R.W. Shade, I. Eritt, W.F. Fleck & L. Radics, *Biotechnol. Lett.*, **5**, 591-596(1983).
7. Yanagimoto, M. & G. Terui, *J. Ferment. Technol.*, **49**, 604-610(1971).
8. Yanagimoto, M. & G. Terui, *J. Ferment. Technol.*, **49**, 611-618(1971).
9. Yamada, Y., K. Sugamura, K. Kondo, M. Yanagimoto & H. Okada, *J. Antibiot.*, **40**, 496-504 (1987).
10. Kondo, K., Y. Higuch, S. Sakuda, T. Nihira & Y. Yamada, 16th Int. Symp. chem. Natural Product p.544 (1988).
11. Satoh, K., Nihira, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M. & Yamada, Y., *J. Ferment. Biotechnol.*, **68**, 170-173 (1989).

12. Kawaguchi, T., T. Asahi, T. Sato, T. Uozumi & T. Beppu, *J. Antibiot.* **37**, 1587-1595(1984).
13. Scribner, H.E., T. Tang & G. Bradley, *Appl. Microbiol.* **25**, 873-879(1973).
14. McCann, P.A. & B.M. Pogell, *J. Antibiot.* **32**, 673-678(1979).
15. Kim, H.S., T. Nihira, H. Tada, M. Yanagimoto & Y. Yamada, *J. Antibiot.* **42**, 769-778(1989).
16. Kim, H.S., H. Tada, T. Nihira & Y. Yamada, *J. Antibiot.* **43**, 692-706(1990).
17. Miyake, K., S. Horinouchi, M. Yoshida, N. Chiba, M. Mori, N. Nogawa, N. Morikawa & T. Beppu, *J. Bacteriol.* **171**, 4298-4302(1989).
18. Okamoto, S., T.Nihira, H. Kataoka, A. Suzuki & Y. Yamada, *J. Biol. Chem.* **267**, 1093-1098 (1992).
19. Miyake, K., T. Kuzuyama, S. Horinouchi & T. Beppu, *J. Bacteriol.*, **172**, 3003-3008(1990).
20. Hara, O. & T. Beppu, *J. Antibiot.* **35**, 349-358 (1981).
21. Errit, I., U. Gräfe & W.F. Fleck, *Z. allg. Mikrobiol.*, **24**, 3-12(1984).
22. Ohashi, H., Y.H. Zheng, T. Nihira & Y. Yamada, *J. Antibiot.* **42**, 1191-1195(1989).
23. Hashimoto, K., T. Nihira & Y. Yamada, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 61-65(1992).
24. Nihira,T., Y. Shimizu, H.S. Kim & Y. Yamada, *J. Antibiot.*, **41**, 1828-1837(1988).
25. 김현수, 한국 미생물 학회지, **30**, 181-186(1992).
26. Horinouchi S. & T.Beppu, 蛋白質 核酸 酵素 臨時增刊, **35**, 2567-2583(1990).
27. Horinouchi,S. & T.Beppu, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2131-2133(1984).